UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização de metaloproteinases de matriz e reek em queratinócitos primários que expressam oncoproteínas do papilomavírus humano (HPV)

Laura Beatriz da Silva Cardeal

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
Co-orientador:
Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo

São Paulo

2010

Laura Beatriz da Silva Cardeal

Caracterização de metaloproteinases de matriz e reek em queratinócitos primários que expressam oncoproteínas do papilomavírus humano (HPV)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação e apoio incondicionais,

À minha irmã, pelas muitas, muitas horas de conversas

*Ao Arthur, por todo amor e compreensão,
meus dias são sempre mais felizes com você!*

AGRADECIMENTOS

Definitivamente, ir para bancada é muito mais fácil que escrever para todos que quero agradecer, mas vamos lá.....

À Deus por tudo....

Aos meus pais, por toda paciência, dedicação, suporte nas épocas sem bolsa, por entenderem meus “sumiços” na época de escrever, por dividirem as alegrias e as tristezas do cotidiano do laboratório, vocês sempre me encorajaram a seguir esta carreira, este sonho, para isto não tenho palavras para agradecer. A minha mãe “carneirinho” por ler sobre ciência e sempre me fazer pensar e ao papito, por carinhosamente confundir as MMPs com os chocolates MMs!

À minha irmã Heloiza, pela sua lealdade imbatível, por se emocionar comigo ao ver a biografia de Charles Darwin e achar que conto histórias tão legais quanto às dele, amor de irmã....

Ao Arthurzinho, meu marido, por estar comigo em todos os momentos, por me esperar, não importa quantas horas sejam, até meus experimentos acabarem, pelas discussões filosóficas, por me encorajar e apoiar na minha viagem aos EUA. A realização do nosso sonho, a nossa casinha, têm sido incrível! Sua alegria, sua lealdade, seu barulho, seus abraços preenchem e confortam a minha vida. Obrigada meu amor por todo seu carinho, tolerância, dedicação e pela sua culinária, sem eles meus dias não seriam tão felizes!

À minha querida orientadora, Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler, por ter confiado a mim este projeto, e acreditado que eu o poderia fazer. Por toda orientação, pelas muitas horas na sua sala, por ter me permitido participar de um congresso internacional fantástico e de um estágio nos EUA, que me trouxe, mais que conhecimento profissional, crescimento pessoal. Por ter me dado a oportunidade de ensinar alunos novos e participar da evolução do nosso laboratório. O seu profissionalismo, dedicação e carinho estão sempre presentes na minha vida. Obrigada pela oportunidade e por me fazer gostar cada dia mais de trabalhar com a interação célula-matriz, adorei!

Ao meu co-orientador, Dr. Enrique Boccardo, por me aceitar como sua aluna, por me ensinar o novo mundo da virologia, por sua visão crítica e tentar me ensinar a ser mais pragmática. Mais que um co-orientador, você foi um bom amigo e ouvinte.

À Dra. Luisa Lina Villa por ter me aceitado como parte integrante da sua equipe e pela incrível oportunidade de poder desenvolver metade do meu doutorado no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Obrigada por ter me incluído no projeto Temático e confiar em meu trabalho. A sua alegria irradia e sempre me relembra do por que resolvi seguir esta carreira.

A minha nova família: Verinha, Sérgio, Gustavo, Tedinha e Vó Antônia. Vocês fazem eu me sentir querida e em casa. Obrigada por tudo, de coração.

À minha tia Selma, por sempre acreditar que sou especial, e ao meu querido primo André, por gostar de ciências! À minha madrinha Edna, por me estimular desde pequena ser uma “cientista”. Aos meus tios Beto e Lúcia e aos tios de coração Rose e Zé Carlos que mesmo distantes me apóiam muito e acreditam no meu trabalho.

Aos meus amigos que fui conquistando e mantendo durante minha vida, vocês tem sempre uma palavra de apoio e nunca me deixaram desistir. Que bom que vocês existem: Aninha, Nino, Luis, Carol, Mariana, Celinha, Priscila, Manuela, Ricardo, Hellen, Lia, Júlio e Patrícia. A turma dos Desertores da Escada, obrigada pelos momentos divertidíssimos nas viagens. Ao Vitão, a Simone e a baby pela torcida da nova casa, vocês são especiais.

As minhas amigas que fiz em São Francisco, Giovanna e Fabiana. O apoio, carinho e amizade de vocês tornaram minha vida nos EUA muito melhor! Não tenho como agradecer a generosidade!

A Carlinha, minha amiga, confidente, e primeira aluna! Sou extremamente feliz em poder presenciar o seu crescimento profissional, você é o meu orgulho! Obrigada pela sua lealdade, por me ensinar e estar comigo nesta “aventura” todos os dias... e por quase acreditar em mim quando falo que o timer toca música da Natal, hahah!

Ao Renato, meu querido bagunceiro, que me ajuda sempre, não importa o que eu precise. Sua super paz de espírito me tranquiliza e suas artes modernas enchem meus olhos.

Aos meus amigos do laboratório: A Camila, pelos momentos de filosofia, a Rebeca pela eterna “força na peruca”, ao Diogo por tirar muitas dúvidas: a “força” sempre vai estar com a gente! A Tatiana, minha companheira de início, obrigada pelo meu bolo de aniversário exclusivo! A turma nova: Erika, Manuela, Raquel, sempre dispostas a me ajudar! A Marina, minha IC, por toda ajuda e por me dar a oportunidade de ensinar.

À Dra. Silvia Berlanga por todo seu dinamismo, por fazer e acontecer! Obrigada pelo carinho, idéias, apoio e palavras! Trabalhar com seu grupo, “nova e velha guarda” foi um privilégio para mim. As amigas, Vanessa por compartilhar suas ótimas teorias, a Tânia, pelas horas de conversa e a Cristina, por sempre se lembrar de mim quando o assunto é MMP.

A minha família Ludwig: Laura, por ser tão amiga e me ensinar tanto da vida....a Tatiana Rabachini, pelos pequenos detalhes da cultura que fizeram toda a diferença, as duas, por dividirem as alegrias da minha nova casa! A Lara, pelas divertidas aulas sobre o ciclo dos frangos (mais simpáticas que o ciclo de Krebs), ao Joãozinho pela imensa ajuda e carinho, a Aline pela amizade, ao Ismar por me ensinar sobre a cultura iralndesa, a Lepique pela perseverança, a Stella, Neide, Cecília e Antonieta por tornaram tudo mais fácil quando estou no Ludwig.

A turma do BCM, especialmente a Michelli e ao Cleiton, que são meus amigos de NB2, por me ajudarem tanto e pela torcida, obrigada mesmo! Ao Erico e a Paula, por sempre terem um tempinho para ajudar e conversar.

Ao Dr Mario Hirata do Depto de Análises Clínicas – FCF/USP, por disponibilizar o equipamento para realização do ensaio de *real-time* PCR.

A Dra Raquel Gerlach da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo por me recebido em seu laboratório e pela Dq gelatina.

Ao Dra Bettina Malnic do Instituto de Química da USP por disponibilizar o microscópio de fluorescência.

Ao Dr Sandro Rogerio de Almeida do Depto de Análises Clínicas – FCF/USP por disponibilizar o equipamento MiniBis Pro para digitalização dos géis feitos nos ensaios de zimografia.

Ao Dr. Fernando Salvador Moreno do Depto de Alimentos– FCF/USP e seus alunos por toda ajuda com reagentes e dúvidas e pelo uso da sala escura.

Ao Dr Thomas Prates Ong do Depto de Alimentos – FCF/USP pelas amostras de hepatocarcinoma murino.

A Dra Silvana Sandri do Depto de Análises Clínicas – FCF/USP pelas amostras de placenta humana.

A Dra Ana Campa do Depto de Análises Clínicas – FCF/USP e seus alunos por toda ajuda, pelas conversas e pela ótima convivência com este laboratório irmão.

Ao Dr Dr Gilles Landman, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, SP, pelas amostras de pele humana.

A Dra. María Soengas do Departamento de Biologia Molecular do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madri, Espanha), pelos fibroblastos humanos.

A Dras. Mikala Egeblad e Zena Werb pela oportunidade da realização do estágio de doutoramento na Universidade da Califórnia (UCSF), São Francisco, USA.

Ao apoio financeiro do CNPq, Fapesp, CAPES, FINEP e PRP-USP.

“Tenho certeza de que se eu sorrisse menos teria menos amigos.”

Dalai Lama

“Mas, então, de repente, Miguilim parou em frente do doutor.[...] Por fim, disse. Pediu. O doutor entendeu e achou graça. Tirou os óculos, pôs na cara de Miguilim. E Miguilim olhou para todos, com tanta força.. [...] O Mutum era bonito! Agora ele sabia.”

João Guimarães Rosa.

Manuelzão e Miguilim (Corpo de Baile)

RESUMO

Cardeal, L. B. S. 2010. **Caracterização de metaloproteinases de matriz e reck em queratinócitos primários que expressam oncoproteínas do papilomavírus humano (HPV)**. 142f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os tumores da cérvix-uterina, que representam uma das principais doenças ginecológicas em mulheres na idade reprodutiva em todo o mundo, estão etiologicamente associados com a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). A progressão de uma lesão intraepitelial escamosa de baixo-grau (LSIL) a um carcinoma invasivo de cérvix uterina está acompanhada da degradação da matriz extracelular (MEC) devido à ação progressiva das metaloproteinases de matriz (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) no processo de invasão e metástase. Entretanto, o balanço entre as MMPs e seus reguladores como RECK e TIMPs é necessário para controlar esta invasão. O objetivo deste projeto consiste em avaliar a atividade e a expressão das metaloproteinases 2, 9, e 14, e caracterizar a expressão do gene supressor de metástase *RECK* e do inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP-2), em modelo de queratinócitos humanos infectados com retrovírus recombinantes que expressam os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV 16, em culturas cultivadas em monocamada e organotípicas. Para isso, utilizamos ensaios de *real-time* PCR, zimografia, western blot, imunocitoquímica, ensaio de ELISA e imunohistoquímica. Em culturas em monocamada observamos que as células que expressam as oncoproteínas E6E7 de HPV16 apresentaram menores níveis protéicos de RECK e TIMP-2 em relação ao controle pXLSN. Quando analisamos as culturas organotípicas, também observamos esta diminuição dos níveis de RNAm e protéicos de RECK em *rafts* que expressam E6E7, acompanhado pelo aumento da atividade de MMP-9, em relação ao controle. Também observamos que o tratamento das culturas com a citocina TNF aumenta a expressão gênica, protéica e atividade de MMP-9 em todas as linhagens analisadas. Além disso, os oncogenes E6 e/ou E7 não afetam a expressão e/ou atividade de MMP-2, MT1-MMP. Nossos dados demonstraram que a expressão das oncoproteínas E6E7 de HPV16 estão relacionadas com o desequilíbrio entre MMPS e seus inibidores, sugerindo que em uma fase pré-invasiva do carcinoma

cervical, não somente as MMPs, mas, principalmente seus inibidores são críticos para início da progressão tumoral.

Palavras-chave: Metaloproteinase. RECK. HPV. Carcinoma cervical. Cultura organotípica.

Abstract

Cardeal, L. B. S. **Characterization of matrix metalloproteinases and reck in primary keratinocytes that express human papillomavirus (HPV) oncoproteins** 2009. 142 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Cervical cancer is etiologically associated with to high-risk human papillomavirus (HPV) infection. It has been observed that matrix metalloproteinases (MMPs) -2, -9, and MT1-MMP are required for basement membrane degradation during cervical carcinoma progression. Moreover, a counterbalancing among MMPs and their regulators, such as TIMPs and RECK, is necessary to modulate invasion. In order to study the effect of HPV oncogenes on MMPs expression, primary human keratinocytes (PHKs) were infected with recombinant retroviruses expressing wild-type HPV16 E6 and/or E7 oncogenes and were used to seed monolayers and organotypic cultures. Quantitative real-time PCR (Q-PCR), western blot, zimography, immunocytochemistry, ELISA assay and immunohistochemistry were used to determine the expression level and activity of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and their inhibitors RECK and TIMP-2. We observed that cultures expressing E6E7 presented lower RECK and TIMP-2 protein levels than control keratinocytes. In addition, *rafts* cultures presented the same lower RECK levels additionally presenting higher MMP-9 activity than control. Furthermore, we observed that expression of E6 and/or E7 proteins do not affect MMP-2 and MT1-MMP protein levels and/or activity. We also observed that TNF treatment enhance the MMP-9 gene and protein expression and activity in all studied cell lines. Taken together, our results demonstrate that HPV16E6E7 expression is related with the unbalance between MMPs and their inhibitors, suggesting that in the initial steps of HPV-related cervical disease, not only MMPs but also RECK and TIMP-2 are critical for tumor progression.

Keywords: Metalloproteinase. RECK. HPV. Cervical carcinoma. Organotypic culture.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** ESQUEMA DO VETOR RETROVIRAL PLXSN. LTR: LONG TERMINAL REPEAT – REGIÃO DO PROMOTOR RETROVIRAL; INSERÇÃO DAS ONCOPROTEÍNAS; SV40P: PROMOTOR VÍRUS SÍMIO 40; NEO: GENE QUE CODIFICA PARA A RESISTÊNCIA À NEOMICINA. ADAPTADO DE MILLER E ROSMAN, 1989. 17
- FIGURA 2:** ESQUEMA DAS ONCOPROTEÍNAS E6 E E7 E LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES. A: A ONCOPROTEÍNA E6 POSSUI DOIS DEDOS DE ZINCO E UMA REGIÃO CONSERVADA. A DELEÇÃO NA REGIÃO AMINO-TERMINAL ESTÁ REPRESENTADA EM VERMELHO. B: A ONCOPROTEÍNA E7 POSSUI UM DEDO DE ZINCO E DUAS REGIÕES CONSERVADAS. A SUBSTITUIÇÃO NA REGIÃO CENTRAL 2 ESTA REPRESENTADA EM AZUL. CR= REGIÃO CONSERVADA. (MODIFICADO DE BALDI CVM, 2008). 18
- FIGURA 3:** ETAPAS NA OBTENÇÃO DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS OU PORTADORES DE GENES DE HPV. 23
- FIGURA 4:** OBTENÇÃO DA CULTURA ORGANOTÍPICA (*RAFT*). A: CULTURA ORGANOTÍPICA APÓS 9-11 NA INTERFACE MEIO-AR. B: GRADE DE AÇO ONDE O OCORRE A DIFERENCIAÇÃO DO *RAFT*. C: CORTE DAS BORDAS DO *RAFT* COM BISTURI. D: SEPARAÇÃO DA EPIDERME DA MATRIZ DE COLÁGENO. 24
- FIGURA 5:** ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS QPHS INFECTADOS COM OS VETORES VIRAIS PLXSN, E6WT, E7WT E E6E7, OBSERVADOS EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE, CULTIVADOS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE TNF. NOTAR QUE AS CÉLULAS, TANTO AS TRANSDUZIDAS COM O VETOR CONTROLE PLXSN QUANTO AS TRANSDUZIDAS COM OS ONCOGENES VIRAIS, APRESENTAM MORFOLOGIA SEMELHANTE, MESMO TRATADAS COM TNF. AUMENTO DE 100X. 39
- FIGURA 6:** PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2* (A), *MMP-9*(B), *MT1-MMP*(C), *TIMP-2*(D) E *RECK* (E) EM RELAÇÃO À *TUBULINA* ANALISADA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *REAL-TIME* PCR. AMOSTRAS FORAM NORMALIZADAS POR PLXSN SEM TRATAMENTO COM TNF-A. AMOSTRAS DE CULTURAS EM MONOCAMADA. *P<0.05. PODEMOS OBSERVAR QUE NA PRESENÇA DO ONCOGENE E7WT E E6E7 EM CONJUNTO, HÁ UMA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2* E *TIMP-2*, INDEPENDENTE DA PRESENÇA DO TNF. ALÉM DISSO, O TRATAMENTO COM TNF INDUZIU A EXPRESSÃO DE *MMP-9* E *TIMP-2*, MESMO NAS CÉLULAS INFECTADAS COM VETOR CONTROLE. 41
- FIGURA 7:** DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE *MMP-2*, *MMP-9* E *MT1-MMP* POR WESTERN BLOT EM AMOSTRAS DE QPHS INFECTADOS. A: *MMP-2*, B: *MMP-9*, C: *MT1-MMP*. A PROTEÍNA TOTAL DE HT1080 FOI

UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO PARA TODAS AS MMPS ESTUDADAS. A B-ACTINA FOI UTILIZADA COMO CONTROLE DE QUANTIDADE PROTÉICA. OBSERVAR QUE OS NÍVEIS PROTÉICOS DESTAS MMPS NÃO ESTÃO ALTERADOS NOS QPHS INFECTADOS COM OS ONCOGENES VIRAIS..... 43

FIGURA 8: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE RECK E MMP-9 POR WESTERN BLOT EM AMOSTRAS DE CULTURAS EM MONOCAMADA SEM E COM TRATAMENTO COM TNF. A: RECK: FOI UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO PARA RECK. B: MMP-9. COMO CONTROLES FORAM UTILIZADOS PROTEÍNA TOTAL DE FF273 (FIBROBLASTO HUMANO) PARA RECK E DE HT1080 PARA MMP-9. OBSERVAR QUE OS NÍVEIS PROTÉICOS DE RECK ESTÃO DIMINUÍDOS NOS QPHS INFECTADOS COM E7 E E6E7 EM RELAÇÃO AO CONTROLE PLXSN, MESMO QUANDO TRATADAS COM TNF. PARA MMP-9, PODEMOS VER QUE O TRATAMENTO COM TNF INDUZ OS NÍVEIS PROTÉICOS DESTA MMP. B-ACTINA FOI UTILIZADA COMO CONTROLE DE QUANTIDADE PROTÉICA..... 45

FIGURA 9: DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK ATRAVÉS DE ENSAIO DE IMUNOCITOQUÍMICA EM QPHS INFECTADOS COM PLXSN, E6WT, E7WT E E6E7. COLORAÇÃO EM VERDE: RECK(ALEXA 488) E EM AZUL: NÚCLEO (DAPI). PODEMOS OBSERVAR A MARCAÇÃO CITOPASMÁTICA PARA RECK COM MENOR INTENSIDADE NOS QPHS INFECTADOS COM E7WT E E6E7 EM RELAÇÃO AO CONTROLE PLXSN E A E6WT. SÃO APRESENTADOS TRÊS CAMPOS DE CADA CULTURA. NO PRIMEIRO CAMPO DE PLXSN, PODEMOS ESTÁ REPRESENTADO O CONTROLE DA REAÇÃO, SOMENTE COM ANTICORPO SECUNDÁRIO ALEXA 488. AUMENTO DE 1000X..... 46

FIGURA 10: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE MMP-2, MMP-9 E RECK POR WESTERN BLOT EM AMOSTRAS LINHAGENS DE CARCINOMA CERVICAL HUMANO. A: MMP-2, B: MMP-9, C: RECK.. A B-ACTINA FOI UTILIZADA COMO CONTROLE DE QUANTIDADE PROTÉICA. 47

FIGURA 11:QUANTIFICAÇÃO DE TIMP-2 ATRAVÉS DO ENSAIO DE ELISA, EM CULTURAS DE QPHS INFECTADOS COM OS VETORES PLXSN, E6WT, E7WT E E6E7. COMO CONTROLE POSITIVO DA REAÇÃO, FOI UTILIZADA AMOSTRA DE PLACENTA HUMANA, DE ACORDO COM AS RECOMENDAÇÕES DO FABRICANTE. PODEMOS OBSERVAR A DIMINUIÇÃO DE TIMP-2 NAS CULTURAS QUE EXPRESSAM E6E7. $P < 0.05(*)$ 48

FIGURA 12: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2 E MMP-9. A: ZIMOGRÁFIA UTILIZANDO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE QPHS INFECTADOS COM OS ONCOGENES E6 E/OU E7. AS ATIVIDADES DAS MMPS ESTÃO EVIDENCIADAS PELAS BANDAS CLARAS. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-9 (B) E DE MMP-2 (C) UTILIZANDO ENSAIO BIOTRAK. AS AMOSTRAS FORAM NORMALIZADAS POR PLXSN. OBSERVAR QUE NA PRESENÇA DE E6WT HÁ UM AUMENTO DA ATIVIDADE DE MMP-9 EM RELAÇÃO AO CONTROLE PLXSN, MAS QUANDO EXPRESSOS

CONJUNTAMENTE, E6E7 NÃO MODULAM A ATIVIDADE DE MMP-9 E MMP-2 EM RELAÇÃO AO PLXSN. 50

FIGURA 13: ENSAIO DE ZIMOGRafia AVALIANDO A ATIVIDADE DAS MMP-2 E MMP-9 COMPARANDO-SE AS CULTURAS TRATADAS OU NÃO COM TNF. RECOMB.: MMPS -2 E -9 RECOMBINANTES. OBSERVAR O AUMENTO DE ATIVIDADE DE PRÓ-MMP-9 NA PRESENÇA DE TNF EM TODAS AS CULTURAS. 51

FIGURA 14: IMAGEM DE UM CORTE TRANSVERSAL DE UMA CULTURA ORGANOTÍPICA DE QPH MOSTRANDO A CORRESPONDÊNCIA COM AS DIFERENTES CAMADAS DA EPIDERME E OS MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO DO EPITÉLIO. AUMENTO 400X. 52

FIGURA 15: IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS DE *RAFTS* DE QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANO (QPH) NA AUSÊNCIA DE TNF. COLORAÇÃO H/E. NOTAR AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS PELOS GENES VIRAIS E6 E/OU E7. AS SETAS AMARELAS INDICAM AS MITOSES E AS VERMELHAS AS COILOCITOSES E QUERATINIZAÇÃO INTRAEPITELIAL. AS PONTAS DE SETAS PRETAS INDICAM A MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. 54

FIGURA 16: COMPARAÇÃO DE CORTES TRANSVERSAIS DE *RAFTS* DE QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANO (QPH) TRATADOS OU NÃO COM 2NM DE TNF-A. COLORAÇÃO H/E. NOTAR O ACHATAMENTO DAS CÉLULAS BASAIS E GRANULOSAS NA PRESENÇA DE TNF-A. AS PONTAS DE SETAS PRETAS INDICAM A MEMBRANA BASAL. AS SETAS AMARELAS INDICAM MITOSES E AS SETAS VERMELHAS INDICAM COILOCITOSES E QUERATINIZAÇÃO INTRAEPITELIAL. AUMENTO 400X. 56

FIGURA 17: IMUNOHISTOQUÍMICA PARA INVOLUCRINA, QUERATINA 10 (K10) E QUERATINA 14 (K14) EM AMOSTRAS DE PELE HUMANA. NOTAR O EPITÉLIO ESTRATIFICADO NORMAL, APRESENTANDO UMA FORTE MARCAÇÃO PARA INVOLUCRINA (A) NAS CAMADAS ESPINHOSA E GRANULAR. PARA A K10 (B), PODEMOS OBSERVAR UMA FORTE MARCAÇÃO DESTA QUERATINA NAS CAMADAS SUPRABASAIS E MARCAÇÃO NEGATIVA NA CAMADA BASAL. PARA K14(C), NOTAR A FORTE MARCAÇÃO NA CAMADA BASAL. AS SETAS PRETAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. BARRA ESCALA 50MM. 59

FIGURA 18: IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QPHS CONTENDO O VETOR CONTROLE PLXSN OU EXPRESSANDO AS ONCOPROTEÍNAS DE HPV16. A MARCAÇÃO CITOPASMÁTICA CORRESPONDE A INVOLUCRINA DETECTADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA. AS SETAS PRETAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. BARRA DE ESCALA 50MM. 60

FIGURA 19: IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QPHS CONTENDO O VETOR CONTROLE PLXSN OU EXPRESSANDO AS ONCOPROTEÍNAS DE HPV16. A MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA CORRESPONDE A QUERATINA 10, DETECTADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA. AS SETAS PRETAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. BARRA DE ESCALA 50MM. 62

FIGURA 20: IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QPHS CONTENDO O VETOR CONTROLE PLXSN OU EXPRESSANDO AS ONCOPROTEÍNAS DE HPV16. A MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA CORRESPONDE A QUERATINA 14, DETECTADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA. AS SETAS PRETAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. BARRA DE ESCALA 50MM. 64

FIGURA 21: PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2* (A), *MMP-9*(B), *MT1-MMP*(C), *TIMP-2*(D) E *RECK* (E) EM RELAÇÃO À *TUBULINA* ANALISADA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *REAL-TIME* PCR. AMOSTRAS FORAM NORMALIZADAS POR PLXSN SEM TRATAMENTO COM TNF- α . AMOSTRAS DE EPIDERMIS DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS. * $P < 0.05$. PODEMOS OBSERVAR QUE NA PRESENÇA DO ONCOGENE E7WT HÁ UMA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2*; NA PRESENÇA DE E6E7 EM CONJUNTO, HÁ UMA DIMINUIÇÃO DE *MMP-2* E *RECK* (INDEPENDENTE DA PRESENÇA DO TNF) E UM AUMENTO PARA *MT1-MMP*. ALÉM DISSO, O TRATAMENTO COM TNF INDUZIU A EXPRESSÃO DE *MMP-9*, MESMO NAS CÉLULAS INFECTADAS COM VETOR CONTROLE. 66

FIGURA 22: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE *MMP-9* POR WESTERN BLOT EM AMOSTRAS DE *RAFTS* DESENVOLVIDOS A PARTIR DE QPHS INFECTADOS, TRATADOS OU NÃO COM TNF. A *TUBULINA* FOI UTILIZADA COMO CONTROLE DE QUANTIDADE PROTÉICA. OBSERVAR QUE OS NÍVEIS PROTÉICOS DE *MMP-9* ATIVA NÃO ESTÃO ALTERADOS NOS *RAFTS* INFECTADOS COM OS ONCOGENES VIRAIS. 68

FIGURA 23: ENSAIO DE ZIMOGRAMA EM EPITÉLIO DE *RAFTS*. EXTRATO PROTÉICO TOTAL DE EPIDERMIS E DERME DE *RAFTS*. AS ATIVIDADES DAS MMPs ESTÃO REPRESENTADAS PELAS BANDAS CLARAS. HT1080: SOBRENADANTE DESTA LINHAGEM, UTILIZADO COM CONTROLE DA REAÇÃO. ZIMOGRAMA (A), QUANTIFICAÇÃO ATIVIDADE DE PRO-*MMP-9* NA EPIDERMIS (B) E NA DERME (C). OBSERVAR O AUMENTO DE *MMP-9* EM E7WT E E6E7 E AUSÊNCIA DE ATIVIDADE DE *MMP-9* NO EQUIVALENTE DÉRMICO (SETA AMARELA). 70

FIGURA 24: IMUNOHISTOQUÍMICA PARA *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP* (*MMP-14*) EM AMOSTRAS DE PLACENTA HUMANA E *RECK* EM AMOSTRAS DE PELE HUMANA. NOTAR A MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA PARA *MMP-2* E *MMP-9* E MARCAÇÃO DE MEMBRANA PARA *MMP-14*. NO EPITÉLIO ESTRATIFICADO NORMAL, PODEMOS OBSERVAR A MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA PARA *RECK*, COM DESTAQUE PARA VASOS. AUMENTO DE 400X. 71

- FIGURA 25:** IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QPHS CONTENDO O VETOR CONTROLE PLXSN OU EXPRESSANDO AS ONCOPROTEÍNAS DE HPV16. A MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA CORRESPONDE A RECK, DETECTADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA. AS SETAS PRTEAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. BARRA DE ESCALA 50MM. 73
- FIGURA 26:** IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QPHS CONTENDO O VETOR CONTROLE PLXSN OU EXPRESSANDO AS ONCOPROTEÍNAS DE HPV16. A MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA CORRESPONDE A MMP-9, DETECTADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA. AS SETAS PRTEAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DA MEMBRANA BASAL. AUMENTO 400X. BARRA DE ESCALA 50MM. 75
- FIGURA 27:** DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE PRB E P53 POR WESTERN BLOT EM AMOSTRAS DE CULTURAS EM MONOCAMADA E CULTURAS ORGANOTÍPICAS. B-ACTINA FOI UTILIZADA COMO CONTROLE DE QUANTIDADE PROTÉICA. 104
- FIGURA 28:** PADRONIZAÇÃO DO REAL-TIME PCR UTILIZANDO O “POOL” DAS AMOSTRAS DE *RAFTS* NÃO TRATADOS COM TNF. GRÁFICOS MOSTRANDO AS CURVAS DE AMPLIFICAÇÕES DE CADA GENE ESTUDADO. AS SETAS EM PRETO INDICAM A DILUIÇÃO DE 1:60 E AS VERMELHO A DILUIÇÃO DE 1:120 DO POOL DAS AMOSTRAS. 106
- FIGURA 29:** GRÁFICOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DELTA-DELTA CT PARA AS AMOSTRAS DE *RAFTS* NÃO TRATADAS. SÉRIE 1 F(X); SÉRIE 2 (Y). 108
- FIGURA 30:** GRÁFICOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DELTA-DELTA CT PARA AS AMOSTRAS DE *RAFTS* TRATADAS COM TNF-A. SÉRIE 1 F(X); SÉRIE 2 (Y). 109
- FIGURA 31:** QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA LIBERADA PELA GELATINA SOLUBILIZADA NO MEIO DE CULTURA PROVENIENTE DA DEGRADAÇÃO DQ™ GELATINA. OS DADOS REPRESENTAM MEDIA E DESVIO-PADRÃO. *P<0.05. 111
- FIGURA 32:** ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE PLXSN, E6WT, E7WT E E6E7. A DEGRADAÇÃO DA DQ GELATINA ESTÁ REPRESENTADA PELA FLUORESCÊNCIA EM VERDE. COLORAÇÃO NUCLEAR COM DAPI (AZUL). NAS IMAGENS PODEMOS OBSERVAR A FLUORESCÊNCIA VERDE DA DEGRADAÇÃO DA DQ GELATINA NAS AMOSTRAS MERGE (SOBREPOSIÇÃO DQ GELATINA+DAPI), E O “BACKGROUND” VERDE FOSCO PRODUZIDO PELA GELATINA NORMAL NA QUAL A DQ GELATINA ESTÁ DILUÍDA NAS AMOSTRAS CONTROLE E ILOMASTAT (DQ+ILO25MM). AUMENTO 400X. 112

FIGURA 33: ENSAIO DE FERIDA COM AS AMOSTRAS DE QPHS QUE EXPRESSAM AS ONCOPROTEÍNAS E7WT E E6E7 DE HPV16. AS FOTOS FORAM TIRADAS NOS TEMPOS DE 0 E 12 HORAS APÓS A FERIDA SER FEITA.AUMENTO 40X. 113

FIGURA 34: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE FAK E FAK FOSFORILADA POR WESTERN BLOT EM AMOSTRAS DE CULTURAS EM MONOCAMADA DE QPHS QUE EXPRESSAM AS ONCOPROTEÍNAS E6 E/OU E7 DE HPV16 E LINHAGENS DE CARCINOMA CERVICAL..... 114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> DE MMPS E SEUS INIBIDORES PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE <i>REAL-TIME PCR</i>	26
TABELA 2: ANTICORPOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING.	31
TABELA 3: ANTICORPOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	36
TABELA 4: VALORES DA INCLINAÇÃO DAS RETAS (SLOPE) APÓS CÁLCULO DA REGRESSÃO LINEAR. AMOSTRAS DE <i>RAFTS</i> E CULTURAS EM MONOCAMADA TRATADAS OU NÃO COM TNF.	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCUS - células escamosas atípicas com significado indeterminado

AP-1 – proteína ativadora 1

ATCC- American tissue and cell collection

BSA – albumina de soro bovino

bFGF- fator de crescimento básico de fibroblastos

cDNA- DNA obtido por transcrição reversa, a partir de RNA

Ct – limiar do ciclo

DME – ‘Dubelcco’s Modified Eagle’s’

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxiribonucléico

2D - bidimensional

EBV - vírus Epstein-Barr

EDTA – ácido etileno dinitrilo tetracético

EGF – fator de crescimento epitelial

ERK - quinases reguladoras de sinal extracelular

E2F – fator de transcrição E2F

E2 – proteína viral precoce 2

E4 - proteína viral precoce 4

E5 - proteína viral precoce 5

E6 - proteína viral precoce 6

E7 - proteína viral precoce 7

FAK - quinase de adesão focal

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GPI – glicosil fosfatidil inositol

GTPase – enzima que hidrolisa guanosina trifosfatada

HDAC - histona deacetilases

HDI – inibidor de histona deacetilases

HE- hematoxilina-eosina

HPV - papilomavírus humano

H-ras- pro-oncogene ras

HSIL - lesão intraepitelial escamosa de alto-grau

hTert - transcriptase reversa da telomerase humana
INCA - Instituto Nacional de Câncer
KDa- kiloDaltons
K10 – queratina 10
K14 – queratina 14
LMP1 - proteína latente de membrana 1
LSIL - lesão intraepitelial escamosa de baixo-grau
L1 - proteína estrutural 1
L2 - proteína estrutural 2
MAP- proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MEC - matriz extracelular
MEK – quinase de proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MMPs - metaloproteinases de matriz
MPis – Inibidores de metaloproteinases
MT-MMP – metaloproteinases de matriz ligadas à membrana
MT1-MMP - metaloproteinase 1 do tipo de membrana
NIC - neoplasia intra-epitelial cervical
PBSA – tampão fosfato
PBSA – tampão fosfato livre de cálcio e magnésio
PCR - reação da polimerase em cadeia
P-FAK - quinase de adesão focal fosforilada
QPH –queratinócito primário humano
Rac1 – proteína G pequena de sinalização
Rap1- pequena GTPase
RECK – reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
RNA - ácido ribonucléico
RT-PCR – transcrição reversa
SCC - carcinoma escamoso invasivo
SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio- gel de poliacrilamida
siRNA – RNA de interferência de pequeno tamanho
SPI-like – inibidor de serina protease “like”
Sp1 – fator de transcrição Sp1

Src – tirosina quinase proto-oncogênica

TA – temperatura ambiente

TGF- β - fator de crescimento transformante beta

TIMP - inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TSA - tricostatina A

3D - tridimensional

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HPV e Neoplasias da Cérvix Uterina	1
1.2 Microambiente Tumoral	6
1.2.1 O Papel das MMPs na Progressão dos tumores cervicais	7
1.2.2 O Gene Supressor de Metástase/Angiogênese <i>RECK</i>	10
1.2.3 O Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)	14
1.3 Culturas Organotípicas Epiteliais - <i>Rafts</i>	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Vetores retrovirais	17
3.2 Linhagens Celulares e Culturas Organotípicas de Queratinócitos (<i>rafts</i>)	18
3.3 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	19
3.3.1 Linhagens celulares	19
3.3.2 Cultura de queratinócitos	19
3.3.2.1 Produção de partículas retrovirais e infecção dos queratinócitos para cultura em monocamada e organotípica	19
3.3.2.2 Preparação de células “feeders”	21
3.3.2.3 Preparação de equivalente dérmico	21
3.3.2.4 Cultura organotípica de queratinócitos	22
3.4 <i>Real-Time</i> PCR	24
3.4.1 Extração de RNA	24
3.4.2 Preparação dos cDNAs para Real time PCR	25
3.4.3 Reação de <i>Real Time</i> PCR	25
3.5 Zimografia	28
3.5.1 Obtenção do sobrenadante das culturas monocamada	28
3.5.2 Obtenção das proteínas de rafts	28
3.5.3 Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina	29
3.5.4 Incubação e revelação do gel	29
3.6 Western blot	30
3.6.1 Obtenção dos extratos protéicos	30
3.6.2 Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e Transferência para membrana	30
3.6.3 Incubação com anticorpos primários e secundários	31
3.7 Ensaio atividade MMP-2 e MMP-9	32
3.8 Ensaio ELISA para TIMP-2	33
3.9 Atividade gelatinolítica utilizando DQ™ gelatina	33
3.9.1 Reação de atividade das gelatinases e imunolocalização de RECK	34
3.10 Ensaio de Ferida	35
3.11 Imunohistoquímica	35
3.11.1 Obtenção das amostras	35
3.11.2 Incubação com anticorpos primários e secundários	36
3.12 Análise estatística	37

4. RESULTADOS	38
PARTE A - Resultados das Culturas Monocamadas	38
4.1-A Análise da expressão gênica de <i>MMP-2</i>, <i>MMP-9</i>, <i>MT1-MMP</i>, <i>TIMP-2</i> e <i>RECK</i>	40
4.2-A Análise da expressão protéica das MMPs e RECK	43
4.3-A Quantificação de TIMP-2 em culturas em monocamada que expressam as oncoproteínas virais E6 e/ou E7 de HPV16	48
4.4-A Atividade das MMP-2 e MMP-9	49
PARTE B - Resultados das Culturas Organotípicas	52
4.1-B Obtenção de culturas organotípicas (rafts) de queratinócitos primários humanos (QPHs) normais ou portadores de genes de HPV na ausência e presença de TNF-α	52
4.2-B Caracterização dos marcadores de diferenciação do epitélio em culturas organotípicas (rafts).	57
4.3-B Análise da expressão gênica de <i>MMP-2</i>, <i>MMP-9</i>, <i>MT1-MMP</i>, <i>TIMP-2</i> e <i>RECK</i>	65
4.4-B Análise dos níveis protéicos de MMP-9	68
4.5-B Atividade das MMP-2 e MMP-9 nas culturas organotípicas através do ensaio de zimografia	69
4.6-B Imunohistoquímica em culturas organotípicas	71
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICE A: Ensaio de western blot para proteínas p53 e pRb	104
APÊNDICE B: Padronização da técnica de Real-Time PCR	105
APÊNDICE C: Validação da análise da expressão gênica para utilização do método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta C_t$)	107
APÊNDICE D: Atividade gelatinolítica utilizando DQTM gelatina	111
APÊNDICE E: Ensaio de Ferida	113
APÊNDICE F: Ensaio de western blot para as proteínas FAK /FAK fosforilada	114
ANEXO A: Outras atividades desenvolvidas no período	115
ANEXO B: Documentos da Comissão de Ética e Pesquisa	118

1) INTRODUÇÃO

1.1) HPV e NEOPLASIAS DA CÉRVIX UTERINA

Os tumores da cérvix uterina são uma das doenças ginecológicas mais frequentes em mulheres na idade reprodutiva, representando aproximadamente 12% dos casos de câncer em mulheres em todo o mundo (zur Hausen, 2002; Wright et al, 2003), sendo o 2º câncer com maior número de mortes entre mulheres na faixa etária dos 20 aos 39 anos (Jemal et al, 2005; zur Hausen, 2009) e o quarto mais comum na população feminina, superado pelo câncer de pele não melanoma, mama e cólon e reto (INCA, 2010). No Brasil, para 2010 a estimativa de risco de novos casos de câncer de colo de útero foi de aproximadamente 18,5 casos para cada 100.000 mulheres, sendo o segundo tumor mais incidente na região Norte, o terceiro nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e o quarto nas regiões Sudeste e Sul do país (INCA, 2010).

O HPV, vírus do papiloma humano, é considerado o agente etiológico dos tumores cérvico-uterinos (zur Hausen, 1985; Bosch e Muñoz, 2002; zur Hausen, 2009). O HPV pertence à família dos papilomavírus, a qual compreende um grupo heterogêneo de vírus que apresentam tropismo por células dos epitélios escamosos e glandulares. De acordo com sítio preferencial de infecção, os diferentes tipos de HPV podem ser classificados em genitais, não genitais e associados à epidermodisplasia verruciforme (Villa, 1997).

Existem mais de 120 tipos de HPV, sendo que aproximadamente 40 tipos infectam a região ano-genital. Os HPVs genitais foram subdivididos em tipos, os de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) relacionados a lesões de alto grau e carcinomas invasivos, os de provável alto risco (26, 53 e 66) e os de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) relacionados a verrugas genitais (Muñoz et al, 2003; de Villiers et al., 2004). A probabilidade de desenvolvimento de neoplasia aumenta devido à infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico.

Embora o HPV seja essencial para a transformação das células epiteliais cervicais, não é suficiente e existe uma grande variedade de eventos moleculares e co-fatores que podem influenciar neste processo (Villa et al., 2002; zur Hausen, 2009), sendo que o fumo, a multiparidade e o uso contínuo de contraceptivos orais podem duplicar ou triplicar o risco de lesões pré e cancerosas entre as mulheres que estejam infectadas com tipos oncogênicos de HPV (revisto por Schiffman et al., 2007).

O genoma dos diferentes tipos de HPV é composto por DNA dupla-fita com aproximadamente 8000 pares de nucleotídeos, o qual codifica oito genes, sendo dois genes da região L (late-tardia, L1 e L2) que codificam para proteínas estruturais do capsídeo e seis genes E (early – inicial, E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que codificam para proteínas com diversas funções reguladoras envolvidas na persistência genômica, replicação do DNA viral, transcrição de genes virais e proliferação celular (Howley, 1996; McMurray et al., 2001; Doorbar, 2006).

O ciclo de vida do HPV está diretamente ligado à diferenciação epitelial. Células do epitélio escamoso crescem em camadas estratificadas onde apenas as células da camada basal são capazes de se dividirem ativamente. Após a divisão, uma das células filha migra e começa a se diferenciar enquanto a outra se mantém na camada basal auto-renovando a população celular. Durante o processo de diferenciação, as células deixam de se dividir e começam a produzir quantidades variáveis de tipos específicos de queratina. Esta queratina se acumula na célula, rompendo o envelope nuclear, sendo que nas camadas mais diferenciadas do epitélio, as células não possuem atividade metabólica e apresentam-se como pacotes de queratina (Watt, 1998).

A infecção por HPV ocorre inicialmente nas células da camada basal, normalmente através de microlesões. Uma vez no núcleo, o genoma viral permanece na forma episssomal e o promotor que ativa a transcrição dos genes precoces é ativado, sendo possível encontrar 50 a 100 cópias de DNA episssomal por célula (Fehrmann & Laimins, 2003). Os genes iniciais E1 e E2 do HPV controlam a replicação e a segregação viral nas células infectadas, mantendo estas células na lesão inicial por um longo período de tempo. Quando ocorre a divisão celular, o genoma viral é dividido entre as células filhas que ao migrarem para as camadas superiores do epitélio durante a diferenciação, continuam com o ciclo celular ativo. Enquanto as células infectadas se diferenciam, o promotor que ativa a transcrição dos genes tardios é ativado, iniciando a fase produtiva do ciclo de vida do HPV, marcada principalmente pelo aumento da amplificação do genoma viral. Finalmente, nas camadas mais diferenciadas do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídeos e novos vírus são liberados das células (Hebner & Laimins, 2006).

A forma episssomal do HPV é normalmente encontrada em lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) do colo do útero, contudo, em lesões de alto grau (HSIL) e nos carcinomas da cérvix uterina o genoma viral encontra-se predominantemente integrado ao

genoma do hospedeiro (Stoler, 1992). A forma de integração mais comum encontrada nas lesões malignas é aquela onde o gene E2 encontra-se interrompido. Este tipo de integração elimina o controle que E2 exerce sobre o promotor que controla a transcrição de E6 e E7, fazendo com que a expressão destes genes passe a ser constitutiva, tornando-se um dos eventos centrais na promoção da carcinogênese induzida pelo HPV (Smotkin & Wettstein, 1986; Banks et al., 1987).

A síntese contínua das proteínas E6 e E7 do HPV é uma etapa essencial para o desenvolvimento e manutenção dos tumores malignos, uma vez que ocorre durante a gênese dos tumores anogenitais associados a este vírus (zur Hausen, 2009).

A proteína E6 causa degradação do produto do gene supressor de tumor p53 através de um complexo com a ubiquitina –ligase E6AP, e a proteína E7 desestabiliza a proteína relacionada ao retinoblastoma Rb (gene supressor de tumor pRb) e outras relacionadas com o ciclo celular. Estes eventos levam a inibição da atividade pró-apoptótica de p53 e a liberação do fator transcricional E2F, levando a um aumento de ciclinas A e E que promovem a progressão do ciclo celular (Swanton & Jones, 2000; Heilmann & Kreienberg, 2002; Longworth e Laimins, 2004; revisto por Yugawa e Kiyono, 2009).

Os oncogenes virais do HPV, E6 e E7, são fatores essenciais para a imortalização, transformação e carcinogênese celular (zur Hausen, 2009). Além disso, E6 exerce efeito na morfologia celular através da ligação com paxilina e proteínas que contém o domínio PDZ, levando à perda de polaridade. E7, além de ter como alvo moléculas do ciclo celular (como p21), também interage e se opõe à ação da proteína supressora de metástase Nm23-H1 em células HaCaT, levando essas células a adquirirem capacidade invasiva (revisto por Morris et al., 2008)

Todos os tipos de HPV possuem os genes E6 e E7, que são homólogos entre os tipos, mas não idênticos. Desta forma, as proteínas virais dos tipos considerados de baixo risco possuem menor afinidade pelas proteínas dos genes supressores de tumor da célula hospedeira que os de alto risco.

O HPV16 e o HPV18 são considerados os tipos mais carcinogênicos, uma vez que são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical e cerca de 50% dos casos de HSIL; já entre os tipos de baixo risco oncogênico, os HPV 6 e o HPV11 são responsáveis por aproximadamente 90% das verrugas genitais (Smith et al., 2007).

O desenvolvimento do câncer cervical está associado a algumas etapas essenciais: a transmissão do HPV, a persistência viral, a progressão de um clone celular com infecção persistente a uma lesão pré-cancerosa e a invasão tumoral (Schiffman et al., 2007).

Antes de seu desenvolvimento, o câncer cervical é precedido por mudanças na cérvix uterina, principalmente na zona de transformação, denominada de junção epitélio escamo-colunar (Jordan & Monaghan, 2004), região onde ocorre o encontro da exocérvice (epitélio escamoso estratificado não-queratinizado) com a endocérvice (epitélio colunar). Esta região é altamente susceptível a infecção pelo HPV, sendo que 90% das neoplasias do trato genital se iniciam neste local (revisto por Narisawa-Saito & Kiyono, 2007). Por razões ainda não esclarecidas, a infecção persistente por HPV em zonas de transformação entre diferentes epitélios está relacionada com a causa de outros tumores além do de cérvix uterina, como o de ânus e de orofaringe (Parkin et al., 2006).

A progressão do câncer cervical é contínua, e de acordo com a nova classificação de Bethesda (Solomon e Nayar, 2004), a transição neoplásica da lesão intraepitelial escamosa (SIL), ocorre das lesões intraepiteliais escamosas de baixo-grau (LSIL = NIC I) a lesões intraepiteliais escamosas de alto-grau (HSIL), que incluem NIC II, NIC III e carcinoma *in situ*, a carcinoma escamoso invasivo (SCC).

A literatura mostra que aproximadamente 50% das LSILs regridem para normalidade ou ASC-US (células escamosas atípicas com significado indeterminado) no período de 6 meses (Schlecht et al, 2003). Além disso, é estimado que apenas 12% a 22% das lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) persistem ou progridem para carcinoma invasivo (Shah et al, 1996). Cerca de 75% das mulheres controlam a infecção, eliminando o vírus no período de 12 meses (Franco et al, 1999).

Lesões pré-existent na região cervical persistem por mais tempo e progridem mais rapidamente em mulheres infectadas com HPVs oncogênicos (de alto risco) do que em mulheres infectadas com HPV não-oncogênicos (de baixo risco) ou não infectadas (Schlecht et al, 2003). O tempo de “clearance” nas pacientes infectadas é maior para HPVs oncogênicos do que para os não-oncogênicos (Wolf et al, 2003).

O desenvolvimento do carcinoma cervical está relacionado com as lesões pré-cancerosas, sendo classificadas histologicamente como NICIII, displasia severa ou carcinoma *in situ*. As lesões pré-câncer são caracterizadas pela presença de células indiferenciadas com anormalidades genéticas em praticamente todo o tecido epitelial

cervical. As lesões do tipo NIC I, que não apresentam sinais histopatológicos de infecção por HPV e as NIC II, por serem muito heterogêneas e às vezes produzidas por tipos não-oncogênicos de HPV, não são consideradas lesões pré- câncer (revisto por Schiffman et al., 2007).

O tempo entre a infecção e o aparecimento da primeira evidência microscópica de lesões pré-câncer pode ser curto, geralmente de 5 anos. Na verdade, algumas lesões deste tipo tem sido diagnosticadas em períodos de 2 anos após o início da atividade sexual. Um fator de risco relacionado com a persistência viral e o aparecimento das lesões pré-cancerosas é o tipo de HPV. O HPV16 é reconhecidamente carcinogênico, com um risco absoluto de diagnóstico de lesões pré-câncer de cerca de 40% após 3-5 anos de infecção persistente (revisto por Schiffman et al., 2007).

Em um estudo realizado por Rabelo-Santos e cols., (2003), em mulheres brasileiras que apresentavam NIC III e carcinomas invasivos, mostrou-se que a prevalência de HPV é de 76% entre esses tumores. O HPV do tipo 16 foi o que apresentou maior frequência nesses casos, sendo que esse tipo é o mais freqüente na população brasileira como um todo. O HPV do tipo 18 é o segundo mais prevalente nas populações das regiões Norte, Sudeste e Sul do Brasil, e os tipos 31 e 33 são os segundos mais prevalentes nas populações das regiões Nordeste e Central do Brasil, respectivamente (Rabelo-Santos et al, 2003).

A média de idade das pacientes diagnosticadas com lesões pré-cancerosas é de 25-35 anos, sendo que o pico de risco para carcinoma invasivo está entre 35-55 anos. Esta distribuição se deve ao fato de que carcinomas cervicais se originam principalmente por infecções pelo HPV adquiridas na adolescência e início da fase adulta. A média de tempo entre a infecção por HPV e o aparecimento entre lesões pré-cancerosas é menor que a média de tempo entre a progressão destas lesões e o carcinoma invasor, sugerindo que apenas uma minoria destes tumores apresenta fenótipo invasivo (revisto por Schiffman et al., 2007).

A transformação de uma neoplasia não-invasiva em um carcinoma invasivo de cérvix uterina (SCC) está acompanhada inicialmente por uma interrupção focal e em seguida uma degradação da lâmina basal por proteases. Os carcinomas escamosos microinvasivos (profundidade de invasão menor que 3 mm) possuem uma taxa de metástase <1% e uma taxa de sobrevivência ao redor de 100%. Quando o tumor invade

mais que 5 mm em direção à submucosa, fica confinado na cérvix e penetra nos microvasos, a taxa de sobrevivência em 5 anos cai para 50% (Nuovo et al, 1995, 1997). Níveis alterados e desequilíbrio na distribuição das proteases representam um aumento no potencial invasivo (Brummer et al, 2002). As metástases para regiões extrapélvicas são relativamente raras e, apenas 5% das pacientes com diagnóstico de tumores primários apresentam metástases distantes (Ikenberg, 1993).

Por fim, um dos fatores de risco mais associado com a invasão do carcinoma cervical é o tipo HPV, em particular os tipo 16, 18 e 45. Esses tipos virais são encontrados em uma alta fração de tumores invasivos. Além disso, a integração do genoma do HPV nas células hospedeiras, assim como a contínua atividade transcricional dos oncogenes do HPV são necessárias para a manutenção do câncer (Wentzensen et al., 2004; Arias-Pulido et al., 2006).

1.2) MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente é capaz de exercer controle tanto sobre as células tumorais como as normais. Caso o genoma de células diferenciadas tivesse completa autonomia não haveria especificidade tecidual, e células isoladas continuariam a desempenhar suas funções em culturas celulares da mesma maneira que no seu órgão de origem. Isto não é o que acontece na prática: sabe-se que células isoladas perdem a maioria das suas funções diferenciadas quando separadas e colocadas em culturas tradicionais. Porém, a identidade celular não é perdida; já se sabe que modulando o ambiente das células em cultura é possível recuperar várias das suas características tecido-específicas (Bissell e LaBarge, 2005).

Os carcinomas são tumores malignos de estrutura complexa compostos por células malignas de origem epitelial e outros tipos celulares que compõem o estroma tumoral, como fibroblastos, células endoteliais, pericitos, adipócitos, linfócitos, macrófagos, granulócitos e células mielóides imaturas que podem ser identificados no tumor e ao redor do mesmo. Além disso, a composição da matriz extracelular e a presença de diferentes citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outros fatores solúveis, secretados pelos vários tipos celulares presentes, aumentam a complexidade destas estruturas. Essa combinação cria um microambiente tumoral único que pode modificar as propriedades das células neoplásicas. De fato, o ambiente pode levar à seleção de células tumorais melhor

adaptadas para sobreviver nestas condições e mais eficientes para evadir o sistema imune. Além disso, os outros tipos celulares presentes podem também ser influenciados pelo ambiente tumoral e desempenhar um papel importante na progressão do tumor. Assim, macrófagos ou células mielóides infiltrantes que sofrem diferenciação no ambiente tumoral podem apresentar efeito supressor da resposta imune celular anti-tumoral ou induzir a angiogênese (Allavena et al., 2008). Paralelamente, os fibroblastos presentes na região tumoral podem secretar fatores de crescimento que induzem a proliferação de outros tipos celulares (Bhowmick et al., 2004). Descrevemos a seguir alguns dos componentes do microambiente tumoral e sua modulação.

1.2.1) O PAPEL DAS MMPS NA PROGRESSÃO DOS TUMORES CERVICAIS

A matriz extracelular (MEC) é definida como uma mistura heterogênea de macromoléculas (incluindo colágenos e glicoproteínas não colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos) capaz de se automodelar propiciando suporte mecânico para células e tecidos. A MEC deixou de ser vista apenas como suporte mecânico, mas também como fonte de informações e como reservatório de fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular a ampla variedade de processos celulares (Pupa et al, 2002; Itoh & Nagase, 2002; Ramirez & Rifkin, 2003).

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares, que incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteinases dependentes de zinco (MMPs). As MMPs são enzimas-chave que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, tornando-se moléculas fundamentais na comunicação entre o tumor e o estroma (Kessenbrock et al., 2010), pois são responsáveis pela degradação da MEC, exercendo, desta maneira, um papel essencial no desenvolvimento e na progressão de malignidades humanas. No câncer, a regulação alterada da proteólise favorece a degradação da MEC (Benaud et al, 1998; Itoh & Nagase 2002; Baker et al, 2002; Mysliwiec et al, 2002; Singer et al, 2002).

As MMPs compreendem um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de Zn^{2+} (endopeptidases) que, de acordo com a especificidade do substrato, foram historicamente subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases, estromelisinases (Benaud et al, 1998; Sternlicht & Werb, 2001; Brummer et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002). Atualmente, as 23 MMPs conhecidas expressas em humanos são classificadas de acordo com sua estrutura.

Existem oito classes estruturais de MMPs: cinco são secretadas e três são MMPs tipo-membrana (MT-MMPs). As MT-MMPs estão ligadas à membrana celular através de domínios transmembrânicos carboxi-terminal (TM) ou âncoras do tipo GPI (glicosilfosfatidilinositol), enquanto as MMPs secretadas localizam-se na superfície celular através de ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (Chang e Werb, 2001; Sternlicht e Werb, 2001; Egeblad e Werb, 2002). De acordo com o recente banco de dados MEROPS (Rawlings et al., 2010 / <http://merops.sanger.ac.uk>), o qual disponibiliza informações sobre peptidases e seus inibidores, as MMPs possuem outras classificações, como por exemplo, a MMP-2 (gelatinase A ou metalopeptidase de matriz -2), MMP-9 (gelatinase B ou metalopeptidase de matriz -9) e MT1-MMP (MMP-14 ou metalopeptidase de matriz de membrana), objetivos deste estudo.

Em sua estrutura geral, as MMPs possuem três domínios, o domínio pró-peptídeo (80 aminoácidos), o domínio catalítico (170 aminoácidos), um peptídeo de ligação de tamanho variável (também chamada de região “em curva”) e o domínio hemopexina (200 aminoácidos) em sua região N-terminal. As MMPs são secretadas como zimógenos inativos (pro-MMPs) devido à interação entre o sítio ativo de ligação ao zinco do domínio catalítico e o resíduo cisteína do pro-peptídeo. Apenas após a clivagem proteolítica, por um mecanismo chamado cisteína-“switch”, a MMP se torna proteoliticamente ativa. (Woodhouse et al., 1997; Sternlicht e Werb, 2001; Nabeshima et al., 2002; Egeblad e Werb, 2002; Polette et al., 2004; Nagase et al., 2006, revisto por Bourbonoulia D & Stetler-Stevenson WG, 2010). As MMPs secretadas são ativadas extracelularmente por outras MMPs ativas ou por serina-proteinases como plasmina, enquanto as MT-MMPs são ativadas intracelularmente através do sítio de furina presente no domínio catalítico (Nabeshima et al., 2002; Nagase et al., 2006).

A atividade das MMPs é regulada por inibidores endógenos como $\alpha 2$ macroglobulina, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs – Tissue inhibitor of metalloproteinase), pequenas moléculas com domínios “TIMP-like” e pela recente descrita glicoproteína de membrana RECK. As TIMPs, que são identificadas em quatro tipos (TIMP-1 a TIMP-4) inibem as MMPs de uma forma seletiva mas reversível, com estequiometria de 1:1 (Chang & Werb, 2001). Esta inibição ocorre através da ligação entre o domínio N-terminal e resíduos de valina e cisteína presentes nas TIMPs e o sítio catalítico das MMPs, quelando o átomo de zinco (Murphy e Nagase, 2008).

Foi observado que TIMP-2 inibe a pro-MMP-2 (gelatinase A), modulando sua ativação. Baixas concentrações de TIMP-2 estão associadas com MT1-MMP no processo de ativação de MMP-2, no entanto, altas concentrações inibem diretamente tanto MMP-2 quanto MT1-MMP (Lafleur et al., 2003). O balanço entre proteases e seus inibidores determina o potencial proteolítico dos tumores e uma diminuição nos níveis de TIMPs está geralmente associada com tumorigênese (Overal & López-Otín, 2002).

A degradação da MEC por MMPs não apenas facilita a invasão tumoral, mas também, afeta o comportamento da célula tumoral e conduz à progressão do câncer (Itoh & Nagase, 2002). Estudos mostram que MMPs também participam dos primeiros estágios da tumorigênese e do crescimento do tumor primário até os processos de invasão e metástase. Além disso, regulam apoptose, possuem atividade vasculogênica e angiogênica e mais recentemente foram relacionadas com a formação do “nicho pré-metástático”, sendo a MMP-9 essencial para este processo (Sternlicht e Werb, 2001; Baker et al., 2002; Egeblad e Werb, 2002; Yoon et al., 2003, Kaplan et al., 2005; revisto por Kessenbrock et al., 2010).

Estudos em humanos mostram uma associação direta entre aumento da expressão de MMPs e invasividade tumoral, desenvolvimento de metástases, recorrência de tumores e baixa taxa de sobrevivência (Mysliwiec et al., 2002; Egeblad e Werb, 2002; Sheu et al., 2003). Níveis elevados de diferentes MMPs podem ser detectados nos tecidos tumorais ou no soro de pacientes em estágios de câncer avançados e seu papel como indicador de prognóstico em neoplasias vem sendo estudado (Sheu et al., 2003; La Rocca et al., 2004). As MMPs não são produzidas apenas pelo epitélio maligno, mas, também, pelo estroma adjacente, incluindo fibroblastos, miofibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais, sugerindo um importante papel da interação célula-célula (Singer et al., 2002; Egeblad Werb, 2002; Mareel e Leroy, 2003, revisto por Kessenbrock et al., 2010).

Alguns trabalhos descrevem em carcinomas escamosos da cérvix uterina a degradação da MEC, com ação das MMPs (MMP-2 e MMP-9), no processo de invasão, permeação linfovascular, metástase (nodal) e recorrência de tumores (Brummer et al., 2002; Zhou et al., 2002; Sheu et al., 2003). É observado que durante a progressão tumoral, há um aumento significativo da produção de MMPs pelas células epiteliais malignas e pelas células do estroma peritumoral. Quando a razão MMPs/TIMPs aumenta, há uma correlação com prognóstico ruim, mostrando uma maior invasividade do tumor (Nuovo et al., 1995; Brummer et al., 2002; Sheu et al., 2003).

Brummer e cols., (2002) descreveram a expressão de MMP-2 em lesões pré-invasivas de cérvix uterina e uma consecutiva co-expressão de MMP-1 e MMP-2 em tumores invasivos, que sugerem um gradual aumento no potencial invasivo. Também foi relatado que a expressão de MMP-2, quando observado em lesões intraepiteliais de alto grau, pode indicar tumores com um risco aumentado de invasão. Muitos trabalhos propõem a associação entre MMPs (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) e o potencial maligno das neoplasias humanas de cérvix (Nuovo et al., 1995; Gilles et al., 1996; Davidson et al., 1999; Brummer et al., 2002; Sheu et al., 2003; Gaiotto et al., 2004; Zhai et al., 2005)

Foi demonstrado através de ensaios de Northern blot que as linhagens de carcinoma cervical SiHa e CaSki apresentaram maior expressão de MT1-MMP em relação a HeLa, e que queratinócitos transfectados com o oncogene E7 (HPV16 e HPV8) apresentaram uma maior expressão gênica e protéica em relação aos queratinócitos primários humanos, sugerindo que a proteína E7 estaria induzindo a expressão de MMP-14 nestas células (Smola-Hess et al., 2005). Além disso, foi observado que linhagens HPV16 positivas SiHa e CaSki possuíam uma maior expressão de MMP-2 e MMP-14 em relação a linhagem C33A, HPV negativa (da Silva Cardeal et al., 2006).

Em um recente trabalho, Yoshida e cols., (2008), demonstraram em modelo de cultura organotípica infectada com E7wt de HPV18 um aumento da expressão de MT1-MMP e MMP-9 somente em conjunto com a expressão do oncogene H-ras (V12), sugerindo que a invasão mediada por MMPs ocorre somente com a ação conjunta de E7wt e do oncogene ras.

1.2.2) O GENE SUPRESSOR DE METÁSTASE/ANGIOGÊNESE RECK

O fenômeno da reversão de células transformadas e tumorais para um fenótipo normal tem permitido abordar o papel de oncogenes e de genes supressores de tumor não só no controle da proliferação celular normal como, também, na transformação celular, e nos mecanismos de transdução de sinais (Noda, 1993).

Com o objetivo de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na transformação isolou-se e caracterizou-se cDNAs, os quais, quando super-expressos, induziam a reversão fenotípica da linhagem DT, uma sub-linhagem de células NIH-3T3 transformadas com v-Ki-Ras (Noda et al, 1983, 1989; Kitayama et al, 1989; Noda et al, 1993b; Takahashi et al, 1996, 1998). Utilizando esta abordagem, foi isolado um cDNA que codifica uma glicoproteína de

membrana com aproximadamente 110 kDa denominada RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) (Takahashi et al,1998).

Tanto o cDNA humano quanto o de camundongo codificam uma proteína composta por 971 resíduos de aminoácidos, demonstrando uma identidade de 93% entre si. A proteína RECK é rica em cisteína (9,2%), sugerindo uma estrutura secundária complexa que contém regiões hidrofóbicas tanto na região NH₂ - terminal quanto na região COOH- terminal. A sequência peptídica da proteína humana madura expressa em células de mamíferos indica que a região NH₂ - terminal hidrofóbica (26 resíduos) funciona como um peptídeo sinal enquanto que a região COOH- terminal parece funcionar como âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pela qual RECK é ancorada à membrana plasmática. A porção mediana da proteína contém três domínios semelhantes aos inibidores de serina-proteases (domínio SPI-like), sendo que um deles é condizente com a sequência consenso do motivo Kazal (C-X₇-C-X₆-Y-X₃-C-X_{2,3}-C), o qual está relacionado com inibição de proteínases (NCBI, 2005). Além disso, foram detectadas duas regiões de repetição de fraca homologia com o fator de crescimento epidérmico, motivos de cisteína na região NH₂ – terminal e cinco sítios com potencial de glicosilação (Takahashi et al, 1998; Noda, 2003).

O gene *RECK* (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) é expresso em diversos tecidos humanos normais, porém, sua expressão é reprimida durante a transformação celular, uma vez que a expressão deste gene não foi detectada nas inúmeras linhagens tumorais analisadas (Takahashi et al., 1998, Masui et al., 2003). Segundo Takahashi e cols., (1998), a supressão da atividade invasiva e metastática foi observada em ensaios de superexpressão do gene *RECK* nas linhagens celulares tumorais HT1080 (fibrosarcoma humano) e B16-BL6 (melanoma de camundongo).

Durante a transformação celular, foi observada em várias linhagens tumorais que expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em secreção e atividade aumentada de MMPs, as quais contribuem para a transformação morfológica e o comportamento invasivo das células tumorais (Takahashi et al., 1998).

Através de ensaios bioquímicos, foi mostrado que a proteína RECK purificada se liga a MMP-9 e inibe a sua atividade proteolítica, por meio de um mecanismo ainda não explorado, sendo possível a formulação do seguinte modelo: em células normais, a secreção de MMP-9 está bloqueada pela ligação da mesma à proteína RECK, a qual está ancorada na membrana plasmática. Durante o processo de transformação celular, a

expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em liberação de MMP-9, a qual irá contribuir para a transformação morfológica e o comportamento invasivo de células tumorais (Takahashi et al., 1998). Relatos recentes mostraram que RECK regula negativamente, além da MMP-9, duas outras MMPs: MMP-2 e MT1-MMP (Oh et al., 2001).

Uma das características exclusivas de RECK que a torna um novo tipo de inibidor de MMPs, é o fato da proteína RECK apresentar um domínio GPI e, portanto estar localizada na membrana, diferentemente das TIMPs que são secretadas (Oh et al., 2001). Várias MMPs possuem alvos na região pericelular, uma vez que se concentram nesta região, seja ligada à membrana diretamente ou por receptores, ou ainda por proteínas ligantes na superfície celular, criando assim uma região de alta atividade proteolítica, a qual pode atuar na invasão celular bem como na sinalização localizada de fatores de crescimento por interações com moduladores ligantes da MEC. Além disso, a ativação de algumas MMPs requer interação com outras MMPs associadas à membrana (MT-MMPs). Para que ocorra o processo de ativação da MMP-2, uma TIMP-2 liga-se a pró-MMP-2 e à MT1-MMP; em seguida, uma segunda molécula de MT1-MMP cliva uma porção do pró-domínio de MMP-2 para liberar a sua forma intermediária; por fim, outra clivagem do pró-domínio de MMP-2 por outra MT1-MMP resulta na forma ativa da MMP-2 (Welm et al., 2002). Pelo fato de RECK estar localizada na região pericelular sua atividade inibitória pode ser potencializada.

Foi descrito que o restabelecimento da expressão de *RECK* em linhagem HT1080 de fibrosarcoma resulta em uma diminuição da secreção tanto da forma intermediária, quanto da forma ativa de MMP-2, sugerindo que RECK regula a ativação da ProMMP-2 por inibir duas enzimas proteolíticas necessárias para o seu processamento, especificamente as enzimas MT1-MMP e a própria MMP-2 ativa (Oh et al., 2001).

As funções biológicas de RECK *in vivo* foram exploradas através de experimentos com camundongos “knock-out” e de ensaios de tumorigenicidade em camundongos “nude” (Oh et al, 2001). Camundongos nos quais a proteína RECK funcional está ausente morrem em torno do décimo dia da fase embrionária com deficiências de fibras colágeno, desorganização da lâmina basal e redução da integridade do sistema vascular, tubo neural e tecido mesenquimal (Oh et al., 2001; Noda et al., 2003). Este fenótipo foi parcialmente suprimido pelo “knock-out” do gene correspondente à MMP-2 (camundongo apresenta

menor angiogênese e crescimento tumoral em relação ao controle) (Egeblad e Werb, 2002), indicando que a regulação da atividade de MMP-2 mediada por RECK tem um papel fisiológico.

Durante o desenvolvimento, os resultados sugerem que RECK tenha papel importante como regulador de metaloproteínases, inibindo a atividade das mesmas e propiciando, desta forma, o acúmulo necessário de colágeno para um desenvolvimento embrionário normal (Oh et al., 2001), além de ser necessário para a maturação vascular durante o processo de embriogênese (Welm et al., 2002).

Ensaio de tumorigenicidade em camundongos “nude” sugerem que RECK inibe a angiogênese tumoral, uma vez que as ramificações foram dramaticamente suprimidas nos tumores gerados a partir de células de fibrosarcoma que expressavam *RECK*. É interessante notar que camundongos “nude” que desenvolveram tumores a partir de células de fibrosarcoma expressando o gene *RECK* constitutivamente apresentaram maior sobrevida quando comparados àqueles que desenvolveram o tumor controle (ausência da expressão de *RECK*) (Oh et al., 2001).

Recentemente, Takagi e cols., (2009), demonstraram que RECK regula negativamente a transcrição de MMP-9. Utilizando a linhagem HT1080 de fibrosarcoma, através de ensaio de promotor foi demonstrado que a atividade do promotor de MMP-9 estava suprimida na presença de RECK, e que tratamento com siRNA específico para RECK aumentava os níveis de RNAm de MMP-9 em células que expressavam RECK.

Os resultados obtidos até o momento, sugerem que RECK inibe a atividade de MMPs e a transcrição de MMP-9, inibindo, assim, a invasão tumoral, metástase e angiogênese tumoral (Takahashi et al., 1998; Oh et al., 2001; Sasahara et al., 2002; Takagi et al., 2009) podendo, portanto, ser alvo promissor para a prevenção e o tratamento de câncer.

O sítio Sp1 do promotor de *RECK* além de ser um alvo para proteínas virais, também é inibido por *ras*. Está proposto que o oncogene *ras* ativa ERK (quinases reguladoras de sinal extracelular - extracellular signal-regulated kinases) a qual fosforila HDACs (histona desacetilases- histone deacetylases), induzindo a ligação dessas enzimas o sítio Sp1 de *RECK*, suprimindo sua expressão (Chang et al., 2004). Em células de pulmão CL-1 foi observado que o tratamento com tricostaina A (TSA), um inibidor de histona desacetilases, houve uma diminuição do potencial invasivo, inibição da atividade de MMP-

2 e aumento da expressão de RECK, sugerindo a ação das HDACs sobre o promotor de *RECK* (Liu et al., 2003a).

Em um recente estudo, Jeon & Lee (2010) demonstraram que a ação de inibidores HDACs também está associada com a recuperação da expressão de RECK. Linhagens MCF10A (câncer de mama) e HT1080 tratadas com TSA e submetidas à hipóxia recuperaram a expressão de RECK, diminuindo a atividade de MMP-2 e MMP-9 e inibindo a migração e a invasão de ambas as linhagens tumorais.

A literatura gerada até o presente momento relata a possibilidade de utilização de *RECK* como marcador molecular de melhor prognóstico para pacientes que apresentam carcinomas pancreático, mamário, prostático, hepatocarcinoma, pulmão e colo-retal. Nestes estudos correlaciona-se a presença de RECK com melhor prognóstico, tendência de menor invasividade e maior taxa de sobrevida dos pacientes, além de sugeri-lo como marcador de metástase peritoneal em tumores gástricos (Span et al., 2003; Masui et al., 2003; Furomoto et al., 2001; Takeuchi et al., 2004; Takenaka et al., 2004; Riddick et al., 2005; Clark et al., 2007; Du et al., 2010).

1.2.3) O FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF- α)

O TNF- α é uma proteína de membrana pertencente à superfamília de citocinas TNF/TNFR. Ele tem potencial de sinalização tanto na sua forma integrada a membrana quanto na sua forma solúvel, após a clivagem proteolítica. O TNF está envolvido na manutenção da homeostase do sistema imune e inflamação, no entanto, o TNF também está envolvido em processos patológicos como inflamação crônica, doenças autoimunes, bem como em eventos iniciais e progressão do câncer (revisto por Balkwill F, 2006).

Os mecanismos imunes que agem contra as células infectadas por HPV podem incluir a participação direta ou indireta de citocinas anti-tumorais e imunoreguladoras como os interferons, o TGF- β (transforming growth factor β), a interleucina-6, e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Malejczyk et al., 1994; Kyo et al., 1994; Delvenne et al., 1995; Bornstein et al., 1997; Klefstrom et al., 1997). O TNF- α é um potente inibidor da proliferação de queratinócitos normais e poderia desempenhar um papel importante no controle in vivo do crescimento das mesmos (Delvenne et al., 1995; Vieira et al., 1996, Malejczyk et al., 1997; Basile et al., 2001; Nees et al., 2001; Boccardo E, 2004). No

entanto, pouco se sabe a respeito do mecanismo pelo qual o TNF- α regula a proliferação celular em queratinócitos.

Em modelo de carcinoma de ovário, foi visto que a produção crônica de TNF- α no microambiente tumoral, tanto pelas células do tumor quanto pelas células do estroma, pode induzir MMPs, como MMP-9, promovendo o desenvolvimento tumoral (revisto por Balkwill F, 2006). A literatura nos mostra que em modelos de carcinogênese cervical em camundongos, os macrófagos infiltrados e neutrófilos seriam os produtores de MMP-9, cuja atividade estaria relacionada a inflamações crônicas (Pahler et al., 2008). A ação de TNF- α poderia simular o ambiente tumoral na ausência de células do sistema imune.

1.3) CULTURAS ORGANOTÍPICAS EPITELIAIS– RAFTS

As culturas organotípicas epiteliais (*rafts*) de queratinócitos humanos, infectadas com retrovírus recombinantes contendo seqüências de HPV ou transfectadas com DNA viral clonado são um modelo importante para o estudo das funções e regulações dos genes do HPV e elementos promotores, pois os resultados se correlacionam bem com as infecções *in vivo* causadas por HPV. Além disso, as culturas organotípicas também proporcionam a análise das alterações causadas pela interação vírus-epitélio, principalmente a transformação das células epiteliais por HPVs de alto-risco (Steenbergen et al., 1998; Flores et al., 1999).

McCance e cols., (1988) mostraram que queratinócitos primários transfectados com seqüências de HPV16 tornaram-se imortalizados e exibiram um padrão alterado de diferenciação. Foram observadas anormalidades celulares como coilocitose, figuras mitóticas e coloração alterada, e redução da relação citoplasma/núcleo nas células suprabasais do epitélio em sistema de *raft* de colágeno.

Ao cultivarem linhagens celulares transfectadas com HPV 16 ou 18 em *Rafts* de colágeno, Steenbergen e cols., (1998), observaram que todas as culturas organotípicas derivadas de células imortalizadas expressam mRNAs de E6 e E7 na camada basal, enquanto expressão da maioria dos transcritos virais nas camadas suprabasais eram proporcionais ao grau de displasia.

O sistema convencional de cultura de queratinócitos em monocamada seleciona aquelas células capazes de proliferar. Nestas condições os queratinócitos apresentam uma capacidade de diferenciação limitada. Isto torna difícil o estudo da história natural de

células que contêm DNA do HPV, já que a expressão dos genes virais depende estritamente de fatores celulares que são expressos em diferentes etapas do programa de diferenciação dos queratinócitos (Howley et al., 1996; zur Hausen, 1996). O sistema de cultura organotípica (*raft*) permite a proliferação e a diferenciação celular de maneira semelhante à observada nos epitélios escamosos (Chow e Broker, 1997).

As culturas organotípicas são, portanto, um potencial modelo para carcinogênese, pois este sistema proporciona o estudo do crescimento, proliferação, diferenciação, expressão gênica diferencial e potencialmente transformação maligna de células.

2) OBJETIVOS

O objetivo deste estudo consiste em avaliar a expressão e atividade de MMPs (2, 9 e 14) e de seus reguladores do tipo *RECK*, e *TIMP-2* em queratinócitos infectados com os oncogenes E6, E7 e E6E7 de HPV16 através de modelos de cultura em monocamada e organotípica (*raft*).

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar a expressão dos genes *MMP-2*, *-9*, *MT1-MMP*, *RECK* e *TIMP-2* através de *real-time* PCR ;
- 2) Detecção e quantificação da presença da atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) através de ensaios de zimografia;
- 3) Quantificação protéica (western blot) e imunolocalização das proteínas *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-2* e *RECK*.
- 4) Análise do efeito da citocina TNF nas culturas acima descritas.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Vetores retrovirais

Os vetores retrovirais pLXSN contendo os genes E6 e E7 normal de HPV 16 e os correspondentes mutantes (Miller & Rosman, 1989; Foster et al., 1996; revisto por Chow & Broker, 1997; Kiyono et al., 1998; Gewin e Galloway, 2001) foram gentilmente cedidos pela Dra. Denise A. Galloway (Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA). Estas seqüências virais estão inseridas no vetor retroviral pLXSN (No. de acesso M28248, GeneBank), sob controle da LTR (*Long Terminal Repeat*) retroviral (figura 1).

Os mutantes utilizados incluem alterações em regiões funcionalmente mais importantes das proteínas E6 e E7 (figura 2A e B). O mutante da proteína E6, E6 Δ 9-13 possui uma deleção entre os aminoácidos 9 e 13 na região amino-terminal, onde há o sítio de ligação para a proteína p53. Este mutante não é capaz de se ligar e degradar a proteína p53, bem como imortalizar células mamarias epiteliais (HMEC) e queratinócitos transduzidos (Foster e Galloway, 1996; Kiyono et al., 1998; Gewin e Galloway, 2001).

O mutante da proteína E7, E726G possui uma substituição Glu $\rightarrow$ Gli no aminoácido 26. Este mutante não é capaz de transformar células de roedor, não aumenta a proliferação de queratinócitos e não se liga nem induz a degradação da proteína pRb. Além disso, o mutante E26G é capaz de se ligar à proteína p107 (Demers et al., 1996; Helt e Galloway, 2001).

Figura 1: Esquema do vetor retroviral pLXSN. LTR: Long Terminal Repeat – região do promotor retroviral; Inserção das oncoproteínas; SV40p: promotor Vírus Símio 40; NEO: gene que codifica para a resistência à neomicina. Adaptado de Miller e Rosman, 1989.

Figura 2: Esquema das oncoproteínas E6 e E7 e localização das mutações. A: A oncoproteína E6 possui dois dedos de zinco e uma região conservada. A deleção na região amino-terminal está representada em vermelho. B: A oncoproteína E7 possui um dedo de zinco e duas regiões conservadas. A substituição na região central 2 está representada em azul. CR= região conservada. (modificado de Baldi CVM, 2008).

As etapas de purificação dos vetores retrovirais recombinantes através de maxi-preparação e centrifugação em gradiente de contínuo de cloreto de cério (CsCl) foram desenvolvidas pela equipe do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig (SP).

3.2) Linhagens Celulares e Culturas Organotípicas de Queratinócitos (*rafts*)

As linhagens celulares de carcinoma cervical humana SiHa (HTB-35) e CaSki (CRL-1550) (ambas HPV16 positiva) e C33A (HTB-31) (HPV negativa) e a linhagem celular HT1080 (ATCC fibrosarcoma) foram adquiridas na ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Os fibroblastos humanos normais, utilizados nas culturas em monocamada foram doados pela Profa. Dra. María Soengas do Departamento de

Biologia Molecular do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid, Espanha).

As culturas organotípicas epiteliais (*rafts*) utilizadas neste projeto foram desenvolvidas no Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig (SP), preparadas de acordo com Boccardo et al., 2004. Queratinócitos primários humanos adquiridos em Biobanco (Queratinócitos Primários de Neonatos, pool, número de catálogo: cc-2507, Lonza, Basel, Switzerland) foram infectados com partículas retrovirais que carregam o vetor retroviral pLXSN (Nº M28248, Clontech, USA) que expressam os genes normais E6 e/ou E7 de HPV16 e seus correspondentes mutantes E6 Δ 9-13 e E726G, utilizados no desenvolvimento das culturas organotípicas e monocamada.

3.3) Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

3.3.1) Linhagens celulares

As células, carcinomas cervicais e HT1080, foram cultivadas a 37°C em meio de crescimento DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25 µg/ml de ampicilina e 100µg/ml de estreptomicina (meio D10), em atmosfera úmida de 5% CO₂. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiram 80% da densidade de saturação utilizando tripsina a 0,1% em PBSA (tampão fosfato livre de Cálcio e Magnésio) contendo 1mM EDTA, tendo sido a cultura previamente lavada com solução de PBSA. Os estoques celulares são mantidos no meio de cultivo contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de SFB a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.3.2) Cultura de queratinócitos

3.3.2.1) Produção de partículas retrovirais e infecção dos queratinócitos para culturas em monocamada e organotípica

Os vetores retrovirais pLXSN contendo os genes E6 e/ou E7, e seus mutantes, de HPV16 ou vazio foram introduzidos em células da linhagem ecotrópica de rim humano BOSC-23 (derivada de 293, ATCC: CRL 11268) por eletroporação (950µF, 170V).

Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri de 100 mm com 7ml de meio D10 e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Quatro horas depois, o meio

de cultura foi aspirado e substituído por 5ml de meio fresco, possibilitando a concentração das partículas retrovirais que começam a ser produzidas aproximadamente 24 horas depois. Após 48 horas, o sobrenadante das células BOSC-23 foi utilizado para infectar a linhagem anfitriã Am12 (derivada de NIH3T3, ATCC: CRL 1658) mantidas em cultura em placas de Petri de 100 mm em uma confluência de 20% utilizando meio D10. Para isso, 5ml do sobrenadante das células BOSC-23 foi aspirado e filtrado utilizando filtros de acetato de celulose de 0.45µm (Corning, NY, USA) e gotejado sobre as células Am12 na presença de 10µg/mL de Polybrene® (hexadimethrine bromide, AL-118/Nº107689, Sigma, St. Louis, MO, USA), o qual impede que as partículas retrovirais se agreguem e dificultem a infecção destas células. Após 6 horas de contato com o sobrenadante de Bosc-23 foi adicionado 5ml D10. Após 24 horas do início da infecção, o meio foi substituído por meio D10 com 600µg/ml (concentração final) de Geneticina (G418, GibcoBRL, MD, USA). Após uma semana de seleção com G418, foi possível observar a formação de colônias que foram expandidas para utilização desta linhagem como fonte produtora de partículas retrovirais.

Os queratinócitos primários humanos (QPHs) mantidos em placas de Petri de 100mm com KSFM (Keratinocytes Serum Free Media, Cat. No. 17005) (Invitrogen, USA) suplementado com EGF recombinante (2.5µg, Cat. No. 10450) e extrato de pituitária bovina (2.5mg, Cat.No.13028) (Invitrogen,USA). Quando atingiram a confluência de 20% (passagem de 1 a 4) os QPHs foram infectados com o sobrenadante retroviral das células anfitriãs Am12. Este sobrenadante foi filtrado utilizando filtros de acetato de celulose de 0.45µm (Corning,USA) e adicionado aos queratinócitos na presença de 10µg/mL de Polybrene® (Sigma,USA). Após 45 minutos foi adicionado o mesmo volume KSFM (em relação ao volume de sobrenadante de Am12) para evitar a diferenciação dos queratinócitos, e após 4 horas, esse meio foi substituído por KSFM fresco. Após 48 horas de infecção, as células foram selecionadas com G418 (300 µg/mL) por 2 dias, tempo no qual somente as células infectadas sobreviveram. Após a infecção, os queratinócitos selecionados foram utilizados nas culturas monocamada e na obtenção de culturas organotípicas. Como controle foram utilizados queratinócitos sem vetor retroviral, mantidos com KSFM na presença de suplementos.

Para os ensaios em monocamada, os queratinócitos foram plaqueados em placas de Petri de 100mm e quando atingiram a confluência de 30%, foi adicionado 2nM de TNF

recombinante humano (Roche) por 60 horas. Após este período, foram coletados RNA, proteína e sobrenadante celular, tanto de culturas em monocamadas tratadas com TNF quanto de não tratadas, para os ensaios descritos a seguir. A fim de avaliar a morfologia celular, foram tiradas fotos das culturas utilizando o microscópio Olympus IX70 DP30BW usando o programa DP Manager (3.1.1.208), aumento de 100x.

Para os ensaios com culturas organotípicas, os queratinócitos transduzidos em passagem 2 foram tripsinizados e plaqueados de acordo com os itens a seguir.

3.3.2.2)Preparação de células “feeders”

A linhagem de fibroblastos de camundongo J2 (derivada de NIH 3T3, ATCC:CRL1888) (revisto por Chow e Broker, 1997) foi mantida em cultura utilizando meio D10. Estas células foram utilizadas como *feeders* para preparar o equivalente dérmico das culturas organotípicas.

3.3.2.3)Preparação de equivalente dérmico

O equivalente dérmico é constituído por uma matriz colagênica e fibroblastos J2, na proporção de 10^5 células J2 em 0,75ml de matriz. Para preparação de 10 equivalentes dérmicos, volume final de 8ml, utilizou:

tubo1: 10^6 células J2 em 400µl de SFB (correspondente a 1/20 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado);

tubo 2: mistura-se 800µl meio Ham's F12 10X (GibcoBRL, MD,USA) (1/10 do volume final de equivalente dérmico a ser preparado), 800ul de Tampão de reconstituição 10X [2,2% NaHCO₃, NaOH 0,05M, HEPES 200mM (correspondente a 1/10 do volume final de equivalente dérmico a ser preparado)] e 6,4ml de colágeno de cauda de rato tipo I (BD Biosciences, MA, USA) (correspondente a 8/10 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado).

As células do **tubo 1** foram acrescentadas ao **tubo 2** e misturadas por inversão. A mistura final foi transferida para uma placa de 24 poços (0,75ml/poço). Após a solidificação foi adicionado meio para *raft* (1ml/poço) composto de 67,5% de DMEM 1x, 22,5% de Ham's F12 1x, 10% de SFB, 5µg/ml de Apo-Transferrin (T-1147, Sigma), 5µg/ml de Insulina (I-1882,Sigma), 0,4µg/ml de Hidrocortisona-21-hemisuccinato (H-4881, Sigma), 0,5ng/ml de EGF (Epidermal growth Factor, human, 13247-010,Gibco) e

0,1nM de Toxina Colérica (3012, Sigma). A placa foi mantida à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ até a adição de queratinócitos primários humanos (QPH).

3.3.2.4) Cultura organotípica de queratinócitos

Uma suspensão de 2×10^5 QPH (normais ou transduzidos com vetores retrovirais) em 0,5ml de KSFM foi adicionada em cada poço contendo 0,75ml de equivalente dérmico. Logo após foi adicionado 0,5 ml de meio para *Raft* a cada poço e a placa foi colocada a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas o meio foi substituído por 1 ml de meio para *Raft* fresco e a matriz de colágeno de cada poço foi descolada da placa utilizando-se uma espátula. Após oito horas cada matriz de colágeno, com a superfície coberta por queratinócitos, foi transferida para uma grelha de aço colocada em uma placa de Petri de 60 mm. Posteriormente, foram adicionados 5 ml de meio para *Raft* por placa e as mesmas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram mantidas na interfase meio-ar por 9-11 dias, com troca de meio realizada a cada 48 horas (figura 3), e foram tratados com 2nM de TNF recombinante humano (Roche) nas últimas 60 horas de cultivo. Material controle na ausência de TNF foi também coletado.

Figura 3: Etapas na obtenção de culturas organotípicas de queratinócitos humanos normais ou portadores de genes de HPV.

Finalmente, após 9-11 dias na interface ar-meio as culturas organotípicas foram lavadas com PBS pH 7.4, e camada de células epidérmicas foi separada da matriz de colágeno utilizando pinça e bisturi (figura 4). Esta epiderme foi utilizada para a obtenção de extratos protéicos e RNA. Os *rafts* destinados à análise histológica não foram separados da matriz colagênica, sendo em seguida fixados, incluídos em parafina e feita coloração com hematoxilina/eosina. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus BX61, aumento 400x, utilizando o DP Manager (3.1.1.208).

Figura 4: Obtenção da cultura organotípica (*Raft*). A: Cultura organotípica após 9-11 na interface meio-ar. B: Grade de aço onde o ocorre a diferenciação do *raft*. C: Corte das bordas do *Raft* com bisturi. D: Separação da epiderme da matriz de colágeno.

3.4) Real-Time PCR

3.4.1) Extração de RNA

A camada de células epidérmicas separada da matriz de colágeno foi conservada no reagente RNeasy Lysis Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA,) a -80°C até ser processada. O RNA das culturas organotípicas foi extraído utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, USA) segundo as recomendações do fabricante. Para os ensaios com culturas monocamada, os queratinócitos foram mantidos de acordo com o descrito no item 3.3.2. Para a extração do RNA destas culturas, previamente as células foram tripsinizadas e o *pellet* foi ressuspensionado em 1,2ml de tampão RLT contendo $10\mu\text{g/ml}$ de β -mercaptoetanol, primeiro tampão de extração do kit RNeasy Mini Kit (N^o74104, Qiagen), o qual foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação dos RNAs foi realizada em espectrofotômetro (ND-1000 – NanoDrop- Wilmington, DE, USA) sendo feitas leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após a quantificação espectrofotométrica, a qualidade dos RNAs pode ser verificada em gel de agarose. Foram considerados de boa qualidade os RNAs que apresentaram uma razão da absorbância 260/280nm com valores próximos de 2. Nos géis de agarose pôde-se confirmar a quantificação do espectrofotômetro e a relação das bandas referentes às frações 18S e 28S do RNA. Com os RNAs obtidos foram realizados ensaios de *Real-Time PCR*. Armazenamos o RNA a -80°C .

3.4.2) Preparação dos cDNAs para *Real time PCR*

O primeiro passo consistiu em tratar os RNAs extraídos com DNase I (1U/ μL , Fermentas) para eliminar contaminação por DNA genômico. Em seguida realizou-se uma transcrição reversa utilizando oligo-(dT)₁₈ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Fermentas) juntamente com random *primers* (100ng/ μL , Amersham). A enzima utilizada foi utilizada a transcriptase reversa M-MuLVRT (200U/ μL , Fermentas), além de RNase OUT (40U/ μL , Fermentas) para evitar a degradação do RNA *template* pelas RNases. Ao final da transcrição reversa foi colocada RNase H (1 U/ μL , Fermentas), totalizando um volume final de 20 μL . Por fim, adicionamos 40 μL de tampão TE (TrisHCl 1M pH7. 5, EDTA 0,5M pH8. 0) por tubo de reação, tendo assim cDNAs numa diluição 1:3. Os cDNAs estão armazenados em freezer -20°C .

3.4.3) Reação de *Real Time PCR*

As reações de *Real Time PCR* foram feitas no volume final de 12 μL , contendo 3 μL da mistura de um dos pares de *primers Forward* e *Reverse* de cada gene (1,6 μM), 3 μL de cDNA proveniente do RT-PCR (diluídos 20x) e 6 μL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

Foram utilizados *primers* específicos dos genes de interesse, *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP (MMP-14)*, *RECK* e *TIMP-2* e como controles internos os *primers* dos genes *GAPDH* e *Tubulina*. Todos os *primers* foram desenhados em diferentes éxons, para evitar a amplificação de DNA genômico. As seqüências dos *primers* utilizados estão listadas na tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos *primers* de MMPs e seus Inibidores para análise da expressão gênica através de *Real-Time PCR*

Gene (outro nome)	Sequências dos Primers / Humano <i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)
MMP-2 (Gelatinase A)	F: 5'- AGCTCCCGGAAAAGATTGATG - 3' R: 5'- CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT - 3'
MMP-9 (Gelatinase B)	F: 5'- GAGGTGGACCGGATGTTCC - 3' R: 5'- AACTCACGCGCCAGTAGAAG - 3'
MT1-MMP (MMP-14)	F: 5'- GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA - 3' R: 5'- TCGAACATTGGCCTTGATCTC - 3'
TIMP-2	F: 5'- CGACATTTATGGCAACCCTATCA - 3' R: 5'- GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC3'
RECK	F: 5'- TGCAAGCAGGCATCTTCAAA - 3' R: 5'- ACCGAGCCCATTTCATTTCTG - 3'
Tubulina	F: 5'- TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG - 3' R: 5'- AGTGCCAGTGCGAACTTCATC - 3'
GAPDH	F: 5'- ACCCACTCCTCCACCTTTGA - 3' R: 5'- CTGTTGCTGTAGCCAAATTCG - 3'

O ensaio de *Real-Time* PCR foi realizado no aparelho 7500 Real-Time PCR System (PE - Applied Biosystems), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mário Hirata (Laboratório de Biologia Molecular / FCF-USP), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 1 minuto. Todos os experimentos utilizaram limiar (threshold) de 0.1.

Para padronização do ensaio de *Real-Time* PCR, isto é, determinar a diluição ideal das amostras e a concentração de *primer*, foi feito um pool com as amostras de um experimento, e com este pool foram feitas duas diluições. Para cada diluição foram testadas duas concentrações de primers dos sete genes de estudo. A padronização foi feita tanto para as culturas monocamada quanto para as culturas organotípicas.

Para análise da expressão gênica através de *Real-Time* PCR foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta C_t$) (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008). Calcula-se inicialmente o ΔC_t de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_t (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (GAPDH ou Tubulina) dos valores de C_t do gene alvo. Após determinação do ΔC_t da amostra, escolhe-se a amostra normalizadora. Para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ utiliza-se a fórmula seguinte: [ΔC_t (amostra) – ΔC_t (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_t$, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que resulta no valor da expressão relativa.

Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$, foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto foram feitas curvas com diluições seriadas dos pools de cDNAs para cada um dos genes estudados, partindo dos cDNAs diluídos 1:3. Para comparar a eficiência de amplificação dos dois genes, subtraem-se os valores de C_t do gene alvo dos valores de C_t do gene controle. A diferença foi plotada contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (*slope*), for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se assim utilizar este método. Após padronização e validação do método, foram realizados os ensaios de real-time PCR em triplicatas biológicas com duplicatas dos poços para cada gene estudado. Como controle negativo utilizamos poços sem amostra (NTC = No Template Control), mas com o par de primers e o mix de SYBR Green.

3.5) Zimografia

O ensaio de zimografia visa avaliar a atividade de gelatinases (MMP-2 e MMP-9), em suas formas pro e ativa. Após a padronização do ensaio (Oh et al, 2001; Kato et al, 2002, Sheu et al, 2003) este foi utilizado em amostras de sobrenadante de culturas em monocamada e em amostras de proteína total de culturas organotípicas.

3.5.1) Obtenção do sobrenadante das culturas em monocamada

Para o ensaio de zimografia, as culturas monocamada dos queratinócitos transduzidos com os vetores retrovirais foram mantidas de acordo com o item 3.3.2.1. Após as 60 horas de cultivo, na ausência e presença de TNF, o meio de cultura foi retirado e centrifugado 2 vezes a 800 rpm por 5 minutos a 4°C para não degradar as proteínas. Quantificamos as proteínas do meio de cultura através do método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951). Antes da coleta, foram tiradas fotos das culturas no microscópio Olympus IX70 DP30BW utilizando o programa DP Manager (3.1.1.208).

Como controle de reação, usamos o sobrenadante de células HT1080, linhagem que secreta MMPs no meio de cultura (Oh et al., 2001). Esta linhagem foi submetida ao carenciamento com DMEM+ 0,1% BSA (bovine serum albumin – Factor V, Sigma, St Louis, MO, USA) por 72 horas, em condições ideais de cultura. Após o carenciamento e verificação da viabilidade celular, o meio de cultura foi retirado e processado como descrito acima.

3.5.2) Obtenção das proteínas de *Rafts*

Para o ensaio de zimografia, foram utilizados extratos protéicos totais, uma vez que os *rafts* se diferenciam na interface ar-meio, não produzindo portanto sobrenadante. A camada de células epidérmicas foi separada da matriz de colágeno (equivalente dérmico) e ambas foram colocadas separadamente em um microtubo (1,5ml) e congeladas em banho de gelo seco com etanol. Em seguida, foram adicionados 150 µl de tampão de lise RIPA modificado (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA) (Partridge et al., 2007) na presença de inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail tables-Roche, Mannheim, Germany) e inibidores de fosfatase (100mM Fluoreto de Na, 10mM Ortovanadato de Na, 60mM Pirofosfato de Na e 175mM β-glicerofosfato) e tanto a camada epidérmica quanto o equivalente dérmico foram homogeneizados por maceração. Após

centrifugação por 15 minutos, 15000rpm a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

3.5.3) Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina

Para separação foi feito gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida e 5mg/ml de gelatina. Colocamos em cada gel 10µg de sobrenadante de cada cultura monocamada e 15µg de extrato protéico total (Sheu et al., 2003) de cada *raft* + tampão de amostra 4X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%) em condição não desnaturante em cada canaleta. Como controle da atividade de MMPs, utilizamos 10µg de sobrenadante de HT1080 (fibrosarcoma) a qual secreta as formas Pró-MMP-9, Pró-MMP-2 e MMP-2 intermediária e MMP-2 ativa (Oh et al., 2001), ou 2µl de padrão de MMPs Recombinante (Gelatinase Zymography Standards Human MMP-2 and MMP-9 – Chemicon - CC073) em cada gel. O padrão recombinante mostra as formas pró e ativas das MMP-9 e MMP-2. A corrida foi feita a 60V/ 30min durante o gel de empilhamento e a 80V / 2:30h durante o gel de separação, na presença do tampão de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 0.2 M, SDS 0,1% , pH 8.3).

3.5.4) Incubação e revelação do gel

Após corrida o gel foi lavado 2x com 2,5% Triton X-100, 15' TA cada lavagem para retirar o SDS. Em seguida o gel foi lavado com Tampão de Incubação (0,05M TrisHCl pH 8/ 10mM CaCl₂/ 1µM ZnCl₂) e incubado com o mesmo por 17 horas a 37°C em banho-maria em recipiente fechado. Como controle da atividade das MMPs, canaletas do gel foram cortadas e incubadas na presença de 400mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) ou na presença de 1mM de Ilomastat (GM6001, Chemicon, Temecula, CA), um inibidor específico de gelatinases e collagenases. O gel foi corado com 0,5% Coomassie brilliant blue R-250 e descorado com solução 10% metanol/ 10% ácido acético glacial, e em seguida digitalizado utilizando o equipamento MiniBis Pro e o programa Gel Capture (DNR Bio-Imaging systems, Jerusalem, Israel), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sandro Rogerio de Almeida (Depto. de Análises Clínicas, FCF-USP/SP). A intensidade das bandas foi analisada pelo programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA – <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.6) Western blot

3.6.1) Obtenção dos extratos protéicos

A obtenção dos sobrenadantes das culturas monocamada foi feita de acordo com o item 3.5.1, e a obtenção dos extratos protéicos da camada epidérmica e do equivalente dérmico foi feita de acordo com item 3.5.2.

Para a obtenção das proteínas das culturas monocamada, as células foram mantidas de acordo com o item 3.3.2.1. Após 60 horas de cultivo, na ausência e presença de TNF, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e em seguida foram adicionados 150 µl de tampão de lise RIPA modificado (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA) (Partridge et al., 2007) na presença de inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail tables-Roche, Mannheim, Germany) e inibidores de fosfatase (100mM Fluoreto de Na, 10mM Ortovanadato de Na, 60mM Pirofosfato de Na e 175mM β-glicerofosfato). Após centrifugação por 15 minutos, 15000rpm a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

3.6.2) Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e Transferência para membrana

Para separação foram feitos géis de SDS-PAGE com 8% e 10% de acrilamida. Em cada canaleta foram colocados 35µg ou 25µg de extrato protéico total de cada amostra (monocamada ou *Raft*) acrescida de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50mM) aquecido à 95°C por 10' (condições desnaturantes) e 10µl de marcador de peso molecular Rainbow (RPN800V, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) ou Precision Plus Protein Dual Color Standards (#161-0374, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) em cada gel. Para a membrana que seria incubada com anti-MMP-9, as proteínas foram colocadas em condições não-desnaturantes (sem aquecimento e sem tratamento com DTT), segundo recomendação do fabricante, uma vez que o sítio de ligação deste anticorpo situa-se nas pontes dissulfeto. A corrida foi feita à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e à 100V / 1:30h durante o gel de separação, na presença do tampão de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 0,2 M, SDS 0,1% , pH 8.3) .

Em seguida foi realizada a transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech,

NJ, USA) à 4°C / 240mA / 1:40h, na presença do tampão de transferência (Tris base 25 mM, Glicina 0,2 M (pH 8.3), metanol 20%). Em seguida, membrana foi corada com solução de Ponceau (Xylidine Ponceau, Merck, Germany) diluído em 0,1% de ácido acético para verificar se a transferência das proteínas ocorreu corretamente.

3.6.3) Incubação com anticorpos primários e secundários

Para o bloqueio de todas as membranas foi utilizada a solução de PBS-T 0,02% (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,02%) com 5% de leite (sem gordura), durante 1 hora à temperatura ambiente (TA). Para todos os anticorpos foi utilizado, como controle endógeno de proteína o anticorpo anti-tubulina ou o anticorpo anti-actina, diluídos 1:5000 em PBS-T 0,02%. Abaixo seguem na tabela 2 os anticorpos utilizados que foram incubados na presença da solução de bloqueio, *overnight* à 4°C. Após 4 lavagens de 10' cada com PBS-T 0,02%, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo (Affini-Pure goat anti-mouse IgG (H+L), 115-035-062, Jackson ImmunoResearch Labs, UK ou ECL anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific [from sheep] NA 931V, GEHealthcare, UK) ou secundário anti-coelho (Monoclonal mouse anti-rabbit IgG, 211-032-171, clone 5A6-1D10, Jackson ImmunoResearch Labs, UK ou ECL anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific [from donkey] NA 934V, GEHealthcare, UK) diluídos 1:2000 ou 1:5000 (quando o anticorpo primário utilizado foi tubulina ou actina) em PBS-T 0,02% durante 1 hora à TA.

Tabela 2: Anticorpos utilizados nos ensaios de Western blotting.

Proteína e Peso Molecular	Anticorpos utilizados para Western blot (WB) e diluição
MMP-2 - 72KDa (pró-forma), 66KDa (forma intermediária) e 62KDa (forma ativa)	MAB 3308 (Chemicon; Temecula, CA, USA) / 1:1000
MMP-9 - 92KDa (pró-forma) e 82KDa (forma ativa)	MAB13415 (Chemicon; Temecula, CA, USA) / 1:100
MT1-MMP - 63 e 60 KDa na pró-forma e 42KDa na forma fragmentada	AB8345 (Chemicon; Temecula, CA, USA) / 1:250
TIMP-2- 21-28 KDa	Ab-4/MABT2-NIC3(Calbiochem,USA)/1:100

RECK 110KDa	611512 (BD Biosciences; San Jose, CA, USA) 1:250
p53 - 53KDa	NCL-p53-DO1 (Novocastra Inc.)/1:500
pRb- 110KDa	#9309 (4H1) (Cell Signaling Technology) / 1:1000
FAK - 125KDa	AHO1272 (Biosource Inc.)/ 1:1000
Phospho-FAK 125KDa	44625G/ (Tyr 397 clone 141-9) (Biosource Inc.)/ 1:1000
α -Tubulina - 50KDa	t5168 (Sigma, St Louis, MO, USA) / 1:5000
β -Actina - 42KDa	a5441 (Sigma, St Louis, MO, USA) / 1:5000

Após incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 4 vezes, 10' cada, com PBS-T 0,02%, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) e expostas ao filme (Amersham Hyperfilm ECL). Em seguida, as membranas foram re-incubadas com os anticorpos dos controles internos, Tubulina ou β -Actina.

3.7) Ensaio atividade MMP-2 e MMP-9

O ensaio de atividade de MMP-2 e MMP-9 visa quantificar a atividade total (formas pro e ativas) destas MMPs. Para a realização deste foi utilizado o Sistema de Ensaio de Atividade Biotrak para MMP-2 e MMP-9 (MMP-2 Biotrak Activity Assay RPN 2631 e MMP-9 Biotrak Activity Assay RPN2634, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) em amostras sobrenadantes de culturas monocamadas de QPHs transduzidos com os vetores pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7. Como controles foram utilizados sobrenadantes de culturas de HT1080 e de fibroblastos humano (controle positivo e negativo, respectivamente, para atividade de MMP-9) e amostra de proteína total placenta humana (controle positivo da atividade de MMP-2), gentilmente cedida pela Dra Silvana Sandri, Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF/USP.

O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante da seguinte forma: em cada poço foram adicionados 100ug de proteína total dos sobrenadantes das culturas em monocamada nas placas dos ensaios Biotrak que possuem anticorpos anti-MMP-2 ou anti-MMP-9 aderidos. Incuba-se esta reação *overnight* à 4°C e após lavagens, em seguida foi adicionado APMA (acetato de P-aminofenilmercúrio), um indutor de atividade de

MMPs, a fim de ativar as pro-MMPs presentes no sobrenadante. Após 1.5 horas de incubação à 37°C, foi adicionado o Reagente de Detecção, o qual contém um peptídeo cromogênico que será utilizado como substrato da reação. As placas foram lidas em espectrofotômetro (405nm) nos tempos de 0, 1, 2 e 3 horas. A curva padrão de MMP-2 detecta entre 0.75 -12ng/ml e a de MMP-9 entre 0.125 – 16ng/ml. Para cada placa foram realizados ensaios em quadruplicata biológica.

3.8) Ensaio de ELISA para TIMP-2

O ensaio de ELISA para TIMP-2 visa quantificar esta TIMP em amostras de sobrenadantes de células. Para a realização deste foi utilizado o Sistema Elisa de Atividade Biotrak para TIMP-2 (TIMP-2, Human, Biotrak ELISA System RPN 2618, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) em amostras de sobrenadantes de culturas em monocamadas de QPHs transduzidos com os vetores pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7. Como controle positivo foi utilizada amostra de proteína total placenta humana, gentilmente cedida pela Dra Silvana Sandri, Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF/USP.

O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante: em cada poço da placa do ensaio Biotrak que possuem anticorpos anti-TIMP-2 aderidos, foram adicionados 100ug de proteína total dos sobrenadantes das culturas monocamadas conjuntamente com o conjugado de peroxidase e incubado por 2 horas à 25°C. Após lavagens, foi adicionado o substrato “TMB” e incubado por 30 minutos à 25°C, e a após este período parou-se a reação adicionando 1M de ácido sulfúrico e foi feita a leitura em espectrofotômetro em 450nm. A curva padrão de TIMP-2 detecta entre 8 -128ng/ml. Para esta placa foram realizados ensaios em quadruplicata biológica.

3.9) Atividade gelatinolítica utilizando DQ™ gelatina

O ensaio de atividade gelatinolítica utiliza a DQ™ gelatina (D-12054 - DQ™ gelatin from pig skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA), a qual consiste em uma gelatina conjugada com fluoresceína. Quando a gelatina é degradada, ela libera uma fluorescência que é proporcional a atividade proteolítica. Essa fluorescência é detectada através de um luminômetro, sendo o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 485+/- 15nm e o de emissão (λ_{em}) 530+/-15nm. A DQ™ gelatina utilizada neste

experimento foi gentilmente doada pela Profa. Dra. Raquel F. Gerlach da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.9.1) Reação de atividade das gelatinases e imunolocalização de RECK

Para a análise da atividade das gelatinases, 5×10^4 células de cada cultura monocamada de queratinócitos infectados com os oncogenes E6wt, E7wt e E6E7, bem como o vetor vazio pLXSN, foram plaqueadas em lamínulas de vidro estéreis (13mm circular, Glasscyto) pré-tratadas com uma solução de gelatina 1% contendo DQ gelatina diluída 1:20 ($0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Morioka et al., 2009). As células foram cultivadas em KSFM ou KSFM contendo $25 \mu\text{M}$ de Ilomastat (GM6001) para controle da atividade de metaloproteínases. Como controle negativo da reação, as células foram cultivadas em lamínulas recobertas apenas com a solução de 1% de gelatina.

Após 20 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado para quantificação da gelatina solubilizada em um luminômetro (Victor Light Luminescence Counter, Perkin Elmer, MA, USA. $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 535\text{nm}$). Para análise da localização e intensidade do material fluorescente (gelatina clivada), as lamínulas contendo as células foram lavadas em 2x com PBS 1X (5' cada), fixadas em paraformaldeído 4% por 10', seguido de 3 lavagens com PBS 1X e uma lavagem em PBS+Triton X-100 0,2% por 5' cada. Logo após, as células foram incubadas por 1 hora (TA no escuro) com a solução de PBS+1%BSA contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) diluído 1:1000 ($1\text{ng}/\mu\text{l}$), lavadas 3 vezes em PBS 1X e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando a solução de montagem Fluorescence Mounting Medium (S3023, DAKO, CA, USA), para manutenção da fluorescência. As células foram fotografadas no aumento 400X.

Para a reação de imunolocalização, foram utilizadas células cultivadas na ausência do substrato de gelatina. Após a lavagem com a solução de PBS+Triton X-100 0,2%, por 5', foi adicionada as células a solução de bloqueio (PBS+5%BSA) por 30' a TA, e em seguida as células foram incubadas por 1 hora a TA em câmara úmida no escuro com a solução de bloqueio contendo o anticorpo anti-RECK (611512, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), diluído 1:50. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes em PBS 1X (5' cada lavagem) e incubadas por 1 hora (TA, câmara úmida no escuro) com anticorpo secundário

fluorescente Alexa flúor 488 (A-11001, anti-mouse, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), diluído 1:200 na solução de bloqueio, lavadas 2 vezes em PBS 1X (5' cada) e na terceira lavagem, incubadas com DAPI (1:1000 / 1ng/ μ l), diluído em PBS 1X) por 5' e por fim montadas em lâminas utilizando a solução de montagem ProLong Antifade Kir (P7481, Molecular Probes, CA, USA). As lamínulas foram fotografadas no aumento 1000x. Para ambos ensaios foi utilizado o microscópio óptico de fluorescência Nikon Eclipse S100, usando o programa Metamorph (6.0, Molecular Devices, PA, USA) (DAPI: 100ms e Alexa 488/verde: 600ms), gentilmente cedido pela Dra Bettina Malnic do Departamento de Bioquímica, IQ/USP. Como controle foram feitas lâminas apenas o anticorpo secundário Alexa 488.

3.10) Ensaio de Ferida

O ensaio de ferida ("scratch assay") foi realizado de acordo com Liang e cols. (2007). Foram plaqueadas 2.10^5 células de QPHs transduzidos com o vetores pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7 em placas de 6 poços, e após atingirem confluência entre 95-100%, foi feita uma "ferida" no centro do poço, utilizando ponteira de 1000 μ l. As células foram lavadas duas vezes com PBS antes do meio de cultura (KSFM) ser re-adicionado. Foram tiradas fotos das culturas no tempo de 0, 6, 8, 10 e 12 horas após a "ferida", utilizando o microscópio Olympus IX70 DP30BW utilizando o programa DP Manager (3.1.1.208), aumento de 40x, a fim avaliar a motilidade celular.

3.11) Imunohistoquímica

3.11.1) Obtenção das amostras

Após 9-11 dias na interface ar-meio as culturas organotípicas foram lavadas com PBS pH 7,4, fixadas por 45 minutos em formalina tamponada 4%, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo em secções de 4 μ m. Para verificar a integridade do material, foram feitas colorações H/E.

As secções obtidas a partir das culturas organotípicas foram desparafinizadas por incubação a 55°C *overnight* em estufa, seguida de duas lavagens de 15 minutos com xilol, três lavagens de 30 segundos com etanol 100%, e lavagens sucessivas de 1 minuto em etanol 95%, etanol 70%, etanol 50% e água destilada (2X). Em seguida foi realizada a

recuperação antigênica incubando as secções em tampão citrato 10 mM (pH 6.0) a 95°C por 5 minutos utilizando panela à vapor. Após resfriamento e lavagem em água destilada, as secções foram incubadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em água destilada para bloquear a peroxidase endógena. Posteriormente, as secções foram incubadas em câmara úmida com uma solução de BSA (Bovine Serum Albumin –Factor V, Sigma, MO, USA) 2% em PBS por 1 hora a 37 °C, a fim de bloquear os antígenos inespecíficos. Para os anticorpos anti- reck, anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-MMP-14 não foi utilizado o bloqueio com BSA.

3.11.2) Incubação com anticorpos primários e secundários

Os anticorpos primários foram diluídos na solução de BSA 2% em PBS, aplicados 50µl por secção e incubados overnight em câmara úmida, a 4°C. A tabela 3 mostra os anticorpos utilizados bem como a diluição. Como controle da reação, foram utilizadas amostras de placenta humana (gentilmente cedidas pela Dra. Silvana Sandri, FCF/USP), e amostra de pele humana (gentilmente cedidas pelo Dr Gilles Landman, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, SP).

Tabela 3: Anticorpos utilizados nos ensaios de Imunohistoquímica

Proteína /Tecido controle	Anticorpos utilizados para Imunohistoquímica/ Diluição
MMP-2	[CA-4001/CA719E3C]/ab3158-500 (Abcam, MA, USA) / 1:50
MMP-9	MAB56-2A4/ab58803-100(Abcam) / 1:100
MMP-14	[EP1264Y]/ab51074-100(Abcam) / 1:50
RECK	611512 (BD Biosciences) / 1:100
Citoqueratina 10	[VIK-10]/ab1421 (Abcam) / 1:300
Citoqueratina 14	[LL002]/ab7800(Abcam) / 1:300
Involucrina	Ab27495(Abcam) / 1:1000
Colágeno IV	Clone CIV94/18-0128 (Invitrogen) / 1:50

Após incubação, as secções foram lavadas três vezes, por 5', com PBS e incubadas em câmara úmida com o kit de anticorpo secundário Kit LSAB+ System-HRP –K0690 (DAKO Cytomation). Primeiramente, as secções foi incubadas com a solução “amarela - BIOTINYLATED LINK UNIVERSAL” que contém imunoglobulinas biotiniladas anti-coelho, anti-camundongo e anti-cabra, por 30' à 37°C, lavadas três vezes com PBS (5' cada lavagem) e, em seguida, incubadas com a solução “vermelha - STREPTAVIDIN-HRP” que contém estreptavidina conjugada com peroxidase, por 30' à 37°C. As secções foram lavadas como descrito anteriormente e em seguida foi colocada a solução de Diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation Liquid DAB+substrate Chromogrn System Kit, K-3467, Dako North America, CA, USA) à 37°C por 5' ou até o aparecimento do precipitado castanho-dourado.

Em seguida as secções foram lavadas por 3 minutos em água destilada, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e desidratadas para montagem com Entellan (Merck) e lamínulas. As lâminas foram fotografadas em um microscópio óptico Nikon Optiphot, aumento 400x, utilizando o programa NIS Elements-AR. Como controles foram feitas lâminas apenas com o anticorpo secundário correspondente.

3.12) Análise estatística

Os dados foram expressos em média e erro padrão relativo. Para análise dos dados foi aplicado o teste de variância One-Way Anova seguido do teste de múltiplas comparações (Teste de Tukey). Para análise de expressão gênica relativa foi aplicado o Teste-t em cada par de condições. Para as análises foram utilizados os programas Origin 7.0 (OriginLab Corporation- Northampton, MA, USA) ou GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A significância estatística foi considerada como $P^* < 0.05$.

4) RESULTADOS

PARTE A - Resultados das Culturas em Monocamada

Os queratinócitos primários humanos (QPHs) transduzidos com os vetores pLXSN (controle), E6wt, E7wt ou E6E7 foram cultivados na presença e ausência de TNF. A fim de caracterizarmos os níveis protéicos de p53 e pRb, alvos de E6 e E7, respectivamente, realizamos ensaios de western blot demonstrados na figura 27 do Apêndice A. Após a confirmação dos níveis protéicos reduzidos de p53 (nas amostras infectadas com E6 e E6E7) e pRb (nas amostras infectadas com E7 e E6E7) em relação as amostras controle, passamos então aos ensaios posteriores. Considerando o aspecto morfológico, entre os queratinócitos estudados, tratadas ou não com TNF, observamos na figura 5, uma morfologia poligonal (característica das células epiteliais), semelhante entre todas as células estudadas. Vemos algumas figuras de mitose e prolongamentos celulares, estes um pouco mais evidentes nas culturas tratadas com TNF.

Figura 5: Aspectos morfológicos dos QPHs infectados com os vetores virais pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7, observados em microscopia de contraste de fase, cultivados na ausência e presença de TNF. Notar que as células, tanto as transduzidas com o vetor controle pLXSN quanto as transduzidas com os oncogenes virais, apresentam morfologia semelhante, mesmo tratadas com TNF. Aumento de 100X.

4.1-A) Análise da expressão gênica de *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-2* e *RECK*

Após padronização e validação do método de análise (Figs. 28, 29 e 30; Tabela 4 nos Apêndices B e C) foram feitas as reações de *real-time* PCR para cada um dos cinco genes de interesse, bem como do gene constitutivamente expresso (*Tubulina*). Para cada gene foram feitas triplicatas biológicas com duplicatas de poços. Inicialmente, utilizamos como a amostra normalizadora a que continha apenas QPH, pois foi necessário avaliarmos se a presença do cassete retroviral afetaria a expressão gênica. Observamos que para todos os genes a presença do cassete viral pLXSN não apresentou diferenças significativas na expressão gênica em relação às culturas em monocamadas não transduzidas.

Passamos então a utilizar para todas as análises as amostras derivadas das culturas em monocamadas de QPHs transduzidas com pLXSN como nossos controles, uma vez que representam os mesmos procedimentos técnicos de cultura de células transduzidas por estes vetores contendo as partículas virais. Apresentamos aqui os dados para os queratinócitos transduzidos com pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7. A Fig 6 mostra a expressão gênica dos cinco genes de interesse: *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-2* e *RECK*.

Figura 6: Perfil de expressão gênica de *MMP-2* (A), *MMP-9*(B), *MT1-MMP*(C), *TIMP-2*(D) e *RECK* (E) em relação à *tubulina* analisada através da técnica de *real-time* PCR. Amostras foram normalizadas por pLXSN sem tratamento com TNF- α . Amostras de culturas em monocamada. * $P < 0.05$. Podemos observar que na presença do oncogene E7wt e E6E7 em conjunto, há uma diminuição da expressão gênica de *MMP-2* e *TIMP-2*, independente da presença do TNF. Além disso, o tratamento com TNF induziu a expressão de *MMP-9* e *TIMP-2*, mesmo nas células infectadas com vetor controle.

Ao analisarmos a expressão de *MMP-2*, observamos que as amostras que expressam os oncogenes E7wt e E6E7 apresentaram uma diminuição na expressão de *MMP-2* em relação ao controle ($P < 0.05$) (Fig.6A). Ao compararmos a expressão desta *MMP* somente entre as amostras tratadas com TNF, observamos o mesmo perfil de expressão das amostras não tratadas, isto é, a diminuição de *MMP-2* nas culturas que

expressam os oncogenes E7wt e E6E7 em relação ao controle ($P < 0.05$). Ao avaliarmos se o tratamento com TNF influenciava a expressão de *MMP-2*, não observamos diferenças estatísticas entre as amostras tratadas e as não tratadas, sugerindo que o TNF não está relacionado com a regulação gênica de *MMP-2*.

Os resultados da expressão gênica de *MMP-9* mostraram que não foram observadas diferenças significativas na expressão desta *MMP* entre as amostras transduzidas com os oncogenes virais em relação ao controle (Fig. 6B), independentemente ao tratamento com TNF. Estes dados sugerem que a presença das oncoproteínas deste estudo não atue na expressão gênica de *MMP-9*. No entanto, observamos que após o tratamento com TNF esta citocina aumentou muito a expressão gênica de *MMP-9* em relação à amostra não tratada, para todas as amostras estudadas ($P < 0.05$).

A análise da expressão gênica de *MT1-MMP* mostrou que a presença dos oncogenes virais nas culturas em monocamada não modificou a expressão desta *MMP* nas amostras em relação ao controle, tanto nas amostras tratadas ou não com TNF (Fig 6C).

Ao analisarmos o inibidor de MMPs, RECK, observamos que não houve diferenças na expressão gênica de *RECK* comparando-se as culturas transduzidas com os oncogenes virais em relação ao controle, tanto para as culturas tratadas ou não com TNF (Fig. 6D). Ao compararmos as amostras frente ao tratamento com TNF, observamos que esta citocina não modula a expressão gênica de *RECK* (Fig. 6D).

Para outro inibidor de MMPs investigado, TIMP-2, foi observada uma diminuição da expressão gênica de *TIMP-2* na presença de E7wt e E6E7 ($P < 0.05$) (Fig. 6E), sendo o mesmo perfil observado nas amostras não tratadas. Ao analisarmos o efeito do tratamento com TNF, normalizando todas as amostras por pLXSN sem tratamento, observamos um aumento da expressão de *TIMP-2* em todas as culturas, com exceção para E6E7 ($P < 0.05$) (Fig. 6E).

4.2-A) Análise dos níveis protéicos das MMPs e RECK

Para determinar os níveis das proteínas MMPs -2, -9 e -14 e de RECK e TIMP-2, utilizamos o ensaio de western blot. Uma vez que não houve diferenças na expressão entre as culturas em monocamada normais ou transduzidas com cassete viral vazio, apenas são apresentados os resultados obtidos utilizando o vetor pLXSN.

Os resultados da expressão de TIMP-2 não serão apresentados uma vez que não houve detecção de sinal para esta proteína em nenhuma das replicatas estudadas.

A figura 7 mostra os níveis protéicos das MMP-2, MM-9 e MT1-MMP nos QPHs infectados com os oncogenes virais pLXSN, E6wt, E7wt, E6E7.

Figura 7: Determinação dos níveis protéicos de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP por western blot em amostras de QPHs infectados. A: MMP-2, B: MMP-9, C: MT1-MMP. A proteína total de HT1080 foi utilizada como controle positivo para todas as MMPs estudadas. A β -actina foi utilizada como controle de quantidade protéica. Observar que os níveis protéicos destas MMPs não estão alterados nos QPHs infectados com os oncogenes virais.

A MMP-2 é uma metaloproteinase que é secretada na forma inativa (zimógeno ou pró-forma), sendo ativada extracelularmente por um complexo ternário composto de uma molécula de MMP-2 ativa, uma de MT1-MMP e uma de TIMP-2 (Rhee e Coussens, 2002). Na fig. 7A, observamos um tênue sinal para a forma pró-MMP-2 (72KDA) em todas as culturas de queratinócitos, entretanto, mesmo considerando os níveis protéicos são quase indetectáveis, podemos observar um menor sinal protéico para esta MMP nas culturas que expressam E7wt e E6E7.

A MMP-9 é uma metaloproteinase secretada na forma de zimógeno (pró-forma 92KDA) sendo ativada extracelularmente por outras MMPs ativas, entre elas a MMP-2 (Toth et al., 2003). O anticorpo utilizado detecta, de acordo com o fabricante, as formas pró e ativa (82KDA) desta MMP. De acordo com a Fig. 7B, observamos os níveis protéicos da forma ativa de MMP-9 em todas as culturas primárias infectadas, sem apresentar diferenças significativas entre os QPHs infectados e o controle.

A MT1-MMP é uma metaloproteinase transmembrana, a qual é ativada intracelularmente por serinas-proteases do tipo “furin-like” antes de ser exposta na superfície celular (Sternlicht e Werb, 2001). O anticorpo anti-MT1-MMP detecta duas pró-formas, 63 e 60 kDa e uma forma fragmentada de 42kDa. Observamos na fig. 7C apenas a pró-forma de 60KDA, para todas as amostras, sendo que não foram observadas diferenças na expressão de MT1-MMP entre elas. Os resultados sugerem que a presença das oncoproteínas virais E6 e E7 não modula os níveis protéicos de MT1-MMP.

É interessante notar que, na ausência de tratamento com TNF, observamos o mesmo perfil de expressão gênica e de níveis protéicos para todas as MMPs, reforçando os dados observados.

A proteína RECK foi descrita com um inibidor da secreção e atividade de MMP- 2, MMP-9 e MT1-MMP (Oh et al, 2001), além disso, RECK regula negativamente a transcrição de MMP-9 (Takagi et al., 2009).

Ao analisarmos os níveis protéicos de RECK, observamos na fig. 8A, um menor sinal protéico nas amostras com E7wt e E6E7 ($P<0.05$) em relação ao controle pLXSN. Além disso, novamente podemos observar na fig. 8B que todos os QPHs infectados apresentam níveis protéicos semelhantes de MMP-9.

Ao analisarmos se o tratamento com TNF estaria modulando os níveis protéicos de RECK e MMP-9, observamos na fig 8A novamente uma menor sinal desta proteína, mais

evidente nas amostras de QPHs infectados com E6E7 em relação ao controle pLXSN. Para MMP-9, podemos ver na fig. 8B, que o tratamento induz os níveis protéicos desta MMP, principalmente em E6wt, uma vez que foi possível detectar o sinal da forma Pro-MMP-9 em todos os QPHs estudados, independente da presença das oncoproteínas virais.

Em conjunto, os dados sugerem que a presença da oncoproteína viral E7, isolada ou conjuntamente com E6, modula negativamente os níveis protéicos de RECK, nas células tratadas ou não com TNF. Além disso, o tratamento com TNF modula os níveis protéicos de MMP-9, independente da presença das oncoproteínas virais E6 e E7.

Figura 8: Determinação dos níveis protéicos de RECK e MMP-9 por western blot em amostras de culturas em monocamada sem e com tratamento com TNF. **A:** RECK: foi utilizada como controle positivo para RECK. **B:** MMP-9. Como controles foram utilizados proteína total de FF273 (fibroblasto humano) para RECK e de HT1080 para MMP-9. Observar que os níveis protéicos de RECK estão diminuídos nos QPHs infectados com E7 e E6E7 em relação ao controle pLXSN, mesmo quando tratadas com TNF. Para MMP-9, podemos ver que o tratamento com TNF induz os níveis protéicos desta MMP. β -actina foi utilizada como controle de quantidade protéica.

O ensaio de imunocitoquímica para de RECK nos queratinócitos que expressam E6 e/ou E7 mostrou que há uma menor intensidade de sinal para esta proteína nos QPHs que expressam E7wt e E6E7 em relação aos que expressam E6wt e ao controle pLXSN (Fig. 9). Os três campos representados mostram uma marcação citoplasmática de RECK em todas as culturas, e uma tênue marcação de membrana para E7wt e E6E7. Os dados estão de acordo com os apresentados anteriormente, sugerindo que a proteína RECK possui menos intensidade de marcação celular e re-localização na presença de E7wt e E6E7.

Figura 9: Detecção da proteína RECK através de ensaio de imunocitoquímica em QPHs infectados com pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7. Coloração em verde: RECK (Alexa 488) e em azul: Núcleo (DAPI). Podemos observar a marcação citoplasmática para RECK com menor intensidade nos QPHs infectados com E7wt e E6E7 em relação ao controle pLXSN e a E6wt. São apresentados três campos de cada cultura. No primeiro campo de pLXSN, podemos está representado o controle da reação, somente com anticorpo secundário Alexa 488. Aumento de 1000x.

Dados anteriores do grupo (da Silva Cardeal et al., 2006) mostraram que as linhagens HPV16 positivas (SiHa e CaSki) possuem uma maior expressão gênica de *MMPs* em relação à linhagem HPV negativa C33A, e que a expressão de *RECK* é muito baixa nas linhagens de carcinoma cervical estudadas. A fim de analisarmos os níveis protéicos das *MMPs* e de *RECK* nas linhagens de carcinoma cervical, SiHa, CaSki e C33A, foram realizados ensaios de western blot. Podemos observar na fig. 10A que as linhagens tumorais apresentam as três formas de MMP-2, sendo a forma ativa mais evidente. Além disso, vemos que as linhagem SiHa e CaSki (HPV 16 positivas) apresentam uma maiores níveis protéicos desta isoforma em relação a C33A (HPV negativa).

Ao compararmos a expressão de MMP-2 entre as linhagens tumorais e os queratinócitos infectados (Fig. 7A), observamos uma maior expressão desta *MMP* nas linhagens, dado esperado, uma vez que as linhagens são derivadas de carcinomas cervicais. Observamos também que linhagens SiHa e C33A possuem, respectivamente, um maior e menor nível protéico de MMP-9 entre as linhagens tumorais estudadas (Fig. 10B). Além disso, as linhagens de carcinoma cervical apresentaram baixos níveis protéicos para *RECK* (Fig. 10C), sem diferenças significativas entre elas. O baixo sinal de *RECK* nas linhagens tumorais é semelhante à encontrada no QPHs infectados com E7wt e E6E7. Os maiores níveis protéicos de MMP-2 e MMP-9 em SiHa e CaSki e os baixos níveis de *RECK* apóiam os dados apresentados anteriormente pelo nosso grupo.

Figura 10: Determinação dos níveis protéicos de MMP-2, MMP-9 e RECK por western blot em amostras linhagens de carcinoma cervical humano. A: MMP-2, B: MMP-9, C: RECK. A β -actina foi utilizada como controle de quantidade protéica.

4.3-A) Quantificação de TIMP-2 em culturas em monocamada que expressam as oncoproteínas virais E6 e/ou E7 de HPV16

Os níveis de TIMP-2 foram quantificados através do ensaio de ELISA, utilizando o sobrenadante das culturas em monocamadas dos QPHs infectados com pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7, uma vez que esta proteína é secretada pelas células.

Observamos que os queratinócitos infectados com E6E7 apresentaram uma menor quantidade de TIMP-2 em relação ao controle pLXSN ($P < 0.05$) (Fig.11), e uma tendência de diminuição de TIMP-2 na presença das oncoproteínas virais E6wt e E7wt em relação ao controle, sugerindo que a ação conjunta de E6E7 está atuando na regulação deste inibidor. Estes dados se assemelham aos encontrados para expressão gênica de TIMP-2 através de *real-time* PCR.

Figura 11: Quantificação de TIMP-2 através do ensaio de Elisa, em culturas de QPHs infectados com os vetores pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7. Como controle positivo da reação, foi utilizada amostra de placenta humana, de acordo com as recomendações do fabricante. Podemos observar a diminuição de TIMP-2 nas culturas que expressam E6E7. $P < 0.05$ (*).

4.4-A) Atividade das MMP-2 e MMP-9

O ensaio de zimografia na presença de gelatina mostra a atividade das formas pró (zimógeno) e ativas das MMP-2 e -9 (gelatinases A e B respectivamente). Uma vez que este ensaio avalia qualitativamente a atividade das MMPs, utilizamos conjuntamente o ensaio de Biotrak, o qual quantifica as MMPs em sua forma total (Pro+MMPs ativas). Desta forma, avaliamos se a presença dos oncogenes virais e, posteriormente o tratamento com TNF, afetariam a atividade das mesmas.

Os resultados de zimografia mostraram que todas as amostras apresentam atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9, através de suas Pró-formas (72kDa e 92kDa), respectivamente, e que a atividade de MMP-9 é maior que a de MMP-2 em todas as condições (Fig.12 A). Como controle de atividade foi utilizado o sobrenadante da linhagem HT1080 (fibrosarcoma humano), a qual secreta as formas Pro-MMP-9, Pro-MMP-2 e MMP-2 intermediária (Oh et al., 2001). Como controle da atividade gelatinolítica, uma canaleta do gel contendo a amostra de sobrenadante da cultura monocamada de E6E7 foi incubada na presença de EDTA, mostrando a inibição da atividade de MMPs devido à ação do agente quelante.

Ao quantificarmos a atividade de MMP-9 (Fig. 12B), vemos que as culturas que expressam E6wt apresentam maior atividade desta MMP em relação ao controle pLXSN ($P<0.05$), mas que no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as culturas com pLXSN e as culturas que expressam E7wt ou E6E7.

A quantificação da atividade de MMP-2 total (Fig. 12C) mostrou que, apesar desta MMP ser detectada em todas as culturas, sua atividade não é modulada pelos oncogenes virais E6 e/ou E7, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de atividade entre QPHs que expressam os oncogenes e o controle. Como controle da reação foi utilizada placenta humana, de acordo com as recomendações do fabricante.

Figura 12: Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9. A: Zimografia utilizando sobrenadante das culturas de QPHs infectados com os oncogenes E6 e/ou E7. As atividades das MMPs estão evidenciadas pelas bandas claras. Quantificação da atividade de MMP-9 (B) e de MMP-2 (C) utilizando ensaio Biotrak. As amostras foram normalizadas por pLXSN. Observar que na presença de E6wt há um aumento da atividade de MMP-9 em relação ao controle pLXSN, mas quando expressos conjuntamente, E6E7 não modulam a atividade de MMP-9 e MMP-2 em relação ao pLXSN.

Ao avaliarmos se o tratamento com TNF modularia a atividade das MMPs, observamos através do ensaio de zimografia (Fig. 13) que a atividade de Pro-MMP-9 foi induzida por esta citocina, em todas as culturas estudadas, independente da presença das oncoproteínas virais. A atividade de Pro-MMP-2 é menor que a de Pro-MMP-9, e não é modulada pelo TNF.

Figura 13: Ensaio de zimografia avaliando a atividade das MMP-2 e MMP-9 comparando-se as culturas tratadas ou não com TNF. Recomb.: MMPs -2 e -9 recombinantes. Observar o aumento de atividade de Pró-MMP-9 na presença de TNF em todas as culturas.

A fim de verificarmos a localização da ação proteolítica das MMPs nas culturas em monocamada, foram realizados ensaios utilizando a DQTM gelatina, a qual fluoresce quando degradada por gelatinases (MMP-2 e MMP-9). Após quantificarmos a gelatina solubilizada no sobrenadante dos queratinócitos e verificarmos o padrão de fluorescência entre as culturas, não observamos diferenças entre os QPHs infectados com os oncogenes virais em relação ao controle. Os resultados deste ensaio encontram-se no Apêndice D, figuras 31 e 32.

PARTE B - Resultados obtidos em ensaios de culturas organotípicas

4.1-B) Obtenção de culturas organotípicas (*rafts*) de queratinócitos primários humanos (QPHs) normais ou transduzidos com os genes de HPV 16 na ausência e presença de TNF- α

Para estudar os queratinócitos que expressam genes de HPV em um sistema capaz de reproduzir o ciclo de vida destas células foram utilizadas culturas organotípicas de QPHs normais ou transduzidas com retrovírus que expressam os genes E6, E7 ou seus mutantes de HPV 16. Além disso, foram utilizadas *rafts* de QPHs transduzidos com retrovírus sem gene de HPV (pLXSN) e *rafts* de QPHs sem transdução viral. Todos os *rafts* foram analisados na ausência e presença de TNF.

O sistema de cultura organotípica, estrutura semelhante ao tecido epitelial natural, é um modelo ideal para o estudo da história natural de células que contêm DNA do HPV uma vez que o ciclo de vida deste está associado ao programa de diferenciação dos epitélios e depende estritamente de fatores celulares que são expressos em diferentes etapas da diferenciação dos queratinócitos (Delvenne et al., 2001; Flores et al., 2001; revisado por Howley, 1996; zur Hausen, 1996). Este sistema de cultura permite a proliferação e a diferenciação celular, evidenciada pelo uso de marcadores, de maneira semelhante à observada nos epitélios escamosos conforme esquematizado na figura 14 (revisado por Chow e Broker, 1997).

Figura 14: Imagem de um corte transversal de uma cultura organotípica de QPH mostrando a correspondência com as diferentes camadas da epiderme e os marcadores de diferenciação do epitélio. Aumento 400x.

As culturas de QPHs normais e transduzidos com o vetor pLXSN vazio (Figs. 15A e 15B) apresentaram uma estrutura epitelial ordenada com um padrão característico de diferenciação nas camadas parabasais e suprabasais do epitélio. Nos *rafts* transduzidos com E6 (Fig. 15C) observou-se um discreto aumento da camada proliferativa e de transição e espinhosa, lembrando o processo de acantose (aumento da espessura da epiderme). As culturas que expressam mutante de E6 ($\Delta 9-13$), (Fig. 15D) que são incapazes de induzir a degradação de p53, apresentaram uma organização tissular semelhante à observada em *Rafts* derivados de QPHs normais.

Por outro lado, os *rafts* transduzidos com o gene E7 (Fig. 15E) apresentaram epitélio desordenado com presença variável de camada granular e córnea, e com células em proliferação no mesmo. Além disso, observou-se um alargamento da camada espinhosa e de transição. Mais ainda, foi observada a retenção de núcleos nas camadas mais superficiais. Os núcleos celulares eram maiores assim como a relação núcleo-citoplasma. Também se observou a presença de estruturas semelhantes a coilócitos e queratinização intraepitelial, que indicam a presença de infecção por HPV (Pinto e Collaço, 2001). Estas alterações são características das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) observadas *in vivo*. No entanto, nos *rafts* que expressam o mutante da proteína E7 (26G) (Fig. 15F), a qual é incapaz de transformar células de roedor e de induzir a degradação de pRb, também apresentaram uma organização tissular semelhante à observada em *rafts* derivados de QPHs normais.

Os *rafts* transduzidos com E6 e E7 (Fig. 15G) apresentam características semelhantes aos *rafts* com E7, como perda de polarização, desorganização arquitetural das camadas, hipercromasia nuclear, aumento do número de mitoses presentes também no terço superior do epitélio, figuras patognomônicas como coilocitose e queratinização intraepitelial, características de atipia severa

Figura 15: Imagens de cortes transversais de *rafts* de queratinócitos primários humano (QPH) na ausência de TNF. Coloração H/E. Notar as alterações morfológicas induzidas pelos genes virais E6 e/ou E7. As setas amarelas indicam as mitoses e as vermelhas as coilocitoses e queratinização intraepitelial. As pontas de setas pretas indicam a membrana basal. Aumento 400X.

Após o estudo das amostras de *rafts* sem tratamento, passamos a avaliar o efeito do TNF nas culturas organotípicas. O TNF é uma citocina pró-inflamatória que atua nas doenças inflamatórias e infecciosas, principalmente as virais. Possui um amplo espectro de atuação em relação às respostas celulares, além de estar relacionado a vários passos da tumorigênese incluindo transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (revisto por Aggarwal et al., 2006).

Foi possível observar que as amostras aqui tratadas com TNF também apresentaram alterações morfológicas do tecido epitelial produzida pela expressão das proteínas virais em comparação com a estrutura do tecido produzido pelos *rafts* normais.

Ao compararmos os *rafts* tratados ou não com TNF, observamos que os tratados com TNF apresentaram uma morfologia mais achatada nas células da camada basal, em relação aos *rafts* não tratados. Este achatamento foi mais evidente nos *rafts* derivados de queratinócitos transduzidos com vetor pLXSN vazio (Fig.16 A-A'), quando comparados àqueles QPHs transduzidos com o gene E6 selvagem (Fig. 16 B-B'). No entanto, este efeito não foi observado nas culturas organotípicas de QPHs que expressam a proteína E7 selvagem e que expressam E6E7 de (Fig. 16 C-C' e D-D').

Figura 16: Comparação de cortes transversais de *rafts* de queratinócitos primários humano (QPH) tratados ou não com 2nM de TNF- α . Coloração H/E. Notar o achatamento das células basais e granulosas na presença de TNF- α . As pontas de setas pretas indicam a membrana basal. As setas amarelas indicam mitoses e as setas vermelhas indicam coilocitoses e queratinização intraepitelial. Aumento 400X.

4.2-B) Caracterização dos marcadores de diferenciação do epitélio em culturas organotípicas (*rafts*).

Após a caracterização das alterações morfológicas induzidas pelos vetores virais nas culturas organotípicas, avaliamos se os oncogenes virais e o tratamento com TNF estariam alterando proteínas estruturais do epitélio nestas culturas, através da caracterização de alguns marcadores de diferenciação como a involucrina, a queratina 10 e a queratina 14.

Durante o processo de diferenciação do epitélio, os queratinócitos, que são o tipo celular predominante na estrutura da epiderme, iniciam a sua diferenciação como células tronco na camada basal movendo para camadas mais superiores na epiderme. Quando atingem estas camadas superiores, cessam sua divisão celular e passam por modificações morfológicas para formarem as camadas espinhosa, granular e corneificadas. As células da camada espinhosa são caracterizadas pela presença de desmossomos, enquanto as células da camada granulosa são distinguidas pela presença de grânulos de querato-hialina. A diferenciação das células granulosas resulta na formação da camada de transição, onde ocorre uma extensiva atividade enzimática, formando por fim a camada córnea onde os corneócitos, terminalmente diferenciados, estão ligados covalentemente (revisto por Eckert et al., 2004).

A involucrina é uma proteína que está ligada na forma “cross-linked” à camada córnea. Sua expressão se inicia na camada espinhosa, se mantendo na camada granular, e na camada de transição, a involucrina é incorporada através de uma transglutaminase à camada córnea (revisto por Eckert et al., 2004). Arafa et al., (2008) mostra através de análise TMA (Tissue microarray), para carcinoma cervical, que a involucrina está predominante marcada em tecidos bem diferenciados como ectocérvice, metaplasia madura e NICI, em relação a amostras de NICIII.

As queratinas são as proteínas de filamento intermediário típicas das células epiteliais. Elas são importantes na manutenção e integridade das células e dos tecidos epiteliais, além de estarem envolvidas em vias de sinalização como cicatrização e apoptose. As queratinas, como são chamadas as citoqueratinas, podem ser do tipo I (ácidas) ou tipo II (básicas ou neutras), divididas entre os tipos epiteliais, foliculares e de cabelo. As queratinas 10 e 14 deste estudo são do tipo I e epiteliais.

A queratina 14 (K14) e sua correspondente do tipo II a queratina 5(K5), são muito expressas nas células da camada basal indiferenciada que contem células tronco, sendo que sua expressão diminui nas células diferenciadas das camadas suprabasais. Em tumores, sua expressão apresenta o mesmo padrão encontrado em tecido epitelial normal, no entanto, a K5 é utilizada no reconhecimento e diagnóstico de carcinomas escamosos pouco diferenciados e metástases linfonodais. A queratina 10 (K10) está envolvida na diferenciação dos queratinócitos, sendo considerada um marcador de queratinização. Ela é expressa nas camadas suprabasais da epiderme e pouco utilizada para o diagnóstico de tumores (revisto por Moll et al., 2008).

Utilizamos as amostras de pele humana como controle para as reações de imunohistoquímica para Involucrina, K10 e K14 amostras de pele humana. Podemos observar na figura 17(A) uma marcação mais forte para Involucrina nas camadas espinhosa e granular da epiderme. Para K10 (Fig. 17B), observamos a presença da proteína a partir das camadas suprabasais, sem evidenciá-la na camada basal, e para K14 (Fig. 17C), uma forte marcação na camada basal, diminuindo nas células diferenciadas do epitélio. Assim que verificamos a correta marcação dos antígenos analisados, prosseguimos com as análises nas amostras de culturas organotípicas (*rafts*).

Figura 17: Imunohistoquímica para Involucrina, Queratina 10 (K10) e Queratina 14 (K14) em amostras de pele humana. Notar o epitélio estratificado normal, apresentando uma forte marcação para Involucrina (A) nas camadas espinhosa e granular. Para a K10 (B), podemos observar uma forte marcação desta queratina nas camadas suprabasais e marcação negativa na camada basal. Para K14 (C), notar a forte marcação na camada basal. As setas pretas indicam a localização da membrana basal. Aumento 400x. Barra escala 50µm.

O ensaio de imunohistoquímica para Involucrina (Fig. 18), um marcador de células diferenciadas tardiamente no epitélio, mostrou uma forte presença para esta proteína nas camadas espinhosa e granular, melhor observadas nos *rafts* pLXSN e E6wt (Fig. 18A e B) uma vez que estes apresentam um epitélio com camadas mais diferenciadas. Também observamos uma fraca presença de involucrina para os *rafts* E7wt e E6E7 (Fig. 18 C e D) nas células mais superficiais da epiderme (com exceção das células mais queratinizadas na camada córnea), uma vez que não há uma camada granulosa clássica como observado em pLXSN.

O tratamento com TNF induziu um aumento no padrão de distribuição da proteína involucrina, sendo que na presença de E6wt e E6E7 observa-se esta proteína nas camadas suprabasais (Figs 18 F e H). Para todos os *rafts*, na presença ou ausência de TNF, observamos que não há positividade para involucrina nas camadas basais.

Figura 18: Imagens de cortes transversais de culturas organotípicas de QPHs contendo o vetor controle pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV16. A marcação citoplasmática corresponde a Involucrina detectada por imunohistoquímica. Aumento 400x. Barra de escala 50µm.

No ensaio de imunohistoquímica para Queratina 10, um marcador de células diferenciadas no epitélio, observamos sua forte presença nas camadas suprabasais da epiderme em todos os *rafts* estudados, e uma distribuição diferenciada e mais tênue de K10 na presença de E6wt, E7wt e E6E7, mas ainda preservando o padrão negativo nas camadas basais (Fig. 19 A-D).

Na presença de TNF, nos *rafts* de E6wt e E6E7 observa-se uma coloração das camadas basais, não observada na ausência de TNF (Fig. 19 F e H).

Figura 19: Imagens de cortes transversais de culturas organotípicas de QPHs contendo o vetor controle pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV16. A marcação citoplasmática corresponde a Queratina 10, detectada por imunohistoquímica. Aumento 400x. Barra de escala 50µm.

Ao analisarmos o marcador de células basais do epitélio, a Queratina 14 (K14), observamos no modelo de *rafts* que esta proteína está fortemente marcada nas células da camada basal, sendo que esta marcação se torna mais fraca nas células mais superiores da epiderme, em todos os *rafts* estudados (Fig. 20 A-D). Nos *rafts* tratados com TNF, este padrão de marcação é semelhante aos não tratados (Fig. 20 E-H).

Figura 20: Imagens de cortes transversais de culturas organotípicas de QPHs contendo o vetor controle pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV16. A marcação citoplasmática das corresponde a Queratina 14, detectada por imunohistoquímica. Aumento 400x. Barra de escala 50µm.

4.3-B) Análise da expressão gênica de *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-2* e *RECK*

Após padronização e validação do método de análise (Figs. 28, 29 e 30; Tabela 4 nos Apêndices B e C) foram feitas as reações de *real-time* PCR para cada um dos cinco genes de interesse, bem como do gene constitutivamente expresso (*Tubulina*). Para cada gene foram feitas triplicatas biológicas com duplicatas de poços. Assim como para as culturas em monocamada, utilizamos os QPHs transduzidos com pLXSN como nossos controles, uma vez que representam os mesmos procedimentos técnicos de cultura de células transduzidas por estes vetores contendo as partículas virais.

Apresentamos aqui os dados para os *rafts* transduzidos com pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7, excluindo os mutantes E6 Δ 9-13 e E726G, uma vez que estes não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle.

A figura 21 mostra o resultado da análise da expressão gênica dos cinco genes de interesse: *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-2* e *RECK*.

Figura 21: Perfil de expressão gênica de *MMP-2* (A), *MMP-9*(B), *MT1-MMP*(C), *TIMP-2*(D) e *RECK* (E) em relação à *tubulina* analisada através da técnica de *real-time* PCR. Amostras foram normalizadas por pLXSN sem tratamento com TNF- α . Amostras de epiderme de culturas organotípicas.*P<0.05. Podemos observar que na presença do oncogene E7wt há uma diminuição da expressão gênica de *MMP-2*; na presença de E6E7 em conjunto, há uma diminuição de *MMP-2* e *RECK* (independente da presença do TNF) e um aumento para *MT1-MMP*. Além disso, o tratamento com TNF induziu a expressão de *MMP-9*, mesmo nas células infectadas com vetor controle.

A análise dos dados de expressão gênica mostrou que os *rafts* que expressam os oncogenes E7wt e E6E7 apresentaram uma diminuição na expressão de MMP-2 em relação ao controle ($P < 0.05$) (Fig. 21A), com padrão de expressão semelhante tanto para as amostras não tratadas quanto para as tratadas com TNF. Para avaliação do efeito do tratamento com TNF na expressão gênica de *MMP-2*, normalizamos a expressão de todas as amostras, tratadas ou não, pela amostra pLXSN sem tratamento. Observamos na figura 24A que não há diferenças estatísticas entre as amostras tratadas ou não, com exceção para pLXSN, sugerindo que, em nosso sistema o TNF parece não estar envolvido na regulação da expressão gênica de *MMP-2*.

A análise da expressão gênica de mostra que os *rafts* que expressam o oncogene E6wt apresentam um aumento na expressão de MMP-9 em relação a todos os outros *rafts* embora não seja significativamente estatístico (Fig. 21B). Além disso, que os *rafts* que expressam E7wt apresentam uma diminuição de *MMP-9* ($P < 0.05$), mas quando expressos conjuntamente E6E7 não há diferenças em relação ao controle, padrão semelhante de expressão quando analisamos separadamente as amostras tratadas com TNF. Após o tratamento com TNF, observamos que esta citocina induz um grande aumento na expressão de *MMP-9* ($P < 0.05$) em todos os *rafts* estudados quando comparado aos controles correspondentes (Fig. 21B).

As culturas que expressam simultaneamente os oncogenes virais E6E7 apresentam um aumento na expressão gênica de *MT1-MMP* ($P < 0.05$) em relação ao controle (Fig. 21C). Observamos que para as amostras tratadas com TNF não houve diferença na expressão desse gene, assim como quando normalizamos todas as amostras por pLXSN sem tratamento (Fig. 21C), mostrando que a presença de TNF não altera a expressão gênica de *MT1-MMP*.

Os dados mostram que há uma diminuição da expressão de *RECK* nos *rafts* que expressam E6E7 ($P < 0.05$) em relação ao controle, E6wt e E7wt (Fig. 21D) para as amostras não tratadas. No tratamento com TNF, ainda observamos a diminuição de E6E7 em relação controle ($P < 0.05$) (Fig. 24D). Aos compararmos as amostras tratadas com as não tratadas, vemos que a presença de TNF diminui a expressão de *RECK* em E6wt ($P < 0.05$) (Fig. 21D). Os dados sugerem que os *rafts* que expressam E6E7, mesmo tratados com TNF, apresentam diminuição da expressão de *RECK* em relação ao controle.

Os resultados mostram que a expressão gênica de TIMP-2 não é alterada na

presença dos oncogenes virais, e que o tratamento com TNF não induz a expressão deste gene, uma vez que não observamos diferenças estatísticas (Fig. 21E).

4.4-B) Análise dos níveis protéicos de MMP-9

Para determinar os níveis das proteínas MMPs -2, -9 e -14 e de RECK e TIMP-2, utilizamos o ensaio de western blot. Uma vez que não houve diferenças na expressão entre *rafts* desenvolvidos com QPHs normais ou transduzidos com cassete viral vazio, apenas são apresentados os resultados obtidos utilizando o vetor pLXSN.

Os resultados da expressão de MMP-2, RECK e TIMP-2 não serão apresentados uma vez que não houve sinal para estas proteínas em nenhuma das replicatas estudadas.

A figura 22 mostra os níveis protéicos de MM-9 nos QPHs infectados com os oncogenes virais pLXSN, E6wt, E7wt, E6E7, tratados ou não com TNF.

Figura 22: Determinação dos níveis protéicos de MMP-9 por western blot em amostras de *rafts* desenvolvidos a partir de QPHs infectados, tratados ou não com TNF. A tubulina foi utilizada como controle de quantidade protéica. Observar que os níveis protéicos de MMP-9 ativa não estão alterados nos *rafts* infectados com os oncogenes virais.

A MMP-9 é uma metaloproteinase também secretada na forma de zimógeno (pró-forma 92KDa) e ativada extracelularmente. O anticorpo utilizado detecta, de acordo com o fabricante, as formas pró (92KDa) e ativa (82KDa) desta MMP. Na fig. 22 observamos a forma de MMP-9 ativa (82KDa) tanto para as amostras não tratadas quanto para as tratadas com TNF. Não observamos diferenças significativas na expressão da forma ativa de MMP-

9 entre os *rafts* transduzidos com as oncogenes virais em relação ao controle, bem como no efeito do tratamento com TNF. A pro-forma está expressa nas amostras E7wt e E6E7 (não tratadas) e em todas as formas tratadas com TNF.

4.5-B) Atividade das MMP-2 e MMP-9 nas culturas organotípicas através do ensaio de zimografia

O ensaio de zimografia na presença de gelatina mostra a atividade das formas pró (zimógeno) e ativas das MMP-2 e -9 (gelatinases A e B respectivamente). A fim de avaliarmos a atividade de MMPs nos componentes da cultura organotípica, foram feitos ensaios de zimografia tanto para epiderme (queratinócitos) quanto para derme (fibroblastos murino e colágeno tipo I).

Para a epiderme, os resultados mostram que atividade de MMP-9 (formas Pro e ativa) está aumentada quando os oncogenes E7wt e E6E7 estão expressos (Fig. 23 A e B) , mas para MMP-2, essa atividade é ser modificada pela presença do oncogenes E6wt e E7wt separadamente, bem como quando esses oncogenes estão sendo expressos juntos (Fig. 23A).

Para avaliarmos se os oncogenes virais estariam modulando a atividade das MMPs -2 e -9 no equivalente dérmico (derme), passamos a estudar também esse componente das culturas organotípicas, além da epiderme.

Observamos na fig.23 a atividade das MMPs em equivalente dérmico, sendo que para MMP-9, somente há atividade da forma Pró, e para MMP-2 observamos as três formas desta MMP. Ao compararmos a atividade MMP-9 entre as amostras estudadas, apesar de haver uma diminuição da atividade desta MMP nos *rafts* que expressam E7wt (Fig. 23A e C), não foram observadas diferenças entre as atividades das amostras controle e a derivada de E6E7 (Fig. 23C), assim como para MMP-2. Uma vez que foi encontrada atividade de MMPs em ambos componentes do epitélio esses resultados nos direcionaram a uma nova pergunta: a atividade observada na derme é devido aos fibroblastos presentes ou devido à interação do epitélio?

Uma forma de responder a esta questão foi analisar a atividade de MMPs em estruturas 3D contendo colágeno tipo I e fibroblastos (equivalente dérmico), na ausência do epitélio. Podemos observar que o equivalente dérmico sozinho apresenta atividade de

MMP-2, mas não de MMP-9 (Fig. 23A), mostrando que a atividade de MMP-9 observada, em parte, é devida à interação com a epiderme.

Os dados em conjunto mostram que no ambiente 3D há um aumento da atividade de MMP-9 na presença de E7wt e E6E7 na epiderme, mas que esse aumento não é refletido na derme. Além disso, a atividade de MMP-9 na derme requer a presença da epiderme.

Figura 23: Ensaio de zimografia em epitélio de *rafts*. Extrato protéico total de epiderme e derme de *Rafts*. As atividades das MMPs estão representadas pelas bandas claras. HT1080: sobrenadante desta linhagem, utilizado com controle da reação. Zimograma (A), quantificação atividade de Pro-MMP-9 na Epiderme (B) e na Derme (C). Observar o aumento de MMP-9 em E7wt e E6E7 e ausência de atividade de MMP-9 no equivalente dérmico (seta amarela).

4.6-B) Imunohistoquímica em culturas organotípicas

A proteína RECK foi descrita com um inibidor da secreção e atividade de MMP- 2, MMP-9 e MT1-MMP, além de regular a angiogênese (Oh et al, 2001). A literatura mostra que RECK é expresso em tecidos normais, e sua expressão em tumores está associada com bom prognóstico (Takahashi et al., 1998; Clark et al., 2007). As MMPs estão associadas com o remodelamento de matriz, sendo relacionadas com maior expressão em tecidos tumorais.

Como controles dos ensaios de imunohistoquímica foram utilizadas amostras de pele humana para RECK e amostras de placenta humana para MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, uma vez que este tecido está associado com alto remodelamento.

Podemos observar na fig. 24 uma marcação citoplasmática para as MMPs (-2, -9) e marcação de membrana para MT1-MMP na placenta e uma marcação citoplasmática para RECK no tecido de pele humana (setas vermelhas), em todas as camadas do epitélio. Também observamos, no quadro menor, a marcação de RECK em vasos (seta amarela). Assim que verificamos a correta marcação dos antígenos analisados, prosseguimos com as análises nas amostras de culturas organotípicas (*rafts*).

Figura 24: Imunohistoquímica para MMP-2, MMP-9, MT1-MMP (MMP-14) em amostras de placenta humana e RECK em amostras de pele humana. Notar a marcação citoplasmática para MMP-2 e MMP-9 e marcação de membrana para MMP-14. No epitélio estratificado normal, podemos observar a marcação citoplasmática para RECK, com destaque para vasos. Aumento de 400x.

As culturas organotípicas que expressam as oncoproteínas virais de HPV16, tratadas ou não com TNF, foram submetidas ao ensaio de imunohistoquímica a fim de localizarmos as proteínas RECK e MMP-9.

De acordo com a fig. 25, observamos a presença citoplasmática da proteína RECK em todas as amostras estudadas. Vemos que nos *rafts* controle (pLXSN) (Fig. 25A) há uma distribuição de RECK em todas as camadas do epitélio, sendo mais forte nas camadas superiores, no entanto, para *rafts* que expressam E6wt ou E7wt (Fig. 25 B e C), esta marcação é muito tênue. Para os *rafts* que expressam E6E7 em conjunto, foi observada uma tênue presença em todo o epitélio, no entanto, menor que nos *rafts* controle (Fig. 25 D). O tratamento com TNF parece modular positivamente RECK (Fig. 25 E-G), mas novamente, quando comparamos os *rafts* que expressam E6E7 com o controle, vemos uma menor marcação de RECK associada com a expressão de E6E7 (Fig. 25 H).

Os dados em conjunto sugerem que os *rafts* que expressam os oncogenes E6E7 apresentam uma menor marcação para RECK em relação aos *rafts* que expressam os vetores controle pLXSN, tanto na ausência quanto na presença do TNF.

Figura 25: Imagens de cortes transversais de culturas organotípicas de QPHs contendo o vetor controle pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV16. A marcação citoplasmática corresponde a RECK, detectada por imunohistoquímica. Aumento 400x. Barra de escala 50µm.

Ao analisarmos o padrão de marcação de MMP-9 nas culturas organotípicas, podemos observar que esta MMP está presente em todas as culturas, distribuída por todo o epitélio (camadas basais e suprabasais), no entanto, marcada com maior intensidade na camada basal (Fig 26 A-D).

Os dados mostram que a marcação de MMP-9 não apresenta diferenças entre os *rafts* que expressam as oncoproteínas virais e o *raft* que expressa o vetor controle pLXSN, entretanto, a presença de MMP-9 é mais intensa na camada basal, na presença ou ausência de TNF (Fig. 26 E-H).

Os ensaios de imunohistoquímica para MMP-2 e MT1-MMP não apresentaram imunomarcação nas amostras de culturas organotípicas, tanto para os *rafts* que expressam as oncoproteínas de HPV16 quanto para os que expressam o vetor controle pLXSN, assim como nos *rafts* tratados com TNF.

Figura 26: Imagens de cortes transversais de culturas organotípicas de QPHs contendo o vetor controle pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV16. A marcação citoplasmática corresponde a MMP-9, detectada por imunohistoquímica. Aumento 400x. Barra de escala 50µm.

5) DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que a infecção pelos papilomavírus humano (HPV) de alto risco pode causar o desenvolvimento do carcinoma cervical (zur Hausen, 1985; Bosch e Muñoz, 2002; zur Hausen, 2009). Entre os HPVs de alto risco, podemos destacar o HPV16, responsável por 55% dos casos de câncer cervical (Smith et al., 2007).

Nos últimos 10 anos, muitos estudos têm sugerido que um dos mecanismos relacionados com a progressão do carcinoma cervical é o aumento da expressão de metaloproteinases de matriz no tecido tumoral e sua associação com crescimento tumoral, metástase e recorrência como resultado da degradação da matriz extracelular (revisto por Libra et al., 2009).

Neste contexto, as MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP são as que possuem uma maior relação com a progressão tumoral e processos de invasão e metástase (Brummer et al., 2002; Zhou et al., 2002; Sheu et al., 2003; Zhai et al., 2005), além de serem associadas a presença de HPV em linhagens de carcinomas cervicais (da Silva Cardeal et al., 2006).

Diante destes aspectos, este trabalho teve como objetivo caracterizar a expressão e atividade de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, e de seus inibidores RECK e TIMP-2 em queratinócitos humanos primários que expressam as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV 16, em modelo de culturas em monocamadas e organotípicas.

As culturas organotípicas desenvolvidas a partir de queratinócitos infectados com os oncogenes E6 e/ou E7 e seus mutantes de HPV16 apresentou características morfológicas semelhantes ao encontrado na literatura. Mc Cance e col., (1998), mostraram que *rafts* desenvolvidos na presença de HPV16 reproduzem alterações morfológicas observadas em neoplasias intraepiteliais cervicais. Observamos que os *rafts* de E7wt e E6E7 apresentaram características morfológicas que se assemelham a uma lesão intraepitelial de alto grau, o que pode ser explicado pela interação de E7 com proteínas de ciclo celular (Ciclina A e E, p27, p21 entre outras) e de modulação do crescimento dependente de ancoragem (p600) (revisto por Morris et al., 2008), levando a desorganização da camada epitelial.

Além disso, os *rafts* que expressam os mutantes de E6 (E6Δ9-13) e E7 (E726G) apresentaram as mesmas características dos *rafts* controle (pLXSN) e sem o vetor viral. Estas observações indicam, portanto, que as alterações morfológicas causadas

principalmente por E7, mais atenuadamente por E6, mas intensificadas na presença de E6E7, semelhantes às observadas nas displasias uterinas *in vivo* dependem, pelo menos em parte, da degradação das proteínas pRb e p53, respectivamente.

Uma vez que alguns trabalhos tem demonstrado a expressão de MMP-2 e MMP-9 por células do tecido inflamatório infiltradas no tumor (Tellier E et al., 2007), passamos a tratar as culturas organotípicas com TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, e verificar o desenvolvimento destas culturas assim como caracterizar a expressão das MMPs e seus inibidores em estudo (descritos nos itens a seguir).

O TNF- α é capaz de inibir a proliferação de queratinócitos humanos normais e imortalizados por HPV 16 (Villa et al., 1992; Malejczyk et al., 1994; Vieira et al., 1996). No entanto, estudos recentes mostram que a proteína E7 de HPV 16 ou 18 é capaz de conferir resistência ao efeito anti-proliferativo do TNF em culturas de queratinócitos em monocamada e organotípicas (Basile et al., 2001; Munger et al., 2001; Boccardo, 2002, 2004, 2010). Estes fatos sugerem que a aquisição de resistência ao efeito anti-proliferativo do TNF poderia ser um passo importante no processo de tumorigênese mediado pela oncoproteína. O dado se reforça, pois também foi observado que, em fibroblastos, E7 de HPV 16 é capaz de inibir a indução de apoptose por TNF (Thompson et al., 2001). Em nosso estudo observamos que os *rafts* de E7 e E6E7 tratados com TNF também se desenvolveram e mantiveram as características morfológicas de lesões de alto grau.

Estas observações sugerem que algumas propriedades virais poderiam estar contribuindo na resistência aos efeitos anti-proliferativos do TNF em queratinócitos, de acordo com Boccardo 2002, 2004. O produto do gene E7 é importante na indução da replicação do DNA em células diferenciadas que normalmente encontram-se quiescentes, e também, essa proteína é capaz de mediar a proliferação celular mesmo na presença de sinais inibitórios como o TNF. Além disso, a proteína E6 (provavelmente junto à proteína E7) poderia contribuir na manutenção da proliferação celular na camada basal após tratamento com TNF- α .

A fim de avaliarmos a influência das oncoproteínas E6 e/ou E7 na diferenciação dos queratinócitos, foi analisada a expressão protéica de queratina 14 (K14 - marcador de célula basal), queratina 10 (K10-marcador de células diferenciadas inicialmente) e involucrina (marcador de células diferenciadas tardiamente) através de ensaios de imunohistoquímica.

Não foi observada nenhuma diferença na expressão de K14 (camada basal) nos *rafts* que expressam pLXSN comparado com aqueles que expressam as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV1. No entanto, para K10, que é expresso nas camadas suprabasais, observamos um padrão descontínuo de marcação para esta proteína nos *rafts* que expressam E6E7, sugerindo que a expressão destas oncoproteínas pode alterar os padrões de diferenciação do epitélio a partir das camadas suprabasais. Um recente estudo mostra que em culturas organotípicas que expressam E7wt de diferentes tipos de HPV (1, 16 e 38) estas oncoproteínas também não alteraram os padrões de expressão de K14, mas que culturas que expressam E7 de HPV38 apresentam um padrão irregular de K10, presente apenas nas camadas mais superiores do epitélio (Westphal et al., 2009).

A involucrina (marcador de camadas superiores do epitélio) apresentou um padrão diferencial de marcação entre os *rafts* que expressam o vetor controle pLXSN e os *rafts* que expressam E7 e E6E7. Em pLXSN há uma marcação intensa nas camadas granulares e córneas do epitélio, sendo que em E7 e E6E7 esta intensidade é diminuída, indicando que E7 pode estar modificando a diferenciação terminal do epitélio. Westphal e cols. (2009) mostraram que *rafts* que expressam E7 de HPV1 ou HPV4 apresentaram uma grande redução na expressão de involucrina, dado não observado por eles com E7 de HPV16. As diferenças observadas em ambos os estudos pode ser devido aos queratinócitos utilizados nos ensaios, adultos no de Westphal em contraposição ao de neonatos apresentados em nossos estudos. Portanto, nossos dados demonstram que a combinação de E6E7 alteraria a expressão de involucrina em queratinócitos neonatos.

Estas observações em conjunto indicam que as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16 não alteram o padrão de diferenciação inicial do epitélio, mas que E7 pode modificar a diferenciação terminal, representada pela baixa expressão de involucrina.

Após o desenvolvimento e caracterização das culturas organotípicas, passamos a análise da expressão gênica das *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP* e de seus inibidores *RECK* e *TIMP-2*. Analisamos a expressão destes genes tanto nas culturas em monocamada quanto nas culturas organotípicas a fim de saber se há alteração na expressão destes genes durante o processo de diferenciação epitelial.

Neste estudo observamos que tanto as culturas em monocamada quanto as organotípicas apresentaram uma menor expressão de *MMP-2* nos queratinócitos infectados com E7wt e com E6E7, em relação controle pLXSN, na ausência e presença de TNF. Os

dados em conjunto sugerem que o oncogene viral E7wt altera a expressão de *MMP-2* e que esta alteração ocorre independente do processo de diferenciação celular, como mostrado no contexto tridimensional observado nos *rafts*, bem como do tratamento com TNF.

Estudos anteriores de nosso laboratório mostram maiores níveis de expressão de *MMP-2* em linhagens de carcinoma cervical positivas para HPV16 cultivadas em monocamadas e também em colágeno tipo I (da Silva Cardeal et al., 2006). É descrito que esta MMP está associada com a progressão tumoral, invasão e recorrência tumores cervicais (Sheu et al., 2003, Gaiotto et al., 2004), entretanto não há relatos de quais oncogenes virais contribuem propriamente para este aumento de expressão, nem mesmo se há expressão gênica de MMPs alterada nestes estudos.

Durante a diferenciação do epitélio, observamos que a expressão de *MMP-9* é diminuída nos *rafts* que expressam E7wt na ausência e presença de TNF, o que não foi observado nas culturas monocamada.

O tratamento com TNF aumentou a expressão de *MMP-9* em todas as amostras estudadas, tanto nas culturas monocamadas quanto nas organotípicas, indicando que este aumento independe da presença dos oncogenes virais.

Trabalhos anteriores mostraram que *MMP-9* está aumentada em carcinomas cervicais, relacionada com progressão tumoral e invasão (Sheu et al., 2003). Em modelos de queratinócitos e fibroblastos dérmicos humanos, células de músculo liso traqueal e sarcomas de tecidos moles, foi demonstrado que o TNF induz a expressão gênica de *MMP-9*, através da ativação do promotor de *MMP-9* via NF- κ B (Han et al., 2001b; Holvoet et al., 2003; Liu et al., 2006; Lee et al., 2007).

O questionamento sobre o envolvimento ou não da via de NF- κ B em nosso modelo fica a ser respondido, entretanto, como citado acima, a literatura reforça esta relação entre NF- κ B e o promotor de *MMP-9*, uma vez que a *MMP-9* é a única MMP que possui sítio responsivo para NF- κ B em seu promotor (Yan C e Boyd D, 2007).

A análise da expressão gênica de *MT1-MMP* em culturas organotípicas não tratadas mostrou que em conjunto os oncogenes E6E7 apresentam um aumento da expressão de *MT1-MMP*. Esses dados não foram observados para as culturas em monocamadas, onde não houve diferenças na expressão gênica de *MT1-MMP* entre as amostras estudadas. Além disso, o TNF não induziu a expressão desta MMP em nenhum dos modelos (monocamada ou organotípica).

Estudos anteriores de nosso grupo mostram maiores níveis de expressão de *MT1-MMP* em linhagens de carcinoma cervical positivas para HPV16 (da Silva Cardeal et al., 2006). Smola-Hess et al., (2005), mostraram que queratinócitos infectados com E7 de HPV16 apresentam um discreto aumento na expressão de *MT1-MMP* em relação ao controle infectado com cassete viral vazio. No entanto, esses ensaios foram realizados apenas com o oncogene E7wt e em células em culturas em monocamada, diferente do nosso sistema de cultura organotípica. Os nossos resultados sugerem que a ação em conjunto dos oncogenes E6E7 é importante para o aumento da expressão gênica de *MT1-MMP*, ainda em queratinócitos primários, podendo contribuir para o desenvolvimento do tumor cervical.

Han e cols., (2001a), mostraram que em um modelo de pele humana, o TNF induziu o aumento dos níveis de mRNA de *MT1-MMP* em fibroblastos dermais que cresceram em colágeno tipo I, sugerindo a ação do TNF em fibroblastos, mas não nos queratinócitos. Nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que o TNF não modula a expressão gênica de *MT1-MMP* nos queratinócitos em nossos modelos de estudo (culturas monocamada e organotípica).

O inibidor tecidual de metaloproteinases *TIMP-2*, em culturas monocamada (com e sem TNF), apresentou uma diminuição de sua expressão na presença de E7wt e E6E7 em relação ao controle pLXSN. Além disso, o TNF induziu a sua expressão nestas culturas, independente da presença dos oncogenes virais. Para as culturas organotípicas não foram observadas diferenças entre os *rafts* estudados.

A expressão do gene *RECK* está diminuída nos *rafts* transduzidos E6E7, independente da presença do TNF. Esta diminuição não foi observada nas culturas em monocamadas, mostrando a importância do modelo de cultura organotípica. Não há na literatura dados comparativos, tanto para *RECK* quanto para *TIMP-2*, apenas os previamente publicados por nosso grupo, em monocamadas de células HPV16 positivas, SiHa e CaSki, onde não foi observada nenhum padrão de alteração de *RECK*, mesmo na presença de colágeno.

Sabendo-se que controles pós-transcricionais são importantes para a atuação das MMPs e de RECK, passamos a avaliar o padrão de expressão proteína através de ensaios de Western Blot.

Em nossos modelos de estudo, encontramos uma baixa expressão protéica de

MMP-2 em todas as amostras estudadas, independente das oncoproteínas virais. Para as amostras derivadas das culturas em monocamada, a expressão da proteína total é muito baixa, sendo o mesmo observado nos *rafts*, e, para ambos os modelos, a presença das oncoproteínas virais não alterou esta expressão, assim como o tratamento com TNF. Além disso, os níveis de MMP-2 também não foram detectados em ensaio de imunohistoquímica.

Em modelo de culturas organotípicas infectadas com HPV 18, foi observada a expressão constitutiva de MMP-2 somente na derme (Yoshida et al., 2008). Em contraposição, Smola–Hess e cols., (2005), que sugerem que células HaCaT (queratinócitos imortalizados espontaneamente) cultivadas em monocamada, que expressam E7 de HPV16 apresentam um aumento de atividade de MMP-2. Diferentemente do nosso modelo, onde os queratinócitos estão em passagens muito baixas, as células HaCat são imortalizadas e não estão cultivadas no contexto da diferenciação epitelial.

A expressão da proteína MMP-9 foi observada em todas as culturas de queratinócitos em monocamada e organotípicas estudadas, não apresentando diferenças entre a expressão das oncoproteínas E6E7 em relação ao controle. Adicionalmente, o ensaio de imunohistoquímica não mostrou diferenças no padrão de marcação de MMP-9 entre os *rafts* controle e os que expressam as oncoproteínas virais, sendo que em todos eles (pLXSN, E6, E7 e E6E7) foi observada uma marcação um pouco mais intensa nas células da camada basal, possivelmente correlacionado com a degradação da membrana basal.

Yoshida e cols., (2008), mostraram em modelo de *rafts* que expressam E7wt de HPV18, que somente na presença do oncogene H-rasV12 há um aumento da expressão de MMP-9 e de MT1-MMP, relacionadas com uma maior invasão desses queratinócitos na derme em uma via dependente de MEK/ERK. No entanto, sem essa indução via H-ras, este aumento de MMP-9 e invasão não ocorrem, dados que se assemelham aos nossos. Vemos que para linhagens de carcinoma cervical, a expressão de MMP-9 é maior nas linhagens HPV16 positivas (SiHa e CaSki) do que na HPV negativa (C33A), dados que refletem o trabalho anteriormente descrito pelo grupo, em termos de expressão gênica (da Silva Cardeal et al., 2006).

O tratamento com TNF mostrou uma ativação de MMP-9, melhor observada na forma Pró das culturas em monocamadas. Este aumento ocorreu independente da presença das oncoproteínas virais, no entanto, ela é um pouco menor em amostras E7wt. Como

descrito anteriormente, o tratamento com TNF induz a expressão e a atividade de MMP-9 em vários tipos celulares. Uma das vias propostas para explicar esse aumento sugere que após ligação com seu receptor, o TNF induz uma cascata de ativação da via PI3K/Akt, translocando o Akt para o núcleo, o qual ativaria o fator transcricional p300, uma proteína acetiladora de histonas, que se ligaria ao promotor de MMP-9, e, uma segunda via sugere que NF- κ B, como descrito anteriormente, atuaria como fator transcricional (Lee et al., 2007). Holvoet e cols. (2003) sugerem que para queratinócitos, a ativação do promotor de MMP-9 seria via MAPKs e o fator transcricional AP-1.

Quanto a expressão da proteína MT1-MMP, ela é encontrada superexpressa em amostras de carcinomas cervicais humanos (Sheu et al., 2003; Zhai et al., 2005) e em modelo de camundongos transgênicos para HPV8 (Akgül et al., 2006), mas sua associação com o HPV ainda necessita esclarecimentos. Em nosso estudo, observamos que no modelo de culturas monocamadas, os níveis protéicos de MT1-MMP não apresentaram diferenças entre a amostra controle e as que expressam as oncoproteínas virais.

Os nossos dados de expressão gênica apóiam os encontrados na literatura, pois apesar de Smola-Hess e cols., (2005), mostrarem uma pequena expressão de MMP-14 em queratinócitos infectados com E7 de HPV16, a associação entre as oncoproteínas E6E7 não foi demonstrada. Além disso, Akgül e cols., (2005), mostram uma forte marcação para MT1-MMP em culturas organotípicas infectadas com E7 de HPV 8 (HPV cutâneo), sugerindo novamente o papel da cultura 3D para elucidar a expressão de MMPs.

Zhai Y e cols., (2005), mostraram que linhagens de carcinoma cervical SiHa e CaSki transduzidas com MT1-MMP, quando cultivadas em colágeno tipo I apresentaram um pequeno potencial invasivo, o qual foi aumentado na presença de EGF. Novamente, assim como para MMP-9, Yoshida e cols. (2008) mostraram que o aumento de MT1-MMP relacionado com potencial invasivo em *rafts* que expressam E7wt de HPV18 só foi observado na presença de H-rasV12. Depreende-se, portanto, que é necessária a presença de outros co-fatores como H-ras e EGF aliados às MMPs para indução da invasão.

O balanço entre as MMPs e seus inibidores é importante para determinação do potencial invasivo. Muitos trabalhos têm demonstrado uma correlação positiva entre a manutenção de RECK em tumores e um melhor prognóstico em relação à diminuição de invasão e metástase (Clark J et al., 2007).

O ensaio de ELISA mostrou uma menor quantidade de anticorpos contra TIMP-2 nas culturas em monocamadas que expressam os oncogenes E6E7, dados que reforçam os de expressão gênica apresentados anteriormente. O papel de TIMP-2 em carcinomas cervicais é ainda pouco conhecido. Alguns estudos utilizando amostras de pacientes mostraram através de ensaios de imunohistoquímica para TIMP-2 que, apesar de ser visto que uma diminuição da expressão de TIMP-2 durante a progressão tumoral, ainda foi detectada marcação desta TIMP em amostras de carcinoma invasor, tanto na porção tumoral quanto no estroma, não sendo possível correlacionar a expressão de TIMP-2 com nenhum parâmetro clínico (Nair et al., 2004; Sheu et al., 2004). Contraditoriamente aos resultados acima, Branca e cols., (2006) demonstraram que a diminuição de TIMP-2 durante a progressão tumoral em pacientes com carcinoma cervical correlaciona-se com melhor prognóstico e menor potencial invasivo, mas não com a presença de HPV de alto-risco e persistência viral após o tratamento. Esses resultados contraditórios para TIMP-2 podem refletir seu papel complexo como inibidora e ativadora da atividade de MMPs. A função de TIMP-2 é dependente do contexto celular em que ela está presente. Sabemos que ela é constitutivamente expressa em tecidos adultos, no entanto, sua expressão é diminuída em tumores, além disso, há uma menor disponibilidade de TIMP-2 livre relacionada com o aumento da expressão de MMP-2 (Stetler-Stevenson, 2008).

Ao analisarmos outro inibidor de MMPs, a proteína RECK, os nossos resultados mostraram uma diminuição dos seus níveis protéicos nas culturas em monocamadas que expressam E6E7, independente do tratamento com TNF. Além disso, vemos uma menor marcação para este inibidor nas células que expressam E7 e E6E7 demonstrada no ensaio de imunocitoquímica. Para os *rafts*, adicionalmente ao resultado de *real-time* PCR, que mostrou uma menor expressão gênica de RECK em E6E7, também observamos esta tendência de diminuição da presença protéica de RECK nos *rafts* que expressam E6E7, através do ensaio de imunohistoquímica.

A literatura demonstra que o papel RECK em tumores cervicais e sua interação com HPV é ainda pouco explorada. Em um recente estudo, Min e cols., (2009), mostraram através de ensaios de microarray, que células da linhagem de carcinoma cervical HeLa (HPV 18 positiva) quando infectadas com siRNA (small interfering RNA) para o oncogene E6, apresentaram uma ativação de anti-oncogenes, entre eles RECK.

As linhagens de carcinoma cervical apresentaram níveis protéicos quase

indetectáveis para RECK, dado condizente com a literatura, onde tumores apresentam pouca expressão desta proteína. Os dados sugerem que a diminuição de RECK em E6E7, correlacionado com a baixa expressão nas linhagens tumorais, pode ser um evento inicial associado à carcinogênese regulado pelas oncoproteínas E6 e E7

O estudo da atividade de RECK tem sido preferencialmente demonstrado na linhagem de fibrosarcoma HT1080. Os resultados obtidos até o momento sugerem que RECK inibe a atividade de MMPs, através de mecanismos pós-transcricionais (Takahashi et al., 1998; Oh et al., 2001; Sasahara et al., 2002) e mais recentemente transcricionais (Takagi S et al., 2009).

Recentemente, um novo papel para RECK foi descrito por Morioka e cols., (2009), os quais demonstram que RECK também está relacionado com a migração celular. Em modelos de fibroblastos transformados e fibrosarcoma, a baixa expressão de RECK leva ao aumento da velocidade de migração, aumento da atividade gelatinolítica, diminuição das fibrilas de fibronectina e de formação de adesões focais, sugerindo que RECK regula a degradação da matriz pericelular e promove a adesão das células ao seu substrato, mecanismos conhecidos de malignidade.

Em modelos de gliomas, dados gerados pelo nosso grupo, foi observado que a superexpressão de RECK na linhagem T98G (glioblastoma multiforme) inibe a motilidade e a invasão celular, relacionadas com modificações no citoesqueleto, como alteração de lamelipódia e distribuição alterada de P-FAK (quinase de adesão focal fosforilada) em adesões focais maduras associadas com fibras de stress (Silveira Corrêa et al., 2010).

Oh e cols., (2004 ; 2006) descreveram que RECK também pode ser regulado por TIMP-2, em modelos de células endoteliais. Quando estas células são tratadas com TIMP-2, esta interage com seu receptor $\alpha_3\beta_1$ aumentando a expressão de RECK, em uma via que envolve a diminuição dos níveis de Src (Src tirosina quinase presente em adesões focais), inativação de Rac1 (uma GTPase –small guanosine triphosphates) e ativação de Rap1 (outra GTPase). Este aumento de RECK resulta na inibição da migração das células endoteliais. Além disso, o tratamento com TIMP-2 também mostra um aumento nos níveis de P-FAK, no entanto, esta interação ainda não é bem esclarecida.

Como em nossos resultados foi observada uma diminuição de RECK e TIMP-2 em culturas que expressam E7 e E6E7 de HPV16, passamos a investigar se essa diminuição estaria correlacionada com modificações na migração destas células, assim como com os

níveis de FAK e P-FAK. Observamos através do ensaio de ferida (Fig. 33 do Apêndice E) que não há diferenças na migração das células na presença de E7 e E6E7 em relação ao controle pLXSN, e que, apesar de preliminares, os resultados indicam que os níveis de P-FAK estão diminuídos na presença destes oncogenes (Fig. 34 do Apêndice D).

No entanto, as vias que estão atuando na diminuição de RECK na presença das oncoproteínas virais E7 ainda não estão esclarecidas. São propostas duas possíveis vias que estariam regulando o promotor de RECK: uma através da associação de E7 com Histonas deacetilases (HDACs) e outra através da inibição de sítios responsivos a fatores transcricionais por E7.

As histonas deacetilases são enzimas que catalisam a remoção de grupos acetil de resíduos de lisina em histonas. Elas possuem um papel central na regulação da transcrição gênica e outros processos biológicos envolvendo a cromatina. Além disso, alguns estudos sugerem que as HDACs estão envolvidas na regulação do ciclo, proliferação e diferenciação celular, bem como no desenvolvimento de tumores, sendo que os inibidores de HDACs (HDIs) são utilizados como potenciais agentes anti-tumorais (revisto por Sengupta N & Seto E, 2004).

A associação entre E7 e HDACs foi observada através de ensaios utilizando QPHs, expressando E7 ou E6E7 de HPV16 ou 18 incubados na presença de inibidores de HDACs, (butirato de sódio –NAB, tricostatina –TSA) que mostraram uma diminuição da proliferação (parada em G1) e a morte destas células por apoptose, sugerindo que as oncoproteínas virais controlam a proliferação celular via HDACs (Brehm et al., 1999; Finzer et al., 2002 e 2004).

Adicionalmente, foi demonstrado que as HDACs também controlam a expressão de RECK. Liu e cols., (2003a) mostraram em modelos de células de câncer pulmonar que o tratamento destas células com TSA aumentaram a atividade do promotor e os níveis protéicos de RECK, juntamente com a inibição da atividade de MMP-2. A inibição do promotor de RECK por Ha-ras (V12) via o fator transcricional Sp1 foi descrita anteriormente por Sasahara e cols. (1998). Em outro estudo, Chang e cols. (2004) observaram que células que expressam Ha-ras (V12) incubadas com TSA apresentaram maior atividade do promotor de RECK, sugerindo que na presença de H-ras as HDACs podem estar inibindo o promotor de RECK.

Outra forma de inibição do promotor de RECK seria a ação direta de E7 em sítios transcripcionais. Como por exemplo, E7 regula a expressão do gene de ciclina E (importante regulador do ciclo celular) através da ativação do seu promotor via sítios E2F/Sp1 (Vogt et al., 1999). Em um modelo de carcinoma nasofaríngeo, foi observado que RECK está atuando na interação vírus-câncer, pois a linhagem TW04 (carcinoma nasofaríngeo) infectada pelo Epstein-Barr vírus (EBV), possui uma maior produção de MMP-9 e apresenta um fenótipo invasivo e metastático devido ao papel da proteína viral LMP1 (latent membrane protein -proteína latente de membrana 1) ao reprimir a transcrição do sítio Sp1 do promotor de *RECK* (Liu et al., 2003b).

Portanto, de acordo com os dados apresentados pelos nossos modelos, nos hipotetizamos que a oncoproteína viral E7 poderia estar associada à HDACs, diminuindo a atividade do promotor de RECK, ou estaria agindo diretamente no promotor de RECK via Sp1.

Uma vez que a regulação das MMPs depende de múltiplos passos, como a tradução do RNAm, secreção e ativação, mesmo após a caracterização das MMPs em níveis de RNAm e protéico, foi necessário saber o possível papel funcional destas enzimas em nossos modelos de culturas em monocamadas e organotípicas.

O ensaio de zimografia e a quantificação da atividade de MMP-9 mostraram que para as culturas em monocamadas expressando E6wt há um aumento da atividade desta MMP, mas, no entanto, quando as oncoproteínas E6E7 são expressas juntas, os níveis de atividade de MMP-9 permanecem semelhantes ao controle pLXSN. Como o ensaio de zimografia mostra a atividade das MMPs que foram secretadas, e, portanto dispersas no meio de cultura, foi necessário investigar onde se localizava esta atividade no microambiente celular. Os ensaios utilizando DQ gelatina não mostraram diferenças evidentes de atividade entre as culturas através da quantificação da gelatina solubilizada. No entanto, os dados sugerem que a degradação ocorre devido à ação de gelatinases. Importante notar que no ensaio de imunocitoquímica, as células que expressam E7wt e E6E7 estão menos marcadas para RECK, sugerindo que as oncoproteínas podem estar atuando no contrabalanceamento de atividade das MMPs.

No contexto tecidual, nas amostras de *rafts*, observamos no componente epitelial um aumento de atividade de MMP-9 nos *rafts* que expressam E7wt e E6E7 em relação ao controle pLXSN, e no componente dérmico, vemos que apesar da atividade ser menor em

E7wt do que no controle, quando as duas oncoproteínas estão expressas juntas, não há diferenças em relação controle. Interessantemente, vemos que a atividade de MMP-9 na derme depende da interação com o epitélio, uma vez que não observamos atividade desta MMP no equivalente dérmico sozinho. Já a atividade de MMP-2 está relacionada com a presença dos fibroblastos e colágeno tipo I, uma vez que há uma maior atividade desta MMP no componente dérmico em relação à epiderme.

Os dados de atividade de MMPs sugerem que o epitélio das culturas organotípicas de E6E7 se assemelha as amostras de carcinomas *in situ*, onde é encontrada a atividade de MMP-2 e MMP-9 nas células tumorais, uma vez que não foi estudada a porção estromal através de ensaios de microdissecção (Sheu et al., 2003).

Yoshida e cols., (2008), em modelo de *rafts* que expressam E7wt de HPV18, descrevem através de ensaio de imunohistoquímica, a presença de MMP-2 e MMP-9 apenas no citoplasma de fibroblastos, não apresentando a proteína no epitélio. Diferentemente de Yoshida, nossos resultados de zimografia mostram que tantos os queratinócitos das culturas organotípicas quanto o equivalente dérmico, isto é, os fibroblastos, expressam MMPs e que estão ativas.

Em um recente trabalho, Pahler e cols., (2008), demonstraram em modelo murino de carcinoma cervical que macrófagos do infiltrado tumoral e neutrófilos são responsáveis pela liberação de MMP-9 no estroma tumoral. O modelo de cultura organotípica mostra que os queratinócitos do epitélio e os fibroblastos do equivalente dérmico também expressam MMP-9 e que possuem maior atividade na presença de E6E7, sugerindo a ação dos queratinócitos e sua interação com o microambiente para o início do processo tumoral.

As interações das oncoproteínas de HPV na promoção da imortalização e transformação celular são bem descritas. No entanto, o papel de E6 e E7 na indução e /ou degradação de proteínas relacionadas com os processos de migração e invasão celular ainda necessitam ser esclarecidos.

O aumento da atividade e da expressão são duas razões importantes pelas quais as MMPs estão associadas à invasão e metástase tumoral. No entanto, a ausência ou redução dos fatores inibitórios, rompe o balanço entre MMPs e seus inibidores, promovendo um microambiente favorável ao desenvolvimento e progressão das neoplasias.

Este trabalho mostra pela primeira vez que as oncoproteínas E6E7 de HPV16 estão relacionadas com a diminuição dos inibidores endógenos RECK e TIMP-2, e que, somente

quando estão sendo expressas no contexto do microambiente 3D, observamos a diminuição de RECK juntamente com o aumento de atividade de MMP-9, em culturas que se assemelham a displasias severas.

Portanto, os nossos resultados apontam que as oncoproteínas E6E7 de HPV16 podem ser consideradas os fatores iniciais para o desequilíbrio entre MMPs e RECK/TIMP-2, sugerindo que em uma fase pré-invasiva do carcinoma cervical, não somente as MMPs, mas, principalmente seus inibidores são críticos para início da progressão tumoral.

6) CONCLUSÕES

- ✚ As oncoproteínas E7 e E6E7 de HPV16 estão associadas com a diminuição de RECK em culturas organotípicas de queratinócitos e em culturas cultivadas em monocamada.
- ✚ Em culturas cultivadas em monocamada, a infecção por E6E7 de HPV 16 diminuiu os níveis de TIMP-2.
- ✚ A atividade de MMP-9 está aumentada nas culturas organotípicas transduzidas com as oncoproteínas E7 e E6E7 de HPV16, não sendo o mesmo observado para as culturas cultivadas em monocamadas que expressam as mesmas oncoproteínas.
- ✚ O tratamento com TNF induziu o aumento da expressão gênica, níveis protéicos e a atividade somente de MMP-9 nos modelos de culturas cultivadas em monocamada e em culturas organotípicas, independente da presença das oncoproteínas virais.

7)REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem Pharmacol.** Nov 30;72(11):1605-21. Epub 2006 Aug 4. 2006. Review.

Akgül B, García-Escudero R, Ghali L, Pfister HJ, Fuchs PG, Navsaria H, Storey A. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. **Cancer Res.** Mar 15;65(6):2216-23,2005.

Akgül B, Pfefferle R, Marcuzzi GP, Zigrino P, Krieg T, Pfister H, Mauch C. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, MMP-13, and MT1-MMP in skin tumors of human papillomavirus type 8 transgenic mice. **Exp Dermatol.** Jan;15(1):35-42, 2006.

Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr Opin Genet Dev.** Feb;18(1):3-10. Epub 2008 Mar 5. 2008. Review.

Arafa M, Boniver J, Delvenne P. Detection of HPV-induced cervical (pre) neoplastic lesions: a tissue microarray (TMA) study. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** Oct;16(5):422-32. 2008.

Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. **J Clin Microbiol.** May;44(5):1755-62,2006.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci**, v. 115(Pt 19), p.3719-27, 2002.

Baldi CVM. Efeito do fator de necrose tumoral (TNF- α) em queratinócitos humanos que expressam as proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano tipo 16 (HPV16). São Paulo; 2008 [Tese de Doutorado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo].

Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev.** Sep;25(3):409-16. 2006. Review.

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

Basile JR, Zacny V, Münger K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. **J Biol Chem.** Jun 22;276(25):22522-8. Epub 2001 Apr 16. 2001.

Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.50(2), p.97-116, 1998.

Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? **Cancer Cell**. Jan;7(1):17-23. 2005. Review.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. Nov 18;432(7015):332-7. 2004. Review.

Boccardo E. Efeito do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) sobre as células imortalizadas por Papilomavírus (HPV). São Paulo; 2002 [Tese de Doutorado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo].

Boccardo E, Noya F, Broker TR, Chow LT, Villa LL. HPV-18 confers resistance to TNF- α in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology**. Oct 25;328(2):233-43, 2004.

Boccardo E, Manzini Baldi CV, Carvalho AF, Rabachini T, Torres C, Barreta LA, Brentani H, Villa LL. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor- α . **Carcinogenesis**. Mar;31(3):521-31. Epub 2009 Dec 30, 2010.

Bornstein J, Lahat N, Kinarty A, Revel M, Abramovici H, Shapiro S. Interferon-beta and -gamma, but not tumor necrosis factor- α , demonstrate immunoregulatory effects on carcinoma cell lines infected with human papillomavirus. **Cancer**. Mar 1;79(5):924-34. 1997.

Bosch FX ,Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res. Review**, v.89(2), p.183-90, 2002.

Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**. May 12. 2010.

Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K; HPV-PathogenISS Study Group. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. **Anticancer Res**. Mar-Apr;26(2B):1543-56, 2006.

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth.**EMBO J**. May 4;18(9):2449-58, 1999.

Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kuhnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. **Gynecol Oncol**, v. 84(2), p.222-7, 2002.

Chang C & Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **TRENDS in Cell Biology Rev**, Nov, v.11(11), p.S37-43, 2001.

Chang HC, Li LT, Hung WC. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis supressor RECK. **Cellular Signalling**, v. 16, p.675-79, 2004.

Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR. RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Rev**. Dec;26(3-4):675-83. 2007. Review.

da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Correa TC, Winnischofer SM, Nakano F, Boccardo E, Villa LL, Sogayar MC, Maria-Engler SS. *Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence*. **Biochem Cell Biol**. Oct;**84(5)**:713-9, 2006.

Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Reich R. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. **Gynecol Oncol**, Jun, v.73(3), p.372-82, 1999.

Demers GW, Espling E, Harry JB, Etscheid BG, Galloway DA. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. **J Virol**. Oct;**70(10)**:6862-9, 1996.

Delvenne P, Hubert P, Jacobs N, Giannini SL, Havard L, Renard I, Saboulard D, Boniver J. The organotypic culture of HPV-transformed keratinocytes: an effective in vitro model for the development of new immunotherapeutic approaches for mucosal (pre)neoplastic lesions. **Vaccine**. Mar **21;19(17-19)**:2557-64, 2001.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, Review. Jun 20, v.324(1), p.17-27. 2004.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**. May;110(5):525-41. Review, 2006.

Du YY, Dai DQ, Yang Z. Role of RECK methylation in gastric cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol**. Feb 21;16(7):904-8, 2010.

Eckert RL, Crish JF, Efimova T, Dashti SR, Deucher A, Bone F, Adhikary G, Huang G, Gopalakrishnan R, Balasubramanian S. Regulation of involucrin gene expression. **J Invest Dermatol**. Jul;123(1):13-22. Review, 2004.

Egeblad M & Werb Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. **Nature Reviews/Cancer**, v.2, p.161-74, 2002.

Fehrman F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**. Aug 11;22(33):5201-7. Review, 2003.

Finzer P, Ventz R, Kuntzen C, Seibert N, Soto U, Rösl F. Growth arrest of HPV-positive cells after histone deacetylase inhibition is independent of E6/E7 oncogene expression.

Virology. Dec 20;304(2):265-73, 2002.

Finzer P, Krueger A, Stöhr M, Brenner D, Soto U, Kuntzen C, Krammer PH, Rösl F. HDAC inhibitors trigger apoptosis in HPV-positive cells by inducing the E2F-p73 pathway.

Oncogene. Jun 17;23(28):4807-1, 2004.

Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev Panam Salud Publica**, v. 6(4), p.223-33, 1999.

Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF. Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. **Virology.** Sep 30;262(2):344-54, 1999.

Foster SA, Galloway DA. Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. **Oncogene.** Apr 18;12(8):1773-9, 1996.

Furumoto K., Arii S, Mori A, Furuyama H, Gorin Rivas M J, Nakao T, Isobe N, Murata T, Takahashi C, Noda M, Imamura M. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology**, v. 33(1), p.189-95, 2001.

Gaiotto MA, Focchi J, Ribalta JL, Stavale JN, Baracat EC, Lima GR, Guerreiro da Silva ID. Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. **Am J Obstet Gynecol**, May, v.190(5), p.1278-82, 2004.

Gewin L, Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. **J Virol.** Aug;75(15):7198-201, 2001.

Gilles C, Polette M, Piette J, Munaut C, Thompson EW, Birembaut P, Foidart JM. High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. **Int J Cancer**, v.65(2), p.209-13, 1996.

Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. **J Cell Sci.** Jan;114(Pt 1):131-139, 2001a.

Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. **J Biol Chem.** Jun 22;276(25):22341-50. Epub 2001 Apr 10. 2001b.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**. Mar-Apr;16(2):83-97. Review, 2006.

Heilmann V & Kreienberg R. Molecular Biology of Cervical Cancer and Its Precursors. **Curr Womens Health Rep**, Review. v.2(1), p. 27-33, 2002.

Helt AM, Galloway DA. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. **J Virol**. Aug;75(15):6737-47, 2001.

Holvoet S, Vincent C, Schmitt D, Serres M. The inhibition of MAPK pathway is correlated with down-regulation of MMP-9 secretion induced by TNF-alpha in human keratinocytes. **Exp Cell Res**. Oct 15;290(1):108-19. 2003.

Howley PM. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. **Fundamental Virology**. Third edition. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), Lippincott-Raven Publishers, 1996.

Ikenberg H, Teufel G, Schmitt B, Kommoss F, Stanimirovic B, Pflaiderer A. Human papillomavirus DNA in distant metastases of cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 48(1), p.56-60, 1993.

Itoh Y. & Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem**, v.38, p.21-36, 2002.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 14/05/2010.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin**, Jan-Feb; v.55(1), p.10-30, 2005. Erratum in: **CA Cancer J Clin**, Jul-Aug; v.55(4),p.259, 2005.

Jeon HW, Lee YM. Inhibition of histone deacetylase attenuates hypoxia-induced migration and invasion of cancer cells via the restoration of RECK expression. **Mol Cancer Ther**. May;9(5):1361-70. Epub 2010 May 4, 2010.

Jordan LB Monaghan H. Pathology of the cervix: recent developments. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**,. Review. v.16(4), p.248-54., 2004.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**. Dec 8;438(7069):820-7. 2005.

Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. **Oncol Rep**, v. 9(3), p. 565-9. 2002.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**. Apr 2;141(1):52-67, 2010.

Kiyono T, Foster SA, Koop JJ, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**. Nov 5;396(6706):84-8, 1998.

Kleefstrom J, Arighi E, Littlewood T, Jäättelä M, Saksela E, Evan GI, Alitalo K. Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. **EMBO J**. Dec 15;16(24):7382-92. 1997.

Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa O, Hakura A. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. **Virology**. Apr;200(1):130-9.1994.

Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. **Expert Rev Mol Med**, Sep 22, v.2003, p.1-39, 2003.

La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlation of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British Journal of Cancer**, v.90, p.1414-21, 2004.

Lee CW, Lin CC, Lin WN, Liang KC, Luo SF, Wu CB, Wang SW, Yang CM. TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. Mar;292(3):L799-812. Epub 2006 Dec 8. 2007.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**. 2(2):329-33, 2007.

Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F, Spandidos DA, Mazzarino C. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). **Int J Oncol**. Apr;34(4):897-903. 2009. Review

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, Dec, v.25(4), p.402-8, 2001.

Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. **Cancer Res**, Jun 15, v.63(12), p.3069-72, 2003a.

Liu LT, Peng JP, Chang HC, Hung WC. RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. **Oncogene**, Nov 13, v.22(51), p.8263-70, 2003b.

Liu J, Zhan M, Hannay JA, Das P, Bolshakov SV, Kotilingam D, Yu D, Lazar AF, Pollock RE, Lev D. Wild-type p53 inhibits nuclear factor-kappaB-induced matrix metalloproteinase-9 promoter activation: implications for soft tissue sarcoma growth and metastasis. **Mol Cancer Res.** Nov;**4(11)**:803-10. Epub 2006 Oct 31. 2006.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev.** Jun;**68(2)**:362-72. 2004. Review.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with folin-phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265-75, 1951.

Malejczyk J, Malejczyk M, Majewski S, Breitburd F, Luger TA, Jablonska S, Orth G. Increased tumorigenicity of human keratinocytes harboring human papillomavirus type 16 is associated with resistance to endogenous tumor necrosis factor-alpha-mediated growth limitation. **Int J Cancer.** Feb 15;**56(4)**:593-8. 1994.

Mareel M & Leroy A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. **Physiol Rev**, v.83, p.337-76, 2003.

Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M, Imamura M. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clin Can Res**, v. 9, p.1779-1784, 2003.

McCance DJ, Kopan R, Fuchs E, Laimins LA. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Oct;**85(19)**:7169-73, 1988.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, Review. Feb, v.82(1), p.15-33, 2001.

Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. **Biotechniques.** Oct;**7(9)**:980-2,984-6,989-90.1989.

Min W, Wen-li M, Zhao-hui S, Ling L, Bao Z, Wen-ling Z. Microarray analysis identifies differentially expressed genes induced by human papillomavirus type 18 E6 silencing RNA. **Int J Gynecol Cancer.** May;**19(4)**:547-63. 2009.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. **Histochem Cell Biol.** Jun;**129(6)**:705-33. Epub 2008 May 7. Review. 2008.

Morris MA, Young LS, Dawson CW. DNA tumour viruses promote tumour cell invasion and metastasis by deregulating the normal processes of cell adhesion and motility. **Eur J Cell Biol.** Sep;**87(8-9)**:677-97. Epub 2008 May 12. 2008. Review

Morioka Y, Monypenny J, Matsuzaki T, Shi S, Alexander DB, Kitayama H, Noda M. The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and

anterior-posterior polarity in fibroblasts. **Oncogene**. Mar 19;28(11):1454-64. Epub 2009 Jan 26. 2009.

Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**. Nov 26;20(54):7888-98. 2001. Review.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v.348(6), p.518-27, 2003.

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol Aspects Med**. Oct;29(5):290-308. Epub 2008 May 24. 2008. Review

Mysliwiec AG. & Ornstein D L. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, v.1(4), p.208-19, 2002.

Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, v.52, p.255-264, 2002.

Nair A, Karunagaran S, Nair MB, Sudhakaran PR. Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. **J Cancer Res Clin Oncol**. Feb;129(2):123-31, 2003.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**. Feb 15;69(3):562-73. Epub 2006 Jan 5. Review, 2006.

Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci**. Oct;98(10):1505-11. Epub 2007 Jul 23. Review, 2007.

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. **J Virol**. May;75(9):4283-96. 2001.

Noda M. Mechanisms of reversion. **Faseb J**, v.7(10), p.834-40, 1993.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev**, v.22(2-3), p.167-75, 2003.

Nuovo GJ, MacConnell PB, Simsir A, Valea F, French D. Correlation of the in Situ Detection of Polymerase Chain Reaction-amplified Metalloproteinase Complementary DNAs and Their Inhibitors with Prognosis in Cervical Carcinoma. **Cancer Res**, v.55, p.267-75, 1995.

Nuovo GJ. In SITU Detection of PCR-Amplified Metalloproteinase cDNAs, Their Inhibitors and Human papillomavirus Transcripts in Cervical Carcinoma Cell Lines. **Int J Cancer**, v.71, p.1056-60, 1997.

Oh J, Takahashi R., Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander D B, Ide C, Horan T P, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v.107(6), p. 789-800, 2001.

Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. **Cancer Res.** Dec 15;64(24):9062-9, 2004.

Oh J, Diaz T, Wei B, Chang H, Noda M, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. **Oncogene.** Jul 13;25(30):4230-4. Epub 2006 Feb 20. 2006.

Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**, Review. Sep, v.2(9), p.657-72, 2002.

Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, Chen YY, Murdoch C, Nozawa H, Lewis CE, Hanahan D. Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. **Neoplasia.** Apr;10(4):329-40. 2008.

Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine.** Aug 31;24 Suppl 3:S3/11-25. Review, 2006.

Partridge JJ, Madsen MA, Ardi VC, Papagiannakopoulos T, Kupriyanova TA, Quigley JP, Deryugina EI. Functional analysis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases differentially expressed by variants of human HT-1080 fibrosarcoma exhibiting high and low levels of intravasation and metastasis. **J Biol Chem.** Dec 7;282(49):35964-77. Epub 2007 Sep 25. 2007.

Pinto, A. P.; Collaço, L. M. Revisão das alterações citomorfológicas da infecção pelo vírus do papiloma humano em citologia cervicovaginal. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.37, n.1, p.57-61, 2001.

Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. **Crit Rev Oncol Hematol**, Review. v.49(3), p.179-86, 2004.

Pupa SM, Ménard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. **J Cell Physiol.** Sep;192(3):259-67. 2002. Review.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa, LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and

invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98 (2), p.181-184, 2003.

Ramirez F, Rifkin DB. Cell signaling events: a view from the matrix. **Matrix Biol.** Apr;22(2):101-7. 2003. Review.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.** Jan;38(Database issue):D227-33. Epub 2009 Nov 5, 2010.

Rhee JS. & Coussens LM. RECKing MMP function: implications for cancer development. **Trends Cell Biol**, v.12(5), p.209-11, 2002.

Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, Sethia KK, Ellis V, Collins AT, Maitland NJ, Ball RY, Edwards DR. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. **Br J Cancer**, Jun, v.20;92(12), p.2171-80, 2005.

Sasahara RM, Takahashi C, Noda M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v.264(3), p.668-75, 1999.

Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, Noda M, Sogayar MC. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev**, v.26(6), p. 435-43, 2002.

Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v.95(17), p.1336-43, 2003.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc.** 3(6):1101-8. 2008.

Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. **J Cell Biochem.** Sep 1;93(1):57-67. Review, 2004.

Shah KV, Kesis TD, Shah F, Gupta JW, Shibata D, Jones RW. Human papillomavirus investigation of patients with cervical intraepithelial neoplasia 3, some of whom progressed to invasive cancer. **Int J Gynecol Pathol**, Apr, v.15(2), p.127-30,1996.

Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Hsu SM. Increased Expression and Activation of Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases Is Associated with the Progression and Recurrence of Human Cervical Cancer. **Cancer Res**, v. 63, p.6537-42, 2003.

Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. **Breast Cancer Res Treat**, v72(1), p.69-77, 2002.

Silveira Corrêa TC, Massaro RR, Brohem CA, Taboga SR, Lamers ML, Santos MF, Maria-Engler SS. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **J Cell Biochem.** May;110(1):52-61, 2010.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer.** Aug 1;121(3):621-32. 2007.

Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H, Pfister HJ. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. **J Gen Virol,** May, v.86(Pt 5), p.1291-6, 2005.

Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Jul;83(13):4680-4, 1986.

Solomon D & Nayar R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes.** 2^o edition, 2004.

Song SH, Lee JK, Hur JY, Kim I, Saw HS, Park YK. The expression of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and cyclooxygenase-2 in relation to human papilloma viral load and persistence of human papillomavirus after conization with negative margins. **Int J Gynecol Cancer. Nov-Dec;16(6):2009-17,** 2006.

Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. **Cancer,** v.97(11), p.2710-5, 2003.

Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, Brown M, Coote JH, Arrand JR. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. **J Virol.** Aug;74(16):7284-97, 2000.

Steenbergen RD, Parker JN, Isern S, Snijders PJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Broker TR, Chow LT. Viral E6-E7 transcription in the basal layer of organotypic cultures without apparent p21cip1 protein precedes immortalization of human papillomavirus type 16- and 18-transfected human keratinocytes. **J Virol.** Jan;72(1):749-57. 1998.

Sternlicht MD & Werb Z. How matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v.17, p.463-516, 2001.

Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Sci Signal.** Jul 8;1(27):re6. 2008. Review.

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum Pathol.** Feb;23(2):117-28, 1992.

Swanton C & Jones N. Strategies in subversion: de-regulation of the mammalian cell cycle by viral gene products. **Int J Exp Path,** v.82, p.3-13, 2001.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v.95(22), p.13221-6, 1998.

Takagi S, Simizu S, Osada H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Res.** Feb 15;69(4):1502-8. Epub 2009 Feb 10. 2009.

Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Wada H, Tanaka F. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. **Eur J Cancer,** v.40(10), p.1617-23. 2004

Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, Mukogawa T, Matsumoto H, Kondo S, Takahashi C, Noda M, Nakajima Y. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin Cancer Res,** v.10(16), p.5572-9, 2004.

Tang S, Tao M, McCoy JP Jr, Zheng ZM. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. **J Virol.** May;80(9):4249-63, 2006.

Tellier E, Nègre-Salvayre A, Bocquet B, Itohara S, Hannun YA, Salvayre R, Augé N. Role for furin in tumor necrosis factor alpha-induced activation of the matrix metalloproteinase/sphingolipid mitogenic pathway. **Mol Cell Biol.** Apr;27(8):2997-3007. Epub 2007 Feb 5. 2007.

Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R, Münger K. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. **Oncogene.** Jun 21;20(28):3629-40,2001.

Vieira KB, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. **Cancer Res.** May 15;56(10):2452-7,1996.

Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res.**71:321-41. Review, 1997.

Villa LL, Bernard HU, Kast M, Hildesheim A, Amestoy G, Franco EL. Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference - HPV 2001. **Virus Research**, v.89, p.163-73, 2002.

Vogt B, Zerfass-Thome K, Schulze A, Botz JW, Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Regulation of cyclin E gene expression by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **J Gen Virol**. Aug;80 (Pt 8):2103-13, 1999.

Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jun 29;353(1370):831-7. Review, 1998.

Welm B, Mott J, Werb Z Developmental biology: vasculogenesis is a RECK without RECK. **Curr Biol**, Review. v.12(6), p.R209-11, 2002.

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Res**. Jun 1;64(11):3878-84. Review, 2004.

Westphal K, Akgül B, Storey A, Nindl I. Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures. **Cell Oncol**.;31(3):213-26. 2009.

Wolf JK, Franco EL, Arbeit JM, Shroyer KR, Wu TC, Runowicz CD, Tortolero-Luna G, Herrero R, Crum CP. Innovations in understanding the biology of cervical cancer. **Cancer, Review**. V.98(9 Suppl), p.2064-9, 2003.

Woodhouse E, Chuaqui RF, Liotta LA. General Mechanisms of Metastasis. **CANCER, Supplement v.80(8)**, p.1529-37, 1997.

Wright TC Jr, Cox JT, Assad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2001. Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v.189(1), p.295-304, 2003.

Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol**. Apr;211(1):19-26. 2007. Review.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, v.36(1), p.128-37, 2003.

Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, Nakamura H, Sakai H. Ras modifies proliferation and invasiveness of cells expressing human papillomavirus oncoproteins. **J Virol**. Sep;82(17):8820-7. Epub 2008 Jun 25. 2008.

Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. **Rev Med Virol**. Mar;19(2):97-113. 2009. Review

Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Munoz N, Weiss SJ, Cho KR. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. **Cancer Res**, Aug 1, v.65(15), p.6543-50, 2005.

Zhou CY, Yao JF, Chen XD. Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and their inhibitor-TIMP 1,2 in human squamous cell carcinoma of uterine cervix. **Ai Zheng**, v.21(7), p.735-9, 2002.

E. Schwarz, U.K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, and H. zur Hausen: Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells. **Nature** 314, 111-114, 1985.

zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**, **1288**:F55-78, 1996.

zur Hausen H Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, Review. **v.2(5)**, p.342-50. 2002.

zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. **Virology**. Sep 15;392(1):1-10. 2009.

APÊNDICE A: Ensaio de western blot para as proteínas p53 e pRb.

A presença das oncoproteínas virais pode ser detectada indiretamente pela expressão das proteínas degradadas por E6 e E7, respectivamente, proteína p53 e proteína do retinoblastoma humano pRb. Para pRb, observamos os menores níveis de expressão desta proteína nas culturas transduzidas com E7 e E6E7, em relação ao controle e E6wt (Fig. 27A). Além disso, podemos observar os níveis menores de expressão de p53 nas culturas transduzidas com E6 e E6E7, e os níveis maiores de p53, quando há expressão somente do oncogene E7wt e no controle pLXSN (Fig 27B).

Figura 27: Determinação dos níveis protéicos de pRb e p53 por western blot em amostras de culturas em monocamada e culturas organotípicas. β-actina foi utilizada como controle de quantidade protéica.

APÊNDICE B: Padronização da técnica de Real-Time PCR

Para utilizarmos a técnica de *Real-Time* PCR, foi necessária a padronização da quantidade de amostra e da concentração de *primers* que seriam utilizados. De acordo com experiência anterior do laboratório de Patologia, foram utilizados “pools” de amostras, isto é, o “pool” inicial contém a mesma quantidade de cada amostra (no total 7 amostras QPH, QPH pLXSN, QPH E6, QHP E6Δ9-13, QPH E7, QPH E726G e QPH E6E7). Para cada cultura, isto é, monocamada e organotípica, foram feitos dois pools, um para as amostras não tratadas e um para as tratadas com TNF. A partir do pool inicial foram feitas duas diluições, 1:60 e 1:120. Para cada diluição foram utilizadas duas concentrações de *primers*: 1,6μM e 2,4 μM. Observamos que os pools das amostras amplificam nas duas diluições, com diferenças de 0,5 a 1 ciclo entre elas.

Como exemplo, mostramos a padronização para o “pool” de amostras de *Rafts* não tratados com TNF. Observamos que na mesma diluição, as diferenças entre as amplificações para as 2 concentrações de *primers* são pequenas, para todos os *primers* em estudo, com exceção de MMP-9 e RECK, onde vemos que as duplicatas não estão coincidentes. Para os outros “pools”, isto é, amostras de *rafts* tratados com TNF, amostras de culturas em monocamada não tratadas e tratadas com TNF, foram feitas as mesmas curvas. Os resultados obtidos foram muito parecidos, sendo que na diluição de 1:120, sempre encontramos algumas das duplicatas com valores de amplificação um pouco diferentes entre si (Fig 28). Desta forma, foi escolhida a diluição de amostras de 1:60 e a concentração de primers de 1,6μM, para todos os genes, para todas as amostras utilizadas.

Figura 28: Padronização do Real-Time PCR utilizando o “pool” das amostras de *rafts* não tratados com TNF. Gráficos mostrando as curvas de amplificações de cada gene estudado. As setas em preto indicam a diluição de 1:60 e as vermelho a diluição de 1:120 do pool das amostras.

APÊNDICE C: Validação da análise da expressão gênica para utilização do método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta C_t$)

Para a validação, foram gerados “pools” das amostras, isto é, das amostras de *Rafts* tratados ou não com TNF, e o mesmo para as culturas em monocamadas, portanto, 4 “pools” diferentes.

A partir dos dados de amplificação das diluições seriadas dos pools (1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 e 1:10000), foi calculado o Delta Ct de cada gene de interesse (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-2 e RECK) em relação ao gene constitutivo Tubulina. O Delta Ct foi "plotado" contra o logaritmo da diluição de cDNA, e calculada a regressão linear destas curvas. Se a inclinação da reta (*slope*) fosse menor ou igual a 0,1 a eficiência de amplificação seria comparável, podendo-se assim utilizar este método para determinar a expressão gênica.

Como exemplo, apresentamos as curvas de validação para as amostras de *rafts*. As figuras 29 e 30 mostram os gráficos de validação do método de Delta-Delta Ct dos genes de interesse em relação ao gene constitutivo Tubulina, respectivamente para as amostras de *rafts* não tratadas e tratadas com TNF. O mesmo foi feito para as amostras de culturas em monocamadas.

Figura 29: Gráficos da validação do método de Delta-Delta Ct para as amostras de *rafts* não tratadas. Série 1 f(x); Série 2 (y).

Figura 30: Gráficos da validação do método de Delta-Delta C_t para as amostras de *rafts* tratadas com TNF- α . Série 1 $f(x)$; Série 2 (y) .

Os gráficos mostram que os genes de interesse possuem a mesma eficiência de amplificação em relação à Tubulina, mostrando que o tratamento com TNF, não alterou a eficiência de amplificação. Assim como para as amostras não tratadas, foram utilizadas 5 diluições para todos os genes, com exceção a RECK, que foram utilizadas 3 diluições (1:100, 1:500 e 1:1000), uma vez que a expressão deste gene é baixa.

Na tabela 4, são apresentados os valores de slope para todas as culturas estudadas, mostrando que os genes de interesse possuem a mesma eficiência de amplificação em relação à Tubulina. Também testamos outros genes constitutivos, como GAPDH, mas este não apresentou eficiência de amplificação em relação aos genes escolhidos em algumas situações, apesar da inclinação ficar bem próxima de 0,1. Desta forma, a Tubulina, foi escolhida como gene constitutivo para análises posteriores de expressão gênica.

Tabela 4: Valores da inclinação das retas (slope) após cálculo da regressão linear. Amostras de *rafts* e culturas em monocamada tratadas ou não com TNF.

Gene constitutivo / Tubulina	Genes de interesse				
	MMP-2	MMP-9	MMP-14	TIMP-2	RECK
<i>Raft</i> (-TNF)	0,069	0,046	0,048	0,003	0,130
<i>Raft</i> (+TNF)	0,084	0,095	0,031	0,024	0,051
Monocamada (-TNF)	0,014	0,017	0,009	0,106	0,012
Monocamada (+TNF)	0,035	0,047	0,031	0,105	0,044

APÊNDICE D: Atividade gelatinolítica utilizando DQ™ gelatina

O ensaio de atividade gelatinolítica utilizando a DQ™ gelatina visa localizar a degradação da gelatina por MMP-2 e MMP-9 (gelatinases) nas culturas em monocamada em estudo. De acordo com o fabricante, onde ocorre a degradação da gelatina, é observada uma fluorescência verde, no caso, a fluoresceína.

Todas as culturas de queratinócitos utilizadas (pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7) foram plaqueadas em lamínulas recobertas com DQ™ gelatina + gelatina, e como controle, em lamínulas recobertas apenas com a gelatina. Como controle da atividade de MMPs, foi adicionado Ilomastat ao meio de cultura de células plaqueadas com DQ™ gelatina.

Ao quantificarmos a gelatina solubilizada no sobrenadante dos queratinócitos cultivados no ensaio de DQ™ gelatina observamos que todas as culturas possuem atividade gelatinolítica em relação ao controle (Fig.31) ($P < 0.05$), no entanto, não foi possível detectar diferenças entre elas. A intensidade de fluorescência medida no meio de cultura na presença do Ilomastat é semelhante à encontrada nos controles, sugerindo que a degradação da DQ™ gelatina ocorre, em parte, pela ação das gelatinases (MMP-2 e MMP-9).

Figura 31: Quantificação da intensidade de fluorescência liberada pela gelatina solubilizada no meio de cultura proveniente da degradação DQ™ gelatina. Os dados representam media e desvio-padrão. * $P < 0.05$.

Na figura 32, podemos observar que há um padrão de fluorescência semelhante entre as culturas, mostrando que a presença das oncoproteínas virais não modula a degradação da DQTM gelatina entre as culturas estudadas. Vemos também que na presença de Ilomastat, um inibidor de MMPs, e no controle (células cultivadas na ausência de DQTM gelatina) não há marcação fluorescente, sugerindo pouca atividade gelatinolítica local.

Figura 32: Atividade gelatinolítica de pLXSN, E6wt, E7wt e E6E7. A degradação da DQ gelatina está representada pela fluorescência em verde. Coloração nuclear com DAPI (azul). Nas imagens podemos observar a fluorescência verde da degradação da DQ gelatina nas amostras MERGE (sobreposição DQ gelatina+DAPI), e o “background” verde fosco produzido pela gelatina normal na qual a DQ gelatina está diluída nas amostras Controle e Ilomastat (Dq+Ilo25 μ M). Aumento 400x.

APÊNDICE E: Ensaio de Ferida

O ensaio de ferida foi realizado com as culturas em monocamada que expressam pLXSN, E7wt e E6E7. Estas culturas foram utilizadas, pois, uma vez que os níveis protéicos de RECK estavam diminuídos nas culturas que expressam E7, gostaríamos de saber essa diminuição estaria associada com mudança no padrão de migração destas células. A figura 33 mostra que não houve diferenças na migração entre as culturas estudadas, comparando-se os tempos de 0 e 12 horas.

Figura 33: Ensaio de ferida com as amostras de QPHs que expressam as oncoproteínas E7wt e E6E7 de HPV16. As fotos foram tiradas nos tempos de 0 e 12 horas após a ferida ser feita. Aumento 40x.

APÊNDICE F: Ensaio de western blot para as proteínas FAK / FAK fosforilada

Para o ensaio de western blot de FAK total e FAK fosforilada foram utilizadas as culturas em monocamada de QPHs que expressam as oncoproteínas virais E6 e/ou E7 de HPV16. A fim de compararmos os níveis protéicos nas culturas infectadas com os de carcinomas cervicais, foram utilizadas as linhagens de carcinoma cervical SiHa, CaSki (HPV16 positivas) e C33A (HPV negativa). A figura 34 mostra que todas as linhagens apresentam níveis protéicos de FAK total semelhantes, no entanto, para os QPHs que expressam E7wt e E6E7, há uma discreta diminuição nos níveis protéicos de FAK fosforilado, em relação aos QPHs controle (pLXSN). Entre as linhagens de carcinomas cervical, observamos que estas apresentam níveis protéicos de FAK fosforilada um pouco maiores que a linhagem C33A. Este ensaio, no entanto necessita de repetição para futuras análises.

Figura 34: Determinação dos níveis protéicos de FAK e FAK fosforilada por western blot em amostras de culturas em monocamada de QPHs que expressam as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16 e linhagens de carcinoma cervical.

ANEXO A: OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

- Estágio no laboratório Profa. Dra. Raquel F. Gerlach da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para aprendizado da técnica de zimografia *in situ* e imunolocalização. Período 22-25 de julho de 2007.

- Participação e apresentação de pôster na “Gordon Research Conference: Matrix Metalloproteinases” em Barga-Lucca, Itália no período de 03 a 08 de junho de 2007. “Regulation of MMP-2 and MMP-9 expression by HPV16 oncoproteins in organotypic cultures”. Laura Beatriz da Silva Cardeal, Enrique Boccardo, Luisa Lina Villa, Silvy Stuchi Maria-Engler.

- Desenvolvimento do capítulo intitulado “Marcadores Tumoriais e Neoplasias”, Laura Beatriz da Silva Cardeal, Adagmar Andriollo e Silvy Stuchi Maria-Engler, para o livro Bioquímica Clínica sob coordenação das Profas.Dras. Dulcinéia Abdalla e Ana Campa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2007.

- Monitora PAE da disciplina de Citologia Clínica (FBC 0532) ministrada no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob supervisão da Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler. Período: agosto-dezembro 2007.

- Estágio de Doutorado na University of California San Francisco (UCSF) - Departamento de Anatomia, no laboratório da Profa. Dra. Zena Werb (<http://anatomy.ucsf.edu/werbwebsite>), sob orientação da Dra. Mikala Egeblad. Desenvolvimento dos projetos: 1. “Role of collagen remodeling by matrix metalloprotenase (MMP) 2 and -14 during epithelial branching and invasion in mammary gland development and breast cancer; 2. “Role of MMP-9 in breast cancer and angiogenesis”. Maio – Novembro de 2008.

- Curso de curta duração: I Workshop de Melanoma: Emerging novel cytotoxic agents with chemotherapeutic potential: melanoma as a model. 29-30 janeiro de 2009. Coordenadoras: Maria-Engler,SS; Barros, SBM; Verhaegen M.
- Participação no I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas, realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Período 04-05 de agosto de 2009.
- Supervisão da aluna de Iniciação Científica Marina Lígia Maiztegui Gutierrez - Desenvolvimento do projeto: “Avaliação do processo autofágico em carcinoma cervical uterino”, bolsista PIBIC/CNPq. (Maio 2009 até presente momento).
- Participação e apresentação de pôster no “X Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular-SIMEC 2009 e IV Simpósio Internacional de Matriz Extracelular”, em Búzios, Rio de Janeiro, no período de 01-04/11/2009. Poster: “Regulation of MMPs expression by HPV16 oncoproteins in primary epithelial cultures”. Laura Beatriz da Silva Cardeal, Enrique Boccardo, Tatiana Rabachini, Luisa Lina Villa, Silvy Stuchi Maria-Engler.
- Curso de curta duração: II Workshop de Melanoma 2010. 20 e 21 de Janeiro de 2010, ministrado pelo Dr. Damià Tormo - Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas de Madrid, Espanha. Coordenadoras: Maria-Engler SS e Barros SBM.
- Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. Review. Brohem CA, Cardeal LBS, Tiago M, Barros SBM, Maria-Engler SS. Manuscrito em revisão, 2010.

- Aulas ministradas:

- a. “Metaloproteínases de Matriz e seus Inibidores” e “HPV e Câncer cervical”.
Disciplina de pós-graduação: Processos de Invasão Celular - FBC5753 -
Responsável Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
- b. “Metaloproteínases”. Disciplina de pós-graduação: FBC5780-1- Estratégias
farmacêuticas de prevenção do dano cutâneo induzido por radiação solar:
antioxidantes naturais. Responsáveis: Dra. Cristina Dislich Ropke e Profa.
Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros.
- c. “Papilomavírus Humano – HPV” e montagem de aula prática/teórica sobre a
técnica de Papanicolaou. Disciplina de graduação: Citologia Clínica
FBC532. Responsável Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

ANEXO B: Documento da Comissão de Ética em Pesquisa **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 70/2006

São Paulo, 23 de maio de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 22 de maio de 2006, **APROVOU** o projeto "*Caracterização de atividade e expressão de metaloproteinases de matriz e seus inibidores RECK e TIMP-2 em culturas organotípicas infectadas com Papilomavírus Humano (HPV)*" (Protocolo CEP nº 376), apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP