

**EFEITOS DA INFECÇÃO POR HPV NA  
RESPOSTA IMUNE E NA EXPRESSÃO GÊNICA  
GLOBAL MEDIADOS PELO FATOR DE  
NECROSE TUMORAL**

**LARA TERMINI**

Tese de Doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências

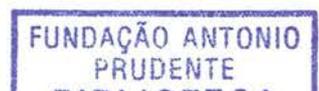
Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

Co-Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa

São Paulo

2005



## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Termini, Lara

**Efeitos da infecção por HPV na resposta imune e na expressão gênica global mediados pelo fator de necrose tumoral** / Lara Termini – São Paulo, 2005.

182p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:  
Oncologia.

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

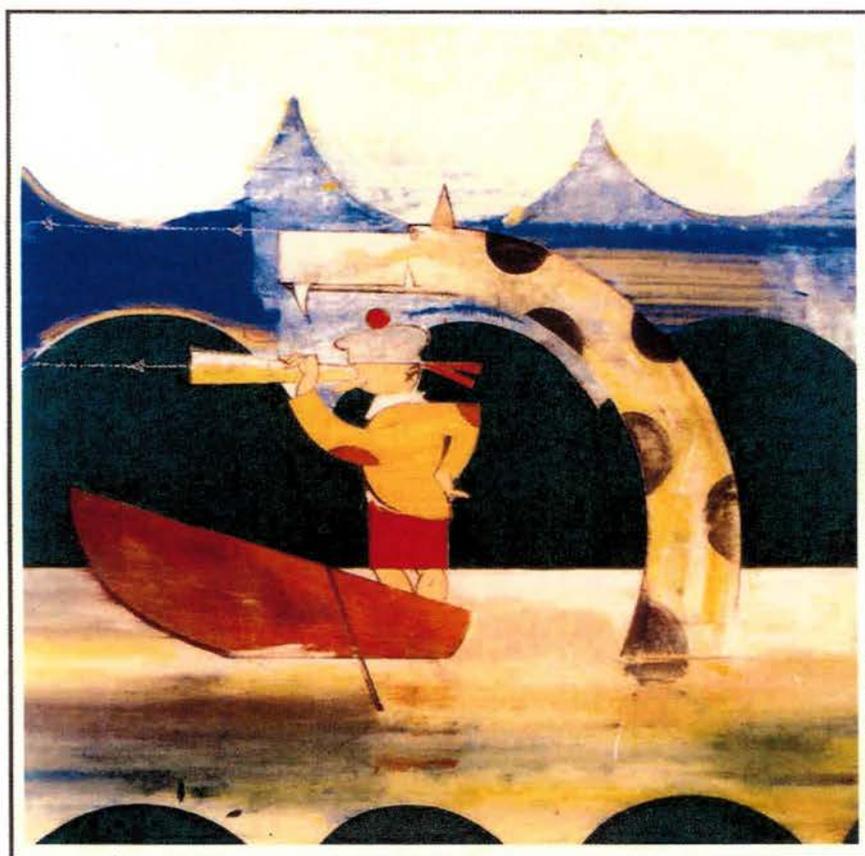
Descritores: 1. PAPILOMAVÍRUS/imunologia. COLO UTERINO/lesões.  
3. TNF/imunologia. 4. ANÁLISES MICROARRAY. 5. CHIPS DE  
EXPRESSÃO GÊNICA. 6. QUERATINÓCITOS.

## DEDICATÓRIA

Aos pacientes,

pois são eles que dão o verdadeiro sentido ao nosso trabalho

Para todos aqueles que continuam procurando



**The Artist. Hunterian Art Gallery, University of Glasgow**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Luiz Fernando, pela orientação, confiança em meu trabalho e pela eterna disponibilidade de sua sala, computador e impressoras. Acredito que você é uma referência em resposta inflamatória.

À minha co-orientadora Luisa, pela ajuda e oportunidade.

Ao Enrique Mario, por ter me convencido que a pesquisa vale a pena, pela sua incondicional ajuda e amizade e pela super colaboração neste estudo (mas eu ainda sou a chefe do TNF...). Muito obrigada, seria pouco.

Ao LABRI, Alex, Adriana Abalen, Bárbara, Chamberlein, Graziela, Bianca, Ana Helena (minha irmã Jackson), Mariana Marques, Mariana Santos, Gisele-Louca, Sarah, Anna Coló, Waleska, Nair, Wladmir, Patricia Possikão, Regina, Cíntia, Isabela e Andréa. Sinto dizer que não deixarei vocês em paz tão cedo.

Aos eternos EX-LABRI: Eduardo Abrantes (muito obrigada pela sua ajuda, discussões e Torta da Vovó Donald!), Suzana, Bia, Sibeles e Luciana

À Aline, por fazer a diferença no LABRI

À Anna Coló e Waleska, pela colaboração e ajuda, sem vocês este trabalho não teria sido concluído. Valeu meninas!

Ao Laboratório de Virologia, Enrique Mario, Lepique, Patricia Savio, Patricia Thomann, Aline, Zézão, Johninho, Andrea, Laura, Katiana, Tatiana, Carina Victoria e Stella Solaris. Não adianta, vocês me amam.

À Verônica Buck, por permitir que eu veja a vida à cores. Obrigada pela força e amizade.

À Patricia Lopes, Ana Paula e Elis, pela amizade.

À todos os amigos do Instituto Ludwig.

Ao Instituto de Matemática e Estatística da USP: Jordão, Hirata e Gustavo, pelas análises e paciência.

Ao laboratório de Biologia Computacional, em especial à Helena.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, na pessoa do Prof. Brentani, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos funcionários do Ludwig e Hospital do Câncer.

Ao Departamento de Pós-Graduação do Hospital do Câncer, Ana Maria e Márcia, pela ajuda e paciência.

As bibliotecárias Sueli, Rose e Francyne, pela revisão bibliográfica e ajuda.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Termini L. **Efeitos da infecção por HPV na resposta imune e na expressão gênica global mediados pelo fator de necrose tumoral.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

A infecção persistente por alguns tipos de HPV de alto risco (ex. tipos 16 e 18), é o principal fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais e lesões precursoras do carcinoma do colo uterino. Diversos estudos sugerem que a resposta imune mediada por células é fundamental para o controle e eliminação das infecções por estes e outros vírus. Um dos principais mediadores/reguladores deste tipo de resposta é o fator de necrose tumoral (TNF). O TNF apresenta efeito antiproliferativo em queratinócitos primários humanos e em queratinócitos imortalizados por HPV16 (HF698). Por outro lado, queratinócitos imortalizados com HPV18 (HF18Nco) e diversas linhagens derivadas de tumores da cérvix uterina, são resistentes ao efeito antiproliferativo desta citocina. Estes dados sugerem que a aquisição de resistência à este fator é um evento importante na carcinogênese mediada por HPV. No entanto, os eventos moleculares associados ao efeito diferencial do TNF nestas linhagens são, até o momento, desconhecidos. No presente estudo, foram analisados os níveis de expressão de algumas proteínas envolvidas na via de ativação do fator NF- $\kappa$ B. Utilizando um anticorpo anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , foi detectada uma proteína de aproximadamente 20 kDa, induzida após 12 horas de tratamento com TNF e atingindo altos níveis de expressão após 60 horas de tratamento. Esta

proteína é expressa de forma constitutiva na linhagem imortalizada com HPV16. Experimentos que visam identificar esta proteína estão em andamento. Além disso, foi avaliado o efeito do tratamento com TNF por 3 e 60 horas na expressão gênica global através da técnica de *microarray*. Esta análise foi realizada em queratinócitos primários humanos e nas duas linhagens imortalizadas com HPV. Assim, observamos a expressão diferencial de alguns genes comuns às duas linhagens sensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF. Por outro lado, o mesmo perfil não foi observado na linhagem resistente. Estes genes estão relacionados à resposta imune e inflamatória, proliferação e diferenciação celular e ao controle da transdução de sinal de diversas vias. A identificação de genes e proteínas cruciais nestes eventos, permitirá avanços no controle da infecção por HPV, além de contribuir para a caracterização de marcadores moleculares na progressão tumoral do câncer cervical.

## SUMMARY

Termini L. **HPV infection effects on immune response and global gene expression mediated by tumor necrosis factor**. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Persistent infection by some high risk HPV types (ie: types 16 and 18) is the main risk factor for the development of cervical intraepithelial neoplasia and the precursor lesions of cervical cancer. Many studies suggest that cell-mediated immunity is important for viral infection control and clearance. Tumor necrosis factor (TNF) is one of the main mediators/regulators of inflammatory response. TNF has a potent anti-proliferative effect on normal and HPV16 immortalized keratinocytes (HF698). On the other hand, HPV-18 immortalized keratinocytes (HF18Nco) and several cervical carcinoma-derived cell lines, are resistant to TNF. These observations suggest that the acquisition of TNF-resistance may constitute an important step in HPV mediated carcinogenesis. However, the molecular basis of this difference is not well understood. In the present study, we analyzed the effect of TNF on NF- $\kappa$ B pathway activation. Using an anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody, we detected a protein of 20 kDa induced after 12 hours of treatment with TNF. This protein reached higher levels of expression after 60 hours of treatment. Besides, we found that this protein is constitutively express in the HPV16-immortalized cell line. Several experiments are being conducted in order to identify this protein. Furthermore, we addressed the effect of 3 and 60 hours of TNF treatment on global gene expression of primary human keratinocytes and two

HPV-immortalized keratinocytes-derived cell lines. We observed the differential expression of several genes common to both TNF-sensitive cell lines. On the other hand, this was not observed in the TNF-resistant cell line. These genes are involved in immune and inflammatory response, cell proliferation and differentiation and in signal transduction control. Understanding the mechanisms of host response regulation, as well as the identification of new genes and proteins involved in its regulation, may provide new strategies for HPV infection control.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa físico do genoma do HPV16.....	8
<b>Figura 2</b>	Amostras utilizadas nos experimentos de <i>microarray</i> .....	52
<b>Figura 3</b>	Efeitos do TNF na expressão de IKK $\alpha$ .....	57
<b>Figura 4</b>	Efeitos do TNF na expressão de I $\kappa$ B $\beta$ e SUMO.....	59
<b>Figura 5</b>	Efeitos do TNF na expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ em amostras de culturas organotípicas.....	60
<b>Figura 6</b>	Efeitos do TNF na expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ em linhagens.....	62
<b>Figura 7</b>	Efeitos do TNF na expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ em queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 após 60 horas de tratamento.....	64
<b>Figura 8</b>	Comparação do efeito do TNF na expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ em queratinócitos normais e imortalizados.....	66
<b>Figura 9</b>	Efeitos do TNF na expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ em amostras originadas de culturas organotípicas que caracterizam displasias leve, moderada e severa.....	69
<b>Figura 10</b>	Cinética de I $\kappa$ B $\alpha$ em queratinócitos normais e imortalizados com HPV18.....	70
<b>Figura 11</b>	Avaliação do efeito do tratamento com TNF em relação à detecção da banda de 20 kDa.....	72
<b>Figura 12</b>	Avaliação da expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ utilizando um vetor recombinante.....	75
<b>Figura 13</b>	Efeito do tratamento com lactacistina nos níveis da banda de 20 kDa.....	77
<b>Figura 14</b>	Efeito do tratamento com actinomicina D e cicloheximida nos níveis de transcrito e expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ .....	79
<b>Figura 15</b>	Imunoprecipitação da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ .....	81
<b>Figura 16</b>	Desenho experimental utilizado nas análises de <i>microarray</i> .....	83

<b>Figura 17</b>	Etapas para obtenção das lâminas hibridizadas.....	85
<b>Figura 18</b>	Representação gráfica tipo MA-plot da lâmina <i>MAIN</i> .....	88
<b>Figura 19</b>	Representação gráfica tipo MA-plot da lâmina <i>SWAP</i> .....	89
<b>Figura 20</b>	Representação gráfica tipo MM-plot.....	90
<b>Figura 21</b>	Representação esquemática das análises realizadas por ANOVA.....	92
<b>Figura 22</b>	<i>Heatmap</i> baseado em função do tipo celular.....	94
<b>Figura 23</b>	<i>Heatmap</i> baseado em função do tempo.....	95
<b>Figura 24</b>	<i>Heatmap</i> baseado em função do tratamento com TNF.....	96
<b>Figura 25</b>	<i>Heatmap</i> baseado nos genes que diferenciam as amostras sensíveis e resistentes, após 3 horas de tratamento com TNF.....	98
<b>Figura 26</b>	<i>Heatmap</i> baseado nos genes que diferenciam as amostras sensíveis e resistentes, após 60 horas de tratamento com TNF.....	103
<b>Figura 27</b>	Diagrama de Venn das comparações 1, 2 e 3.....	114
<b>Figura 28</b>	Diagrama de Venn das comparações 10, 13 e 16.....	115
<b>Figura 29</b>	Diagrama de Venn das comparações 19, 20 e 21.....	116
<b>Figura 30</b>	Diagrama de Venn das comparações 4, 5 e 6.....	117
<b>Figura 31</b>	Diagrama de Venn das comparações 11, 14 e 17.....	118
<b>Figura 32</b>	Diagrama de Venn das comparações 22, 23 e 24.....	119
<b>Figura 33</b>	Diagrama de Venn das comparações 12, 15 e 18.....	120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Lista de genes diferencialmente expressos após 3 horas de tratamento com TNF.....	99
<b>Tabela 2</b>	Lista de genes diferencialmente expressos após 60 horas de tratamento com TNF.....	104
<b>Tabela 3</b>	Comparações entre as amostras e seus objetivos.....	109
<b>Tabela 4</b>	Genes relacionados à apoptose, ciclo celular..... e citocinas	110
<b>Tabela 5</b>	Genes dos Diagramas de Venn.....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	<i>analysis of variance</i>
<b>aRNA</b>	RNA amplificado
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>CDK</b>	quinase dependente de ciclina
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CKI</b>	inibidor de CDK
<b>Cy3</b>	<i>cyanine 3 dye</i>
<b>Cy5</b>	<i>cyanine 5 dye</i>
<b>DMEM</b>	<i>dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	mistura de desoxinucleosídeos trifosfato
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>HLA</b>	antígeno linfocitário humano
<b>HPV</b>	papilomavírus humano
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	inibidor de NF- $\kappa$ B
<b>ILPC</b>	Ludwig Institute For Cancer Research
<b>KSFM</b>	<i>Keratinocyte Serum Free Medium</i>
<b>LCR</b>	região controladora ( <i>Long Control Region</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>NHFK</b>	queratinócitos humanos primários normais
<b>NIC</b>	neoplasia intraepitelial cervical
<b>NK</b>	células <i>Natural Killer</i>
<b>ORESTES</b>	<i>open reading frames EST sequences</i>
<b>ORF</b>	janela aberta de leitura ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reação em cadeia da Polimerase
<b>Poli (A)</b>	cauda de resíduos de adenina
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>

<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	ácido ribonucleico mensageiro
<b>Rnase</b>	Ribonuclease
<b>rNTP</b>	mistura de ribonucleosídeos trifosfato
<b>RT</b>	transcrição reversa
<b>RT-PCR</b>	transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SSC</b>	solução salina com citrato de sódio
<b>SV40</b>	<i>Simian Virus 40</i>
<b>TAE</b>	solução de tris, acetato e EDTA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TS</b>	<i>template switch</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Carcinoma do Colo Uterino.....	1
1.1.1	Epidemiologia.....	1
1.1.2	Histopatologia.....	2
1.1.3	Fatores de Risco.....	2
1.2	Papilomavírus Humano (HPV).....	3
1.2.1	Classificação e Taxonomia dos Papilomavírus.....	3
1.2.2	Associação com Carcinoma do Colo Uterino.....	5
1.2.3	Estrutura e Função das Proteínas Virais.....	7
1.2.4	Potencial Oncogênico do HPV e Imortalização Celular.....	13
1.2.5	Fatores Coadjuvantes à Oncogenicidade do HPV.....	15
1.3	A Resposta Imune Contra Infecções Virais.....	17
1.3.1	Aspectos Gerais.....	17
1.3.2	Resposta Imune Contra o Papilomavírus Humano.....	18
1.3.3	O Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	21
1.3.3.1	Aspectos Gerais.....	21
1.3.3.2	O TNF e seus Receptores.....	22
1.3.3.3	A Sinalização mediada pelo TNF.....	23
1.3.3.4	TNF e a Resposta Imune Epitelial.....	26
1.3.3.5	TNF e HPV.....	28
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	Objetivo Geral.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33

<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1	Cultura de Células.....	34
4.2	Tratamento com TNF.....	35
4.3	Extração de Proteínas e Western Blot.....	36
4.4	Extração de RNA e Northern Blot.....	38
4.5	Clonagem de I $\kappa$ B $\alpha$ Humano no Vetor de Expressão PCDNA3.1/V5-HIS(B).....	40
4.6	Transfecção Transiente.....	41
4.7	Imunoprecipitação.....	42
4.8	Ensaio de Inibição do Proteasoma.....	42
4.9	Efeito da Interrupção do Tratamento com TNF na detecção da banda de 20 kDa.....	43
4.10	Ensaio com Cicloheximida e Actinomicina D.....	43
4.11	<i>Microarray</i> .....	44
4.11.1	Fixação de cDNA nas Lâminas.....	44
4.11.2	Extração e Amplificação do RNA.....	45
4.11.3	Hibridização.....	49
4.11.4	Captação das Imagens.....	53
4.11.5	Quantificação das Imagens.....	53
4.11.6	Normalização dos Dados.....	54
4.11.7	Análise dos dados.....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	56
5.1	Análise do Efeito do TNF e HPV nos Níveis de IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ e Sumo.....	56
5.1.1	Análise da banda de 20 kDa utilizando-se um anticorpo policlonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$ em diversos tipos celulares.....	63
5.1.2	Determinação do tempo mínimo de tratamento com TNF para a detecção da banda de 20 kDa.....	67
5.1.3	Efeito da interrupção do tratamento com TNF na detecção da banda de 20 kDa.....	71

5.1.4	Ensaio para determinar se a banda de 20 kDa corresponde à um produto de degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ .....	73
5.1.5	Estratégia para purificação e identificação da banda .....	80
5.2	Efeito da Infecção por HPV na Expressão Gênica Global e sua Interferência na Sinalização Mediada por TNF.....	82
5.2.1	Normalização dos dados.....	86
5.2.2	Análise por ANOVA.....	91
5.2.3	Comparação das Amostras Duas a Duas.....	97
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>124</b>
6.1	Análise do Efeito do TNF e HPV nos Níveis de IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ e Sumo.....	130
6.2	Efeito da Infecção por HPV na Expressão Gênica Global e sua Interferência na Sinalização Mediada por TNF.....	139
6.2.1	Seleção de genes através dos <i>clusters</i> hierárquicos.....	143
6.2.2	Seleção de genes através das listas comparativas.....	148
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>152</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>154</b>

## ANEXOS

- Anexo 1** Lista dos genes diferencialmente expressos nas 24 comparações
- Anexo 2** Artigo: Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARCINOMA DO COLO UTERINO

### 1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma do colo uterino é um dos mais freqüentes na população feminina. Embora este tipo de neoplasia seja passível de prevenção e tratamento por meio de programas preventivos de saúde, sua taxa de mortalidade e incidência estão entre as mais elevadas entre os tumores malignos que acometem as mulheres. Aproximadamente 450.000 casos novos são diagnosticados a cada ano no mundo (SHERLAW-JOHNSON et al. 1997), sendo esta neoplasia responsável por aproximadamente 200.000 óbitos anualmente, dos quais 80% em países em desenvolvimento (BOSCH et al. 1997; PISANI et al. 2002). No Brasil, estima-se que o câncer de colo do útero seja a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo superado pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama e que seja a quarta causa de morte por câncer em mulheres. Para o ano de 2003, as Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer apontaram a ocorrência de 16.480 novos casos e 4.110 óbitos por câncer do colo do útero (Ministério da Saúde 2005). A alta incidência de carcinoma do colo uterino em regiões menos desenvolvidas parece estar ligada a uma combinação de fatores como desnutrição, falta de prevenção para as lesões precursoras, alto índice de paridade e higiene (FRANCO et al. 1997).

### 1.1.2 Histopatologia

O carcinoma do colo uterino é, na grande maioria dos casos, consequência da evolução contínua de lesões precursoras não-invasivas, caracterizadas por atipias celulares denominadas displasias. Estas lesões, denominadas neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), podem ser divididas em três categorias baseadas no grau de diferenciação epitelial: NIC I (alteração displásica até um terço do epitélio), NIC II (acomete de um a dois terços do epitélio) e NIC III (de dois terços à espessura total do epitélio alterado, onde se inclui o carcinoma *in situ*). Outro tipo de classificação que vem sendo utilizada é a de Bethesda, que divide as lesões em intra-epiteliais escamosas de baixo grau (inclui NIC I) e lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (inclui NIC II e NIC III) (LUFF 1992).

### 1.1.3 Fatores de Risco

O carcinoma do colo uterino comporta-se epidemiologicamente como uma doença sexualmente transmissível (zur HAUSEN 1996). Os principais fatores de risco associados à esta neoplasia são: baixo nível sócio-econômico, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, multiparidade, tabagismo, uso de contraceptivos orais e infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (WINKELSTEIN 1990; MUÑOZ e BOSCH 1996; FRANCO et al. 1997).

Vários estudos epidemiológicos apontam alguns tipos de papilomavírus humano (HPV) como principal agente etiológico do carcinoma do colo uterino (LÖRINCZ et al. 1992; SCHIFFMAN et al. 1993; FRANCO et

al. 1999; WALBOOMERS et al. 1999). A infecção anogenital por HPV é preferencialmente transmitida através do contato sexual e sua incidência é mais elevada em mulheres jovens (ROUSSEAU et al. 2000; International Agency for Research on Cancer-IARC 2005 – [www.dep.iarc.fr](http://www.dep.iarc.fr)). A associação de outros fatores de risco na carcinogênese induzida por HPV, como o tabagismo, alto índice de paridade e o uso de contraceptivos orais, ainda é controversa (VILLA e FRANCO 1989; MUÑOZ e BOSCH 1996; VILLA 1997).

Alguns estudos transversais relatam que de 20 a 40% das mulheres sexualmente ativas e com citologia cervical normal apresentam infecção por HPV (EVANDER et al. 1995). Por outro lado, em mulheres com lesões intra-epiteliais de baixo e alto grau, a prevalência deste tipo de infecção varia de 50 a 90% e nas mulheres que apresentam tumores cervicais de 93 a 99,7% (BOSCH et al. 1995; WALBOOMERS et al. 1999).

## **1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

### **1.2.1 Classificação e Taxonomia dos Papilomavírus**

Os papilomavírus são vírus de DNA, mucoepiteliotrópicos e altamente espécie-específicos, não havendo nenhum exemplo de papilomavírus de uma espécie causando infecção produtiva em outra espécie. Sua capacidade tumorigênica é conhecida há muito em animais, tais como: coelhos e gado bovino. Pertencem à família *Papillomaviridae* e são capazes de infectar animais e humanos. Trata-se de vírus não-envelopados, com um

diâmetro de aproximadamente 50 nm, possuem simetria icosaédrica e um genoma dupla fita circular de aproximadamente 8000 pares de base (8 Kb) (FAVRE et al. 1977; IARC 2005).

Até o momento, mais de 100 tipos de HPV foram identificados e completamente seqüenciados. Destes, aproximadamente 35 tipos infectam o trato ano-genital. A classificação dos tipos de HPV é feita com base na identidade de suas seqüências de DNA. Atualmente, variações no gene L1 menores que 2% são consideradas como variantes de tipos de HPV, variações entre 2 e 10% como subtipos e variações maiores que 10% como novos tipos de HPV (de VILLIERS et al. 2004).

Por serem vírus epiteliotrópicos, possuem especificidade por diferentes sítios anatômicos. Os HPV podem ser divididos em 3 grupos: 1) tipos que acometem mucosa e genitais; 2) tipos não-genitais e 3) tipos específicos da epidermodisplasia verruciforme, que é uma doença rara, caracterizada por lesões cutâneas verrucosas disseminadas.

Os tipos não-genitais infectam a pele e causam as verrugas comuns e plantares, sendo lesões com probabilidade muito baixa de malignização. Os tipos genitais são encontrados principalmente na vulva, colo uterino, pênis e ânus, mas podem causar lesões também na cavidade oral, faringe e laringe (IARC 2005).

### 1.2.2 Associação com Carcinoma do Colo Uterino

Os tipos de HPV que infectam o trato anogenital podem ser classificados segundo o risco de estarem associados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino (zur HAUSEN 1996; LÖRINCZ et al. 1992):

- tipos de baixo risco oncogênico – (por exemplo: HPV 6, 11, 42, 43 e 44), associados à lesões benignas do colo uterino e à verrugas genitais;
- tipos de alto risco oncogênico – (por exemplo: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 58), associados à lesões intra-epiteliais de alto grau, especialmente carcinomas uterinos invasivos.

Estudos caso-controle contribuíram para o esclarecimento da associação epidemiológica entre a infecção por HPV e o câncer cervical. Mulheres com infecção por HPV têm risco relativo em média 50 vezes maior de desenvolver câncer cervical, quando comparadas às mulheres não portadoras deste tipo de infecção (ROZENDAAL et al. 1996).

A história natural da infecção por HPV ainda não está completamente elucidada. Observou-se que a maior parte das infecções não leva ao aparecimento de lesões visíveis, podendo ser de fato eliminadas pelo sistema imune em curto período de tempo (IARC 2005). Contrariamente, observou-se que alterações severas no sistema imune resultaram em uma maior prevalência das infecções por HPV clinicamente aparentes (KIVIAT et al. 1993).

Embora a maior parte das infecções por HPV seja transiente, há um pequeno número de mulheres com infecção persistente pelo vírus, nas quais a presença de um mesmo tipo de HPV é detectada mais de uma vez, durante determinado período de tempo. Estas mulheres têm risco maior de desenvolver neoplasias cervicais, quando comparadas às mulheres que eliminaram a infecção pelo HPV (KOUTSKY et al. 1992; HILDESHEIM et al. 1994; HO et al. 1995; EVANDER et al. 1995; FRANCO et al. 1997). Desta forma, o estabelecimento da infecção persistente é um dos passos cruciais para o desenvolvimento das lesões cervicais.

Geralmente, ocorre um intervalo de tempo relativamente longo entre a infecção primária por tipos de HPV de alto risco oncogênico e o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais, carcinoma *in situ* e câncer invasivo (NOBBENHUIS et al. 1999). Lesões de alto e baixo graus no colo uterino têm um pico de incidência entre 25 e 30 anos de idade, enquanto que a incidência de câncer cervical está entre 55 e 65 anos, podendo ser mais precoce em certas populações, incluindo a do Brasil (IARC 2005). Esta observação sugere que o período de incubação é de muitos anos entre a infecção inicial e o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial e que a progressão para câncer invasivo provavelmente requer entre 20 e 30 anos (zur HAUSEN 1996).

A caracterização de fatores associados à persistência do vírus, poderia identificar mulheres que estão sob maior risco de virem a desenvolver uma neoplasia cervical maligna. Vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de identificar determinantes potenciais da

detecção persistente de HPV nas células cervicais (FRANCO et al. 1999; HERRERO et al. 2000).

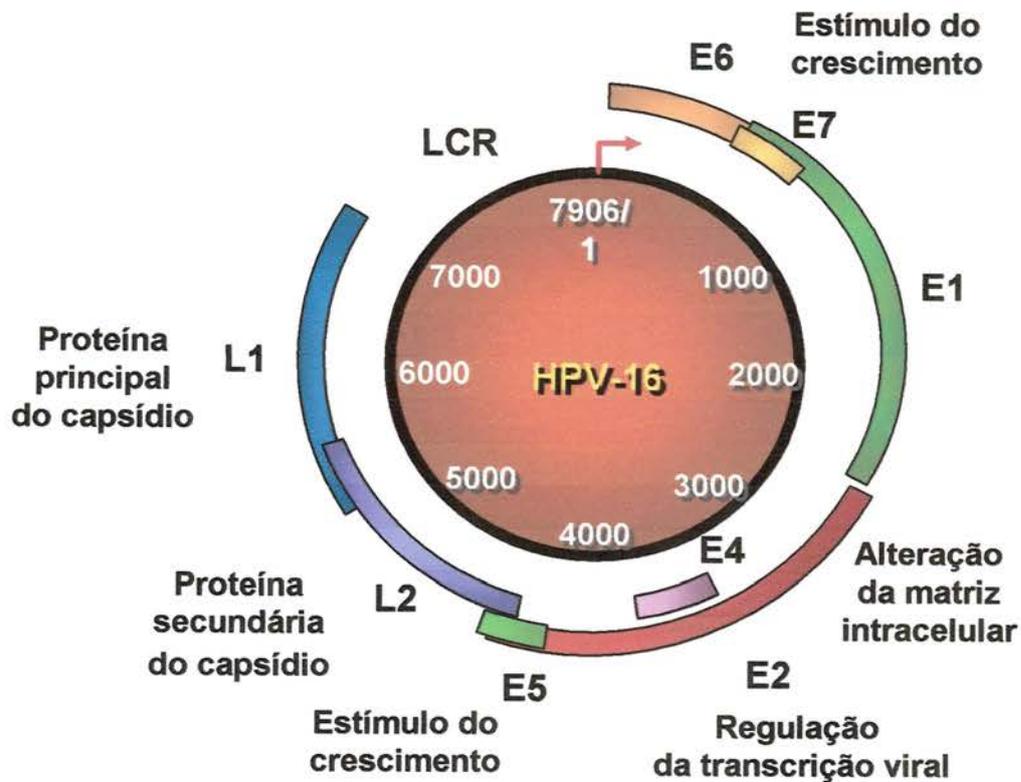
### 1.2.3 Estrutura e Função das Proteínas Virais

O DNA viral de aproximadamente 8 Kb encontra-se associado à proteínas histonas e é envolvido por 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais (L1 e L2), codificadas pelo vírus (HOWLEY 1996).

Com relação à organização do genoma viral, três fragmentos subgenômicos podem ser identificados: região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e a região denominada LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*). Sete ou oito genes estão localizados na região precoce e dois na tardia. Os genes da região precoce, denominados de E1, E2,..., E8, têm função no controle da replicação e da transcrição do DNA (E2, E8) e, na transformação celular (E5, E6 e E7). Os genes L1 e L2, localizados na região tardia, codificam as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente, e ambas são altamente conservadas entre todos os papilomavírus (BERNARD et al. 1994) (**Figura 1**). Contrariamente aos genes precoces, os genes tardios são expressos nas camadas superficiais do epitélio infectado pelos HPV.

A LCR possui de 500 a 1000 pares de bases e encontra-se entre o gene L1 e E6 (CHAN et al. 1989). Essa região contém a origem de replicação de DNA, em que se ligam fatores de transcrição virais e celulares, além de possuir o promotor precoce principal (BROKER 1987; BROWN e FIFE 1990). O produto de transcrição viral é um RNAm policistrônico cuja

tradução pode gerar mais de uma proteína a partir de uma mesma seqüência codificadora (ARENDS et al. 1990).



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

A proteína viral E1 é uma helicase, que forma complexo com E2, uma proteína reguladora da transcrição viral. Ambas parecem interagir com fatores celulares envolvidos na replicação do DNA do HPV (ANDROPHY 1994). O gene E2 codifica pelo menos duas proteínas diferentes que atuam como fatores de transcrição (BOUVARD et al. 1994). Elas afetam diferentemente a expressão gênica viral e representam os principais reguladores intra-genômicos através da formação de dímeros em sítios específicos de ligação presentes na LCR (THIERRY e YANIV 1987). O rompimento e/ou deleção do gene E2, devido à integração do genoma viral no celular, são eventos freqüentemente observados em biópsias de tecidos tumorais e linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas do colo uterino (SCHWARZ et al. 1985). No desenvolvimento do câncer cervical, o rompimento do gene E2 parece ser um evento tardio, visto que na maior parte das lesões pré-malignas este tipo de alteração não ocorre (DÜRST et al. 1992). No entanto, existem alguns estudos que relatam a integração precoce às lesões NIC II (LEHN et al. 1988).

O papel da proteína E4 ainda não está bem elucidado. Esta proteína parece ser incorretamente classificada como um produto gênico precoce, uma vez que sua detecção ocorre apenas nas camadas mais diferenciadas ou superficiais do epitélio infectado pelo HPV (PALEFSKY et al. 1991). Sugere-se que a proteína E4 esteja envolvida na maturação e na liberação das partículas virais para o meio extracelular (zur HAUSEN 1996).

A proteína E5 é a principal proteína transformante dos papilomavírus bovinos (SCHILLER et al. 1986), por outro lado, nas células infectadas por

HPV, esta proteína não tem o mesmo efeito (PIM et al. 1992). Em lesões precursoras de baixo grau, encontram-se altos níveis de expressão desta proteína, sugerindo alguma função (ainda não estabelecida) nos estágios precoces da infecção por HPV. Contrariamente, o gene E5 está freqüentemente deletado em células de carcinomas cervicais, indicando a ausência de um papel essencial para a manutenção do fenótipo maligno nestas células (zur HAUSEN 2000).

Os genes E6 e E7 são os únicos genes do HPV expressos de forma constitutiva nas linhagens celulares derivadas de carcinomas da cérvix uterina. Estas proteínas cooperam para imortalizar queratinócitos humanos *in vitro* (MÜNGER et al. 1989; WATANABE et al. 1989; HALBERT et al. 1992; zur HAUSEN 1996; LIU et al. 1997).

A proteína E6 de HPV de alto risco possui cerca de 150 aminoácidos e apresenta 4 domínios Cys-X-X-Cys envolvidos na formação de 2 dedos de zinco. Esta proteína tem a capacidade de se ligar ao produto do gene p53, levando à sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (SCHEFFNER et al. 1990 e 1993). Esta interação foi a primeira a ser descrita e é a mais conhecida dentre as diversas e não tão bem elucidadas interações da proteína E6 com proteínas celulares (zur HAUSEN 2000). A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa, cuja função primordial é a manutenção da integridade genômica através da regulação do ciclo celular. Após uma infecção viral, estresse celular ou dano ao DNA, p53 se acumula na célula promovendo a parada do ciclo celular em G0-G1, interrompendo desta forma o processo de replicação celular. Em

determinadas situações, p53 tem a capacidade de desencadear o processo de apoptose, uma forma de morte celular programada (LEVINE 1997). A degradação de p53 promovida por E6 elimina este tipo de controle, levando à instabilidade genômica das células infectadas por HPV. Apenas as proteínas E6 de HPV de alto risco são capazes de degradar p53 (CROOK et al. 1991; LECHNER e LAIMINS 1994). Mais recentemente, STOREY et al. (1998), observaram que E6 de HPV11 (baixo risco) também seria capaz de degradar p53, entretanto, de forma bem menos eficiente do que E6 de HPV de alto risco.

Alguns exemplos de interações de E6 de *HPV* de alto risco, ocorrem com:

- 1) proteína celular E6BP (*E6 binding protein*) (SCHEFFNER et al. 1993);
- 2) telomerase (KLINGELHUTZ et al. 1996);
- 3) ERC55, uma proteína ligante de cálcio, que parece estar localizada no retículo endoplasmático (CHEN et al. 1995);
- 4) proteína de adesão focal paxilina, envolvida na transdução de sinal da membrana plasmática ao citoesqueleto de actina (TONG e HOWLEY 1997);
- 5) hDLG, o homólogo humano da proteína supressora de tumor dos discos de *Drosophila* (KIYONO et al. 1997);
- 6) E6TP1, uma nova proteína do tipo GAP (*GTPase activating protein*) (GAO et al. 1999);
- 7) Bak, uma proteína anti-apoptótica integrante da família das proteínas Bcl-2 e que é degradada por E6 (THOMAS e BANKS 1999);

- 8) Fator de Regulação de Interferon 3 (IRF-3), inibindo a indução do mensageiro de interferon  $\beta$  (RONCO et al. 1998).

A proteína viral E6 também tem atividade modulatória transcricional em vários promotores virais, incluindo o promotor de E2 de adenovírus, o promotor de timidina quinase do vírus *herpes simplex* e o promotor de SV40 (DESAINTES et al. 1992).

O produto do gene E7 de HPV é uma fosfoproteína com cerca de 100 aminoácidos, cuja principal e mais estudada interação é com a forma hipofosforilada de pRb (p105) e com outros membros dessa família (p107 e p130), através de um motivo LxCxE. A proteína supressora de tumor pRb (produto do gene do retinoblastoma) é uma fosfoproteína nuclear de 105 KDa que tem como principal função regular negativamente o ciclo celular (MÜNGER et al. 1989; O'CONNOR et al. 1997). Para exercer esta função, pRb hipofosforilada se acumula em forma de complexo com uma família de importantes fatores de transcrição, denominada E2F, na fase G0/G1 do ciclo celular. Desta forma, genes responsivos à E2F, na sua grande maioria relacionados à proliferação celular (como por exemplo cdc2 e c-myc), não são transcritos. A proteína E7 de HPV de alto risco, tem a capacidade de se ligar ao complexo pRb/E2F, liberando os fatores de transcrição e inativando pRb (DYSON et al. 1989). Alguns exemplos de outras interações da proteína E7 de HPV de alto risco, ocorrem com:

- 1) proteínas inibidoras das quinases dependentes de ciclina p21 e p27 (FUNK et al. 1997; JONES et al. 1997);

- 2) ciclina A e E, formando complexos com função de quinases (ARROYO e BAGCHI 1993);
- 3) Quinase Histona H1 (DAVIES et al. 1993);
- 4) fatores de transcrição da família AP-1, como por exemplo c-jun e com a proteína ligante ao TATA-*box* (MASSIMI et al. 1996);
- 5) subunidade 4 (S4) da enzima ATPase (BEREZUTSKAYA e BAGCHE 1997);
- 6) proteína hTid-1, homólogo da proteína supressora de tumor de *Drosophila* Tid56 (SCHILLING et al. 1998);
- 7) nucleossomo do complexo histona desacetilase (Mi2), inferindo com a possível ligação da proteína E7 nas vias de desacetilação (BREHM et al. 1999);
- 8) enzima glicolítica M2 (piruvato quinase) (ZWERSCHKE et al. 1999);
- 9) p48, uma das proteínas envolvidas na sinalização mediada por interferon  $\alpha$  (BARNARD e MCMILLAN 1999).

#### **1.2.4 Potencial Oncogênico do HPV e Imortalização Celular**

Geralmente, o DNA viral apresenta-se integrado ao genoma celular em lesões malignas como neoplasias intra-epiteliais cervicais de grau III (NIC III), que incluem o carcinoma *in situ*, diferentemente das neoplasias intra-epiteliais cervicais de grau I e II (NIC I e NIC II, respectivamente) e lesões benignas onde o DNA viral apresenta-se na forma epissomal (não integrada) (DÜRST et al. 1985). A integração do DNA viral no genoma celular parece ocorrer ao acaso, mas a quebra do DNA viral geralmente

ocorre entre a extremidade 3' do gene E1 e a extremidade 5' do gene E2. Esta clivagem leva à interrupção do processo de regulação transcricional viral exercido por E2 (HOWLEY 1996). Conseqüentemente, ocorre a síntese contínua das oncoproteínas virais E6 e E7, propiciando a imortalização das células. As lesões intra-epiteliais de alto grau, contendo HPV de alto risco, apresentam altos níveis de expressão de E6 e E7 nas camadas proliferativas, inversamente ao observado nas lesões de baixo grau (zur HAUSEN 1996).

Há mais de uma década, tem sido verificada a interação de genes virais com células epiteliais resultando na alteração do processo de diferenciação normal destas e ocasionando a imortalização celular (DÜRST et al. 1987; PIRISI et al. 1987 e 1988; SCHLEGEL et al. 1988). Diferentes sistemas têm mostrado que as funções das proteínas transformantes codificadas pelos HPV associados ao câncer anogenital em humanos, podem ser reproduzidas *in vitro* (MATLASHEWSKI et al. 1987; PIRISI et al. 1987; KANDA et al. 1988; BEDELL et al. 1989). Dentre esses estudos, os dados iniciais de maior importância, foram a constatação de que os HPV16, 18 e 31, os mais correlacionados à lesões do trato anogenital e com potencial para progressão maligna, podem imortalizar culturas primárias de queratinócitos normais de prepúcio ou células epiteliais da região da cérvix humana (o mesmo não acontece com HPV de baixo risco) (KAUR e McDOUGALL 1988; SCHLEGEL et al. 1988; WOODWORTH et al. 1990).

No processo de imortalização de queratinócitos humanos normais, os HPV de alto risco promovem um desenvolvimento alterado de diferenciação

celular. Estas células tornam-se altamente proliferantes mesmo na presença de fatores indutores de diferenciação celular, tais como, fatores protéicos presentes no soro e altas concentrações de cálcio, continuando a se dividir indefinidamente *in vitro*, não se diferenciando (SCHLEGEL et al. 1988). No entanto, é importante salientar que estas células não são transformadas, pois não são capazes de gerar tumores quando inoculadas em animais atímicos. Eventos adicionais, como por exemplo a ativação de oncogenes, são necessários para que a transformação celular direcionada à progressão maligna ocorra (PIRISI et al. 1988; STOREY et al. 1998).

A atividade biológica das oncoproteínas E6 e E7 é dependente do tipo de célula onde são expressas. Estas proteínas são suficientes para transformar fibroblastos de roedores (VOUSDEN et al. 1988; BEDELL et al. 1989). A expressão de E7 leva à imortalização de queratinócitos humanos normais, enquanto que E6 necessita de eventos adicionais para induzir o mesmo efeito (HALBERT et al. 1991). Vale ressaltar, que a expressão destas proteínas, principalmente a sua cooperação, é fundamental para a progressão e manutenção do fenótipo imortalizado ou maligno, visto que a inibição da expressão *in vitro* destas proteínas, promove a inibição da proliferação celular e em alguns casos a reversão do fenótipo maligno ou imortalizado (BARBOSA e SCHLEGEL 1989; zur HAUSEN 2000).

### **1.2.5 Fatores Coadjuvantes à Oncogenicidade do HPV**

A imunodeficiência celular, seja iatrogênica ou adquirida, aumenta a progressão de lesões do colo uterino associadas ao HPV (PETRY et al.

1994). Em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), ocorre um aumento da prevalência de infecções por HPV e de lesões intra-epiteliais escamosas, incluindo o carcinoma do colo uterino (CAPPIELLO et al. 1997). Fatores imunogenéticos controladores da resposta imune, parecem ter um papel relevante na progressão ou regressão de lesões causadas pelo HPV. Várias associações já foram descritas relacionando moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe I e II, com a susceptibilidade ou proteção a diversas doenças. Associações entre alelos ou haplótipos de genes do sistema MHC e o carcinoma do colo uterino ou com suas lesões precursoras, vêm sendo descritas, mostrando que existe uma susceptibilidade genética à infecção pelo HPV e que esta, em parte, é conferida por genes deste sistema (APPLE et al. 1994; MACIAG e VILLA 2000).

Alguns estudos relatam associações entre o HPV e outros microorganismos. Uma das associações especuladas é com o Herpesvírus humano 6 (HHV6). Este vírus é capaz de infectar células do colo uterino *in vitro* e ativar a transcrição dos genes E6 e E7 de HPV de alto risco (CHEN et al. 1994). Existem diversos estudos que relatam a persistência da infecção por HPV à infecções prévias ou associadas à bactéria *Chlamydia trachomatis* (SILINS et al. 2005).

## 1.3 A RESPOSTA IMUNE CONTRA INFECÇÕES VIRAIS

### 1.3.1 Aspectos Gerais

A imunidade celular é o principal mecanismo de combate às infecções intracelulares. Este tipo de resposta ocorre através da interação entre vários tipos de células imunocompetentes, sendo essencial a presença das APC (Células Apresentadoras de Antígeno), linfócitos CD4, linfócitos CD8 e células NK (*Natural Killer*). Após a captura dos antígenos em sítios periféricos, as células APC migram para os órgãos linfóides secundários, apresentando os fragmentos peptídicos provenientes do processamento do antígeno, às células T CD4<sup>+</sup>. Esta apresentação é estabelecida na superfície das células APC e CD4<sup>+</sup>, através da formação de complexos entre as moléculas MHC de classe II e os peptídeos, na superfície das APC para os TCR (Receptores das Células T), presentes nas células CD4<sup>+</sup>. A interação entre os TCRs e os complexos MHCII-peptídeo, além de específica é crucial para a ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, ocorrendo desta forma a expansão clonal destas células. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados atuam através da secreção de citocinas, na diferenciação de células efetoras do sistema imune. Deste modo, linfócitos CD8<sup>+</sup>, estimulados pelas células alvo apresentando antígenos, necessitam da ação de citocinas secretadas pelas células CD4<sup>+</sup> ou de outros sinais provenientes da interação com as APC, para diferenciarem-se em linfócitos citotóxicos. Os linfócitos T citotóxicos (CTL), reconhecem peptídeos apresentados nas moléculas de MHC de classe I, presentes na grande maioria das células e exercem seu efeito

citotóxico através da liberação de perforinas e citolisinas, enzimas que provocam lise osmótica das células alvo (ABBAS e LICHTMAN 2003). Antígenos que não alcançam os órgãos linfóides secundários são ignorados pelo sistema imune, pois a ativação das células T CD4<sup>+</sup>, parece ocorrer apenas nestes órgãos (ZINKERNAGEL et al. 1997).

### **1.3.2 Resposta Imune Contra o Papilomavírus Humano**

A resposta contra agentes virais inclui tanto a resposta inata, quanto a adquirida. A imunidade adquirida contra agentes virais é mediada pela combinação entre mecanismos humorais e celulares. Anticorpos específicos são importantes no controle inicial da infecção, prevenindo a entrada do vírus na célula hospedeira e após a liberação das partículas virais das células infectadas, visto que os vírus são inacessíveis aos anticorpos no ambiente intracelular. Os papilomavírus são exclusivamente epiteliotrópicos e seu ciclo de vida depende da diferenciação celular que ocorre neste tipo de tecido. Estes vírus causam infecções produtivas e crônicas, podendo persistir por vários meses. Além disso, não causam infecções citolíticas e não ocorre inflamação, fato que retarda ou mesmo anula uma resposta imune adequada.

A entrada do HPV no organismo ocorre através de microlesões da pele ou mucosa e o início da infecção ocorre nas camadas basais da epiderme. As células infectadas pelo HPV são primordialmente do epitélio escamoso, tecido que apresenta em condições normais, níveis baixos de células apresentadoras de antígeno profissionais (no caso da epiderme,

células de Langerhans). Interessantemente, nas lesões cervicais HPV positivas, ocorre uma diminuição significativa das células de Langerhans e que tende a progredir com o avanço das lesões (HAWTHORN et al. 1988). Este fato poderia levar a uma diminuição da resposta imune celular específica. O principal mecanismo de imunidade específica contra o HPV ocorre através da ação dos linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . A resposta humoral parece ser irrelevante no primeiro contato com o HPV (IARC 2005). A grande maioria das lesões benignas causadas por HPV de alto risco, tende a regredir sob influência do sistema imune. Mas, contrariamente, em algumas destas lesões, o DNA viral, provavelmente através da sua integração, persiste de forma latente nas células, escapando ao controle exercido pelo sistema imune (JABLONSKA e MAJEWSKI 1990). Alguns estudos relatam a presença de diversos epítomos provenientes do processamento das oncoproteínas virais E6 e E7, que se ligam às moléculas de MHC de classe I, presentes nas células infectadas. Desta forma, estas duas proteínas apresentam potencial antigênico, o qual foi verificado tanto *in vitro* (KAST et al. 1994), quanto *in vivo* (BARTHOLOMEW et al. 1994). Contrariamente, outros estudos demonstram que estas proteínas têm baixo poder imunogênico (SADOVNIKOVA e STRAUSS 1994). A diminuição ou perda da expressão de MHC de classe I nas células é um mecanismo reconhecido e provocado por diversos tipos de vírus, como por exemplo, citomegalovírus, adenovírus, vírus Epstein-Barr, papilomavírus bovino, entre outros (PLOEGH et al. 1998). Este tipo de modulação parece não ocorrer em lesões de baixo

grau HPV positivas, mas é observada em lesões de alto grau (CROMME et al. 1993; HILDERS et al. 1993).

Basicamente, na linha de defesa contra a infecção por HPV, os macrófagos parecem ser as primeiras células a serem recrutadas, podendo estar envolvidos na regressão das lesões, seja por um efeito anti-viral direto ou por um mecanismo não específico (JENSON et al. 1987; TAY et al. 1987). Por outro lado, tanto os macrófagos quanto os queratinócitos ativados, produzem uma série de citocinas, dentre elas o Fator de Necrose Tumoral (TNF). Sua atividade antitumoral e antiproliferativa, podendo ser um fenômeno importante na regressão de lesões e tumores induzidos pela infecção persistente de HPV (LUNGER et al. 1985; BEUTLER e CERAMI 1987).

Estudos recentes mostraram que a oncoproteína E7 de HPV de alto risco é capaz de inibir a função antiviral e reguladora do crescimento mediada por interferon- $\alpha$  (BARNARD et al. 2000) e regular negativamente a resposta ao IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor-1*) (UM et al. 2002; KOROMILAS et al. 2001). Além disso, foi observado que as proteínas E7 dos HPV tipo 16, 18 (alto risco oncogênico) e 6b (baixo risco oncogênico), são capazes de regular diferencialmente a da molécula MHC classe I. Além disso, HPV interfere na apresentação de antígenos mediada por TAP1 (*transporter associated with antigen processing subunit 1*) e da proteína integrante do imunoproteasomo LMP2 (*low molecular weight protein 2*) (GEORGOPOULOS et al. 2000). No entanto, a proteína E7 não é o único fator viral envolvido na alteração dos mecanismos antivirais mediados pelos

Fundação Antonio Prudente

Alguas Alves Kuninani  
Cadeira Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO  
PRUDENTE

interferons. Num estudo recente, RONCO et al. (1998) observaram a interação da proteína E6 de HPV 16 com o fator IRF3. Os autores mostraram que esta interação tinha como resultado a inibição da atividade transcricional mediada por este fator. Além disso, existem estudos que mostram o efeito inibitório da proteína E6 de HPV 18 na ativação de Jak-Stat mediada pelo interferon- $\alpha$  (revisado por KOROMILAS et al. 2001). Acredita-se, que estes efeitos possam contribuir na eliminação da resposta antiviral normal de uma célula infectada.

### **1.3.3 O Fator de Necrose Tumoral (TNF)**

#### **1.3.3.1 Aspectos Gerais**

O TNF amplifica e prolonga a resposta inflamatória estimulando outras células a liberar tanto citocinas, como, por exemplo, a interleucina 1 (IL-1) em tecidos epiteliais, quanto mediadores da sua resposta, como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que promovem a inflamação e a injúria tecidual. O TNF é essencial para o processo completo da inflamação, tanto que, a diminuição da inflamação é normalmente caracterizada pela atividade decrescente do TNF. A magnitude da resposta inflamatória é crucial: respostas insuficientes resultarão em um baixo número de células imunes, que pode levar às infecções e ao câncer, enquanto que respostas excessivas causarão morbidade e mortalidade em diversas doenças, tais como: artrite reumatóide, doença de Crohn, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia miocárdica e cerebral (TRACEY 2002).

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

#### **1.3.3.2 O TNF e seus Receptores**

O TNF é uma proteína de 17kDa, cuja estrutura se apresenta na forma de trímero, com aproximadamente 52kDa. O sítio ativo desta molécula corresponde ao domínio que se liga ao receptor na superfície das células, mantendo simetria trimérica (SCHOENFELD et al. 1991). Receptores para o TNF estão presentes em praticamente todos os tipos celulares, com exceção dos eritrócitos e linfócitos T não estimulados, sendo que seu número varia de 200 até 10000 por célula (ROTHER et al. 1992). Existem dois receptores para TNF, p55 (TNFR1) e p75 (TNFR2). Estes receptores são membros de uma família de receptores caracterizada pela presença de repetições ricas

em cisteína, presentes nos domínios extracelulares de ligação ao TNF. Os domínios intracelulares destes receptores, não apresentam homologia significativa entre si, porém ambos são capazes de recrutar as proteínas de sinalização necessárias para iniciar um espectro de respostas celulares que podem resultar tanto na ativação de diversos genes, quanto na indução de apoptose. Estes dados levaram à observação de que estes receptores possuem propriedades funcionais distintas, iniciando vias de ação diferentes dentro das células (TARTAGLIA et al. 1991).

### **1.3.3.3 A Sinalização mediada pelo TNF**

Os principais componentes das vias de transdução de sinal desencadeadas pelo TNF envolvem os seus receptores TNFR1 e TNFR2, assim como todas as proteínas associadas à estes receptores e que por sua vez recrutam outras proteínas para transduzir o sinal. Dentro deste contexto, diversos trabalhos relatam que o receptor TNFR1 está envolvido nas atividades antivirais, citotoxicidade, ativação de fatores de transcrição e morte celular, após sua ligação com o TNF (WONG et al. 1992; TARTAGLIA et al. 1993).

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

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

Nas células, o TNF pode exercer efeitos claramente opostos: apoptose e indução da proliferação (SZATMÁRY 1999; WALLACH et al. 1999; WAJANT e SCHEURICH 2001). Estes efeitos dependem, em parte, da localização nuclear e conseqüente ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (BALDWIN 1996; MARTIN et al. 2001). Este é composto por duas subunidades e normalmente encontra-se retido no citoplasma através da sua associação com proteínas da família I $\kappa$ B (inibidor de  $\kappa$ B). Atualmente, são conhecidas 5 proteínas da família NF- $\kappa$ B/REL: REL (c-REL), p65 (RELA), RELB, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) e p52/p100 (NF- $\kappa$ B2). A composição do fator NF- $\kappa$ B pode variar, afetando sua atividade transcricional. As proteínas REL pertencem a duas classes que se distinguem pela sua síntese e propriedades de transativação. Uma classe consiste de p65 (RELA), RELB e

c-REL. Estas proteínas são sintetizadas e apresentam um domínio RHD (REL homology domain) na região amino-terminal, requerido para a dimerização e ligação ao DNA. Os domínios envolvidos na modulação da transcrição encontram-se na região carboxi-terminal. A segunda classe é constituída pelas proteínas p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) e p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), que são sintetizadas como precursores maiores (p105 e p100) com um domínio RDH na região amino-terminal e repetições de anquirina na região carboxi-terminal. Este domínio carboxi-terminal é removido por proteólise dependente de ubiquitina, gerando as proteínas maduras (p50 e p52) que apresentam capacidade de união ao DNA (KARIN et al. 2002). A localização celular de NF- $\kappa$ B é controlada por uma família de proteínas inibitórias denominada I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3 e os precursores p100 e p105), cuja principal função é sua ligação com NF- $\kappa$ B, prevenindo sua ativação e conseqüente translocação para o núcleo. Dentre as proteínas acima citadas, a proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$  é a mais abundante e a melhor caracterizada nas células (KARIN e BEN-NERIAH 2000).

O complexo quinase de I $\kappa$ B (IKK), é o principal responsável pela fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  e constitui um ponto de convergência para a maioria dos estímulos que desencadeiam em parte, a ativação de NF- $\kappa$ B (KARIN e BEN-NERIAH 2000). Diversos estudos relatam a interferência de proteínas virais com a ativação desregulada de NF- $\kappa$ B. Um dos principais exemplos é a associação com o vírus HTLV-1 que promove a transformação de linfócitos através da ativação constitutiva da translocação nuclear de NF- $\kappa$ B,

principalmente através da ativação de IKK (UHLIK et al. 1998; LI et al. 1999; XIAO et al. 2000).

#### **1.3.3.4 TNF e a Resposta Imune Epitelial**

Queratinócitos afetados por agentes físicos, químicos ou patógenos, destacando entre eles o HPV, tornam-se ativos, ou seja, adquirem a capacidade de diferenciar, migrar, proliferar, produzir e secretar componentes da matriz extracelular e peptídeos de sinalização envolvidos na resposta imune. Estas alterações são controladas por fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, principalmente produzidas pelos próprios queratinócitos e outras células cutâneas, como os fibroblastos (FREEDBERG et al. 2001). Células envolvidas na resposta imune epitelial, como as células dendríticas, linfócitos migratórios e células de Langerhans, são consideradas cruciais para a produção de citocinas e conseqüente resposta inflamatória. Interessantemente, recentes estudos apontam os queratinócitos, principais células do tecido epitelial, como os maiores contribuidores na produção de citocinas epiteliais, incluindo TNF, interleucinas e interferon. Estas citocinas podem ser induzidas ou produzidas constitutivamente pelos queratinócitos (TIZARD et al. 2000; GRÖNE 2002).

Os queratinócitos de uma epiderme saudável e intacta não se encontram ativados, ou seja, possuem um baixo nível de proliferação na camada basal, enquanto que aqueles presentes nas camadas supra basais seguem o programa normal de diferenciação. Os queratinócitos são ativados em resposta à diferentes tipos de injúrias e podem ser eventualmente

desativados, retornando ao programa normal de diferenciação. Este processo denominado ciclo de ativação dos queratinócitos é controlado por diversos fatores extra celulares e é caracterizado principalmente pela expressão diferencial de queratinas. Geralmente, o ativador inicial dos queratinócitos é a interleucina 1, encontrada em sua forma não processada no interior dos queratinócitos não ativados, sendo processada e liberada rapidamente após dano às células. A interleucina 1 liberada, tem efeito parácrino, ou seja, age em células diferentes das quais foi originada, por exemplo em células endoteliais, facilitando o recrutamento dos linfócitos circulantes e de forma autócrina, ativando os próprios queratinócitos, com conseqüente proliferação, migração e expressão de genes envolvidos na sua própria ativação, entre eles TNF e TGF $\alpha$ . O estado de ativação dos queratinócitos é mantido através da exposição ao TNF (NICKOLOFF e TURKA 1993). Geralmente, o TNF encontra-se em baixos níveis nas camadas suprabasais do epitélio, sendo produzido e liberado após indução pela IL-1. Um aumento significativo nos níveis de TNF é detectado nesta região em diversas condições, como: alergia, dermatites, irradiação ultravioleta e infecções virais. O período entre a ativação e desativação dos queratinócitos, ou seja, a manutenção do estado ativado mediado pelo TNF, depende da causa e/ou eliminação do agente desencadeador do processo inflamatório. O mecanismo através do qual o TNF leva à proliferação, morte celular ou à diferenciação, ainda não está completamente elucidado. Estes processos envolvem certamente a expressão diferencial de diversos genes relacionados tanto no reparo do tecido, como na eficiência da resposta

inflamatória local. Desta forma, o período de exposição ao TNF torna-se crucial.

#### 1.3.3.5 TNF e HPV

Como descrito anteriormente, o sistema imune utiliza diversos mecanismos para controlar a progressão de lesões induzidas pelo HPV, dentre eles a produção de citocinas. Por outro lado, os queratinócitos são capazes de produzir uma série de mediadores como interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator estimulante de formação de colônias (CSF), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TNF, que podem influenciar a proliferação e diferenciação da epiderme (JABLONSKA e MAJEWSKI 1990). Normalmente, a expressão constitutiva destes fatores é muito baixa, mas pode aumentar significativamente sob a ação de diversos estímulos, como anteriormente citado. Além disso, níveis significativos de TNF se acumulam na epiderme após sua administração intravenosa, sugerindo que os queratinócitos são um importante alvo para esta citocina (BEUTLER et al. 1995). De fato, este fator promove a inibição reversível da proliferação de queratinócitos normais *in vitro*, efeito este observado através da diferenciação e conseqüente produção de envelope corneificado por estas células (PILLAI et al. 1989).

Até o momento, diversos estudos têm analisado o papel do TNF em células infectadas pelo HPV. Algumas pesquisas relatam uma ação direta desta citocina na transcrição das oncoproteínas virais E6 e E7, juntamente

com a diminuição da proliferação celular. Linhagens celulares imortalizadas tanto com HPV16 quanto com HPV18, mostraram uma diminuição nos níveis destas proteínas após tratamento com TNF (KYO et al. 1994). A diminuição de sensibilidade ao TNF, tanto para a transcrição viral, como para a proliferação celular e expressão de proteínas ativadas por esta citocinas, está definitivamente associada à progressão do fenótipo maligno destas células (RÖSL et al. 1994; PIRISI et al. 1995). O fator de transcrição AP-1 é essencial para a iniciação e manutenção da expressão viral nas células infectadas pelo HPV. Em células normais e em algumas linhagens imortalizadas por HPV, o TNF age modificando a composição de AP-1, inibindo conseqüentemente sua atividade transcricional. Este mesmo efeito não ocorre em células transformadas pelo HPV (SOTO et al. 1999).

Estudos anteriores demonstraram que células transfectadas com HPV16 (HF698) eram tão sensíveis ao efeito antiproliferativo exercido pelo TNF, quanto queratinócitos normais. Contrariamente, células imortalizadas tanto por HPV18 (HF18 e HF18Nco) quanto por SV40 não paravam de proliferar frente a esta citocina (VILLA e SCHLEGEL 1991; VILLA et al. 1992).

Alguns trabalhos sugerem que a diferença de atividade das LCRs de HPV16 e 18 poderia ser a principal responsável pela maior capacidade transformadora do HPV 18. Vale a pena ressaltar que o HPV18 apresenta uma maior capacidade de transformar células *in vitro* que o HPV16 e que a região promotora destes vírus é de 10 a 50 vezes mais ativa quando comparada à do HPV16 (VILLA e SCHLEGEL 1991; ROMANCZUK et al.

1991). Resultados semelhantes foram obtidos com linhagens imortalizadas por DNA subgenômico de HPV16 (HF1628 e HF1638) ou HPV18 (HF1842), ou seja, células que expressam apenas as oncoproteínas virais E6 e E7, reguladas pelos seus promotores autólogos. Além disso, as linhagens sensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF, apresentaram intensa redução nos níveis de expressão de ciclina A, B e CDK1, após 60 horas de tratamento, corroborando os dados acima descritos (VIEIRA et al. 1996).

No entanto, alguns estudos relatam que linhagens celulares tumorais que contém HPV16 e HPV18 são igualmente resistentes ao TNF (BORNSTEIN et al. 1997).

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

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos recentes apontam os queratinócitos, principais células do tecido epitelial, como os principais produtores de citocinas epiteliais, incluindo o TNF, interleucinas e interferon. O TNF está diretamente associado ao processo inflamatório dos epitélios e mucosas, sendo de fundamental importância para uma resposta imune efetiva, além do efeito antiproliferativo exercido neste tipo celular. Após 3 horas de exposição ao TNF, a grande maioria dos genes responsivos à esta citocina são modulados. No entanto, em processos inflamatórios e/ou infecções virais, por exemplo, a exposição ao TNF ocorre por períodos prolongados, fato que depende da causa e eliminação do agente desencadeador do processo inflamatório. Neste processo, diversos genes são regulados.

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, demonstraram que o efeito antiproliferativo mediado pelo TNF em queratinócitos humanos primários e imortalizados com HPV 16, tem pico máximo de inibição de proliferação, após 60 horas de tratamento com TNF (VILLA e SCHLEGEL 1991). Contrariamente, células imortalizadas com HPV 18 e SV40, não param de proliferar frente à esta citocina. As linhagens sensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF, apresentaram intensa redução nos níveis de expressão de ciclina A, B e CDK1, após 60 horas de tratamento, confirmando os dados acima descritos (VIEIRA et al. 1996). Desta forma, a

diferença na tumorigenicidade de cânceres associados à dois tipos de *HPV* de alto risco (*HPV16* e *HPV18*), pode, entre outros fatores, estar diretamente relacionada à resistência dos efeitos mediados pelo *TNF*.

Uma das principais proteínas ativadas pelo *TNF* é o fator de transcrição *NF-κB*, responsável pela modulação da transcrição de mais de 200 genes. Sua ativação é controlada por uma série de proteínas presentes no citoplasma da grande maioria das células, entre as quais, proteínas inibitórias do fator *NF-κB* (família *IκB*) e proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de *IκB* (família *IKK*). Estas proteínas são de crucial importância para o controle da ativação de *NF-κB*, cujos efeitos desencadeiam diferentes respostas, dependendo do tipo e estado das células estudadas (KARIN et al. 2002).

Pelo exposto, neste estudo foram analisados os níveis protéicos das proteínas regulatórias acima citadas, em queratinócitos normais e infectados por *HPV16* e *18*. Além disso, foi avaliada a expressão gênica global, através da técnica de *cDNA microarray*, nas mesmas linhagens celulares, antes e após exposição ao *TNF*, por dois períodos de tempo: 3 e 60 horas.

Desta forma, tanto o conhecimento das diferenças na expressão gênica nestes 3 tipos celulares expostos ao *TNF*, bem como os níveis de expressão de diversas proteínas envolvidas no mecanismo de ação desta citocina, contribuirão para o entendimento na via de eliminação da infecção pelo HPV.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os mecanismos responsáveis pela resposta diferencial ao TNF de queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 quando comparados a queratinócitos imortalizados com HPV18.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os níveis de expressão de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização por TNF. Em particular, a via de regulação do fator NF- $\kappa$ B, em queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 ou HPV18 e em amostras de cultura organotípica.
2. Determinar e comparar o perfil de expressão gênica através da técnica de cDNA *microarray* em queratinócitos normais, queratinócitos imortalizados com HPV16 ou HPV18.
3. Comparar o perfil de expressão gênica nos tipos celulares acima citados, após tratamento com TNF por dois períodos de tempo: 3 e 60 horas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas culturas primárias de queratinócitos obtidos a partir de prepúcios de recém-nascidos (*normal human foreskin keratinocytes* - **NHFK** ou *primary human keratinocytes* - **PHK**), como descrito por SCHLEGEL et al. (1988) e linhagens de queratinócitos humanos normais imortalizados com: genoma completo de HPV16 (**HF698**), HPV18 (**HF18Nco**) ou com LCR-E6E7 de HPV18 (**HF18.42**). As linhagens imortalizadas por HPV foram isoladas de clones independentes e obtidas por transfecção a partir de NHFK (BARBOSA e SCHLEGEL 1989). Vale a pena ressaltar que, para facilitar o entendimento das figuras apresentadas neste estudo, em alguns casos as células **NHFK** podem ser representadas pela letra **N**, as células **HF698** como **HPV16** e **HF18Nco** como **HPV18**. Os queratinócitos normais foram cultivados em meio definido para cultivo de queratinócitos (K-SFM - Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD), suplementado com 70µg de extrato de pituitária bovina e 10ng/mL de fator de crescimento epidérmico recombinante (EGF). As linhagens imortalizadas com HPV foram cultivadas em meio 3 + 1, que consiste em uma mistura de três volumes de K-SFM e uma volume de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa úmida, a 37° C e com 5% de CO<sub>2</sub>. Os subcultivos foram feitos na

proporção 1:4. As células foram congeladas quando necessário em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 20% de soro fetal bovino.

#### **4.2 TRATAMENTO COM TNF (VILLA et al. 1992)**

As linhagens celulares NHFK, HF698 e HF18Nco, foram cultivadas nas condições anteriormente descritas, por aproximadamente 7 passagens, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri de plástico ( $2-5 \times 10^5$  ou  $0,7-1 \times 10^5$  células por placa, conforme as placas utilizadas, 90 ou 60 mm de diâmetro, respectivamente). Ao atingirem 40-50% de confluência, o meio de cultura foi substituído por meio fresco com 2nM de TNF humano recombinante (Boehringer Mannheim). Após diversos períodos de tratamento, realizaram-se extração de RNA e proteínas. Em todos os casos foram semeadas placas controle que não foram tratadas com TNF.

Os efeitos do TNF na proliferação destas células em cultura foram avaliados mediante ensaios de incorporação de timidina tritiada ou através da análise das populações celulares por citometria de fluxo (dados não apresentados) (VILLA e SCHLEGEL 1991; VIEIRA et al. 1996; TERMINI 2000).

### 4.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT

A extração de proteínas das linhagens analisadas foi realizada mediante lise celular e posterior separação da fração proteica. Para isto, 500  $\mu$ l de solução de lise (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% NP40, 0,5% fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 0,1 mM EDTA, 100 unidades/ml de Aprotinina) foram adicionados a cada placa e os lisados celulares foram coletados mediante o uso de um cell scraper e transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, os lisados foram incubados no gelo durante 15 minutos e centrifugados sob velocidade máxima a 4°C, durante 30 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as amostras estocadas a -70°C (SAMBROOK et al. 2001).

As amostras de culturas organotípicas utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Enrique Boccardo do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, filial de São Paulo.

As amostras de proteína, isoladas conforme descrito anteriormente, foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% ou 12,5% utilizando o mini-Protean II Cell (Bio-Rad). Para um gel de separação de 4,5 ml 10% de acrilamida foram utilizados: 1,5 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 1,5 ml de lower buffer (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%), 1,5 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 24  $\mu$ l de persulfato de amônio 10% (APS) e 11,25  $\mu$ l de TEMED. Para géis de acrilamida 12,5% foram utilizados: 1,125 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q e 1,875 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%. Na porção superior do gel de separação foi aplicado um gel de stacking composto por:

1,5 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 625 µl de upper buffer (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%), 313 µl de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 11,25 µl de APS 10% e 3,75 µl de TEMED. As amostras foram preparadas colocando-se 50 µg de proteína em tampão de amostra 4x v/v (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS 0,8%, β-mercaptoetanol 200 mM, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%) e desnaturadas a 95 °C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese a 20-30 mA em tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris 25mM, SDS 0,1%). Finalmente as amostras foram eletrotransferidas (Mini Trans-Blot Cell, BIO-RAD) para membranas de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) a 250 mA em tampão de transferência (glicina 200 mM, Tris 25 mM, metanol 20% v/v (Merck)) durante 1h a 4 °C. A transferência foi conferida através da coloração com Ponceau (SIGMA) 0,1% em ácido acético 1% (SAMBROOK et al. 2001).

Foram utilizados os anticorpos policlonais para as proteínas IκBα na concentração 1:1000 (sc-371, Santa Cruz Biotechnology), IκBβ na concentração 1:1000 (sc-945, Santa Cruz Biotechnology), IκKα na concentração 1:1000 (H-744, Santa Cruz Biotechnology), Sumo-1 na concentração 1:1000 (FL-101, Santa Cruz Biotechnology), actina (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology) e β tubulina (sc-5274, Santa Cruz Biotechnology, monoclonal). Inicialmente, as membranas foram bloqueadas com PBS-T (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite em pó durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas (2x) durante 3 a 5 minutos com PBS-T e

incubadas durante 1 hora na presença de algum dos anticorpos específicos descritos acima com 1% de leite em PBS-T. Os anticorpos foram diluídos em PBS-T nas concentrações sugeridas pelo fabricante. Posteriormente, as membranas foram lavadas (4x) com PBS-T durante 5 minutos e incubadas durante 1 hora na presença de anticorpo anti-imunoglobulina de coelho ou proteína A conjugados à peroxidase (Amersham), diluídos 1:5000 ou 1:10000 em PBS-T. Finalmente, as membranas foram lavadas (4x) com PBS-T e (2x) com PBS (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM) durante 5 minutos e reveladas utilizando o kit ECL (Amersham).

A normalização dos experimentos foi realizada mediante a detecção da expressão de genes constitutivos (actina ou tubulina) ou eventualmente através da coloração com corante de Ponceau das membranas utilizadas e através de bandas inespecíficas visualizadas nos experimentos.

#### **4.4 EXTRAÇÃO DE RNA E NORTHERN BLOT**

Para extração de RNA total, pellets contendo aproximadamente  $5 \times 10^6$  células foram submetidos à 5ml de solução TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) e homogeneizadas. O RNA foi extraído conforme as instruções do fabricante e dissolvido em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (Merck, Germany). A concentração foi determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm (GeneQuant, Clamart Cedex, France).

A qualidade do RNA extraído foi avaliada para todas as amostras analisadas através de uma eletroforese em gel de agarose sob condições

desnaturantes. Cerca de 1  $\mu\text{g}$  do RNA total foi misturado com tampão contendo 7M de uréia, 30% de glicerol, 0,25 % de azul de bromofenol, 0,6% de SDS, 60 mM de EDTA, aquecido a 65°C por 10 minutos, resfriado em gelo por 1 minuto e fracionado em gel de agarose 1% em TAE 1X (0,04 M de TRIS Acetato e 1mM de EDTA) contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio. A análise da integridade do RNA foi feita avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S. Após cada extração do RNA total das amostras, 1  $\mu\text{g}$  de RNA foi submetida ao fracionamento em gel de agarose desnaturante com 1% de formaldeído e uréia, para verificação da integridade do RNA através da visualização das subunidades ribossomais 28S e 18S sob luz ultravioleta, conforme procedimentos usuais (SAMBROOK et al. 2001).

Para os experimentos de Northern Blot, 10 $\mu\text{g}$  de RNA total foi fracionado em gel de agarose. O gel foi lavado em 4X SSC (NaCl 0,6M, citrato de sódio 60mM, pH 6,45) e 10X SSC (NaCl 1,5M, citrato de sódio 1,5M, pH 6,45) durante 20 minutos para eliminar o excesso de formaldeído. As amostras foram transferidas por capilaridade para uma membrana de nylon (Hybond-N/Amersham) com 10 X SSC, durante 12 a 16 horas. A eficiência de transferência foi conferida mediante visualização do RNA utilizando-se lâmpada UVG-11 (Mineralight) de baixo comprimento de onda (254nm) e os RNA foram fixados na membrana utilizando UV Crosslinker FB-UVXL-1000 (FisherBiotech). A hibridização foi realizada a 65°C durante 16 horas em solução de hibridização (segundo protocolo de Church and Gilbert), contendo sonda marcada com  $\alpha\text{P}32$  dCTP, através do kit Ready To

Go™ AMERSHAM. Posteriormente, a membrana foi lavada com solução de lavagem (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25M, SDS 1% e EDTA 1mM) durante 30 minutos, a 65°C, para a retirada do excesso de sonda. Finalmente, as membranas foram expostas a filmes de raio X a 70°C. Com objetivo de normalizar a quantidade de RNA aplicada, utilizou-se uma sonda para o mRNA da gliceraldeído 3-P desidrogenase. Como sonda para o gene I $\kappa$ B $\alpha$  humano, foi utilizado um produto de PCR purificado de aproximadamente 200 pb correspondente ao exon 5 do gene.

#### **4.5 CLONAGEM DE I $\kappa$ B $\alpha$ HUMANO NO VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1/V5-HIS(B)**

A clonagem do cDNA de I $\kappa$ B $\alpha$  humano foi realizada através da amplificação da região codificadora, utilizando-se c-DNA originado de queratinócitos primários humanos induzidos por 3 horas com TNF. A amplificação foi realizada utilizando-se os iniciadores: p-I $\kappa$ B $\alpha$ -F2 (5'cgcgcccagcgcacccgca3') e p-I $\kappa$ B $\alpha$ -R-Xba-2 (5'tggaggccagcgtctgacgtta3'). Para uma reação de 20ul, foram utilizados: 0,16ul de 25uM de dNTP, 0,6ul de 50mM de cloreto de magnésio, 0,4ul de cada iniciador e 0,08ul de Taq polimerase (5U/ul – Invitrogen) e 2ul do cDNA. As condições de ciclagem foram: 94° C/1 minuto, 94° C/30 segundos, 60° C/30 segundos, 72° C/2 minutos, por 35 ciclos. Após a PCR, as reações foram fracionadas em gel de agarose e o produto amplificado foi purificado utilizando-se lâ de vidro. O produto amplificado foi clonado no vetor pGEM-T-easy e diversas colônias

foram seqüenciadas. O inserto eleito foi subclonado no vetor de expressão pcDNA3.1/V5His(B), utilizando-se os sítios Eco-RI e XbaI (SAMBROOK et al. 2001; ABRANTES et al. 2003).

#### 4.6 TRANSFEÇÃO TRANSIENTE

A transfecção dos queratinócitos normais (passagem 8) foi realizada utilizando-se o plasmídeo pcDNA3.1/V5His(B) e pcDNA3.1/V5His(B)I $\kappa$ B $\alpha$ . Foram utilizadas 2 placas de cultura com 6 poços cada, contendo queratinócitos normais com aproximadamente 70% de confluência. Em uma das placas foi realizada a transfecção dos queratinócitos com o plasmídeo controle (pcDNA3.1/V5His(B)), sendo que desta, 3 poços foram tratados posteriormente por 60 hs com 2nM de TNF. Os queratinócitos cultivados na segunda placa foram transfectados com o plasmídeo que expressa I $\kappa$ B $\alpha$  (pcDNA3.1/V5His(B)I $\kappa$ B $\alpha$ ) e 3 poços foram tratados posteriormente com 60hs com 2nM de TNF. Primeiramente, foram adicionados 1,5 $\mu$ g de cada plasmídeo à 125 $\mu$ l de meio de cultura KSFM sem adição de suplementos. Em seguida, adicionamos 125 $\mu$ l de lipofectamina (GIBCO) e incubamos por 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mistura foi adicionada sobre os queratinócitos após previa retirada do meio de cultura. Incubamos as células por 5 horas, adicionando em seguida 2ml de meio KSFM suplementado, incluindo o TNF.

#### 4.7 IMUNOPRECIPITAÇÃO

A extração de proteínas dos queratinócitos tratados com TNF por 60 horas para IP foi realizada utilizando-se tampão RIPA. Foi adicionado 1,0ug de IgG de coelho não imunizado à 20ul de resina AGAROSE-proteínaA e incubamos a 4° C por 30 minutos. Centrifugamos a 2500rpm por 30 segundos. Em seguida, adicionamos 5ul do anticorpo I $\kappa$ B $\alpha$  à 200ug de extrato protéico total, incubando por 2 horas a 4° C. Finalmente misturamos a resina ao extrato incubado com o anticorpo por 12 horas a 4° C, sob agitação. A mistura foi centrifugada o sobrenadante foi descartado e a resina lavada 4 vezes com tampão RIPA. A resina foi submetida à fracionamento em gel SDS-PAGE (SAMBROOK et al. 2001).

#### 4.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO PROTEASOMA

Para o ensaio de inibição do proteasoma, foi utilizada a lactacistina (CALBIOCHEM), um inibidor irreversível do proteasoma 20S. Os queratinócitos foram tratados com lactacistina numa concentração de 20uM, após exposição de 42 e 48 horas ao TNF. Os extratos protéicos totais das diferentes placas de cultura foram extraídos ao serem completadas 60 horas de tratamento com TNF (ABRANTES et al. 2003).

#### **4.9 EFEITO DA INTERRUÇÃO DO TRATAMENTO COM TNF NA DETECÇÃO DA BANDA DE 20 kDa**

Com o objetivo de avaliar o efeito da interrupção do tratamento com TNF no aparecimento da banda de 20 kDa, foi realizado um experimento em que as células foram tratadas por 24, 48 e 60 horas com TNF. Os tratamentos de 24 e 48 horas foram seguidos respectivamente por incubações de 36 e 12 horas com meio de cultura novo (sem TNF), até completar 60 horas. Neste ponto, foram obtidos extratos protéicos totais para o ensaio de Western Blot.

#### **4.10 ENSAIO COM CICLOHEXIMIDA E ACTINOMICINA D**

Para os ensaios de inibição da transcrição e tradução, foram utilizados actinomicina D (SIGMA) e cicloheximida (SIGMA), respectivamente. Após 50 horas de tratamento com TNF, foram acrescentados às culturas de queratinócitos, actinomicina D ou cicloheximida, numa concentração final de 5ug/ml e 10ug/ml, respectivamente. Os extratos protéicos totais, incluindo os controlos, foram extraídos ao serem completadas 60 horas de tratamento com TNF (ABRANTES et al. 2003).

## 4.11 MICROARRAY

Os experimentos de cDNA *microarray* consistem basicamente de duas etapas: bioquímica e computacional-estatística. A etapa bioquímica consiste das seguintes fases:

- Fixação de cDNA nas lâminas
- Extração e amplificação do RNA
- Hibridização

Após a etapa bioquímica do processo, é realizada a etapa computacional-estatística, que consiste das seguintes fases:

- Captação das imagens
- Quantificação das imagens
- Normalização dos dados
- Análise dos dados

A seguir, serão descritas as etapas envolvidas neste tipo de experimento.

### 4.11.1 Fixação de cDNA nas lâminas

A fase inicial da metodologia de *microarray* consistiu na seleção de clones originados do projeto ORESTES (Projeto Genoma do Câncer/FAPESP/LICR) (CAMARGO et al. 2001). O Laboratório de Biologia Computacional do Hospital do Câncer, coordenado pela Dra Helena Brentani realizou o processo de seleção das sequências ORESTES que fariam parte da coleção de sondas utilizadas nas lâminas (BRENTANI et al. 2005)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Após esta etapa, os fragmentos foram amplificados e fixados nas lâminas de vidro em posições específicas, utilizando-se o robô *Flexis*.

#### 4.11.2 Extração e amplificação do RNA

Para cada tipo celular analisado através de *microarray*, ou seja, queratinócitos normais, queratinócitos imortalizados com genoma completo de HPV16 (HF698) e queratinócitos imortalizados com genoma completo de HPV18 (HF18Nco), foram semeadas simultaneamente 8 placas de 90mm de diâmetro para cada tipo celular: Ao atingirem 40-50% de confluência, o meio de cultura foi substituído em 4 placas com 2nM de TNF humano recombinante e nas 4 placas-controle restantes, o meio substituído foi o mesmo mas sem adição de TNF. Após 3 e 60 horas de tratamento, realizou-se a extração de RNA. Cada experimento foi realizado em duplicata, ou seja, para cada tipo celular havia 8 placas, 4 para o experimento com TNF-3 horas e 4 para TNF-60 horas. Destas 4 placas, duas foram tratadas com TNF e as outras serviram como controle. Vale a pena ressaltar, que as placas controle de cada experimento, ficaram em cultura pelo mesmo período que as placas tratadas. Os RNAs das amostras foram extraídos utilizando-se o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA), conforme citado anteriormente. Desta forma, foram obtidas 24 amostras de RNA.

A amplificação de mRNA foi realizada em dois ciclos a partir dos RNAs extraídos, incluindo o RNA utilizado como referência. A padronização

do protocolo de amplificação de mRNA foi baseada em GOMES et al. (2003). Para síntese da primeira fita de cDNA, foram adicionados em cada tubo de PCR de 1 a 3 µg de RNA total, 1ul 0,5 µg/µl oligo dT(15)-T7 primer e H<sub>2</sub>O DEPC (Merck) para completar 7,7 ul. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e mantida em gelo por 5 minutos. Em seguida, adicionamos 4 ul de 5X Improm First strand buffer, 4,8 ul de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 ul de RNaseIN (Promega Cat# N2111), 2 ul de 10mM dNTP (Pharmacia Cat# 27-2035-02) e por último 1 ul da enzima IMPROM II RT (Promega, cat # A 3802). A reação foi incubada a 25°C graus por 5 minutos e a 42°C por 90minutos. A reação foi bloqueada através da incubação a 70°C por 15 minutos. Para síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados em cada tubo 16,9 ul de água DEPC, 10 ul 5X 2nd strand buffer, 1 ul de 10 mM dNTP mix, 0,3 ul de RNase H (2U/ul Gibco BRL Cat# 18021-071), 0,5 ul de *E. coli* DNA Ligase (10u/ul, Invitrogen, Cat# 18052-019) e por último 1,3 ul de *E. coli* DNA Polimerase I (Promega, 10 U/ul). A reação foi incubada a 16°C por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 1,0 ul de T4 DNA Pol (5U/ul, Invitrogen, cat# 18005-025) e a reação foi incubada a 16°C por 10minutos. Ao produto de cada reação foram adicionados 102 µl de água DEPC, 152 µl fenol pH 8.0/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1. Cada tubo foi invertido por 20 segundos e centrifugados a 20.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se 152 ul de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1, os tubos foram invertidos 20 segundos e centrifugados como descrito acima. Por fim, adicionou-se 1 ul de acrilamida (5 mg/ml, Ambion, cat # 9520), a fase aquosa foi recuperada e mantida em gelo. Para degradar o RNA ribossômico, foram adicionados à

fase aquosa 6,5 ul de EDTA 0,5M e 6,5 ul de NaOH 1N, e a reação incubada a 70 °C por 15 minutos. A reação foi neutralizada com 6,5 ul de Tris-HCl 1N, pH 8,0. A extração orgânica acima descrita foi repetida e o cDNA dupla fita foi precipitado adicionando-se 0,5 volume de NH<sub>4</sub>AC 7,5M (aproximadamente 75 ul) e 2,5 volumes de álcool etílico 100% gelado (aproximadamente 375 ul) e os tubos ficaram a -20°C por 1 hora e meia. Na etapa seguinte, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 20 minutos a 4°C. Os pellets foram lavados com 1,5 ml 75% ETOH e centrifugados a 16.000 x g por 8 minutos a 4°C. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida o sobrenadante foi retirado e os pellets foram secos a temperatura ambiente e ressuspendidos em 10 ul água DEPC. A transcrição in vitro foi feita adicionando-se aos 10 ul de cDNA dupla fita 7,5 µl de 25 mM rNTP mix (A, G, C and UTP), 5 µl 5X Reaction buffer, 2,5 µl Enzyme mix (inibidor de RNase e T7 phage polymerase). A reação foi incubada a 37°C por 5 horas. Em seguida os RNAs amplificados foram purificados utilizando-se TRIzol (Gibco BRL, cat#15596). A concentração do RNA foi mensurada.

O volume do RNA amplificado (aRNA) (0.5-1 µg) foi reduzido em 6,7 µl através da centrifugação em speed-vac (SAVANT). Foi adicionado em cada tubo 1 µl (2 µg/µl) de random hexamer (i.e. dN6, Amersham Pharmacia Biotech). A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e deixada no gelo por 5 minutos. Em seguida foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA e foram adicionados em cada tubo 4 ul de 5X Improm First strand buffer, 4,8 ul de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 ul de RNaseIN (Promega Cat# N2111), 2 ul de 10mM dNTP (Pharmacia Cat# 27-2035-02) e por último 1 ul da enzima IMPROM II

RT (Promega, cat # A 3802). A reação foi incubada a 25°C graus por 5 minutos e por 42°C por 90 minutos. A reação foi bloqueada através da incubação a 70°C por 15 minutos. Para síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados em cada tubo 15 ul de Advantage PCR buffer, 3 ul de 10 mM dNTP mix, 1.0 ul de Oligo T7 (15) (0,5 ug/ul) e 1 ul de RNase H. Por último adicionamos 107 ul de água DEPC e 3 ul de Advantage Polimerase. A reação foi incubada a 37°C por 5 minutos, 94°C por 2 minutos, 65°C por 1 minuto e 75°C por 30 minutos. Para degradar o RNA ribossômico, foram adicionados 6,5 ul de EDTA 0,5M e 6,5 ul de NaOH 1N, e a reação incubada a 70 °C por 15 minutos. A reação foi neutralizada com 6,5 ul de Tris-HCl 1N, pH 8,0. Para purificação dos cDNAs, inicialmente adicionou-se 1 ul de acrilamida (5 mg/ml, Ambion, cat # 9520), 171 ul de fenol pH 8,0/clorofórmio/álcool isoamílico, os tubos foram invertidos por 20 segundos e centrifugados a 16000 x g por 8 minutos a temperatura ambiente. À fase aquosa foram acrescentados 171 ul de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1, os tubos foram centrifugados por 5 minutos e por fim a fase aquosa foi recuperada e o cDNA precipitado com 0,5 volume de NH<sub>4</sub>AC 7,5 M e 2,5 volumes de álcool etílico 100% gelado. Os tubos ficaram a -20°C por 1 hora e meia. As amostras foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 10 ul de água DEPC. A transcrição *in vitro* foi feita adicionando-se aos 10 ul de cDNA dupla fita 7,5 µl de 25 mM rNTP mix (A, G, C and UTP), 5 µl 5X Reaction buffer, 2,5 µl *Enzyme mix* (inibidor de RNase e T7 phage polymerase). A reação foi incubada a 37°C por 5 horas. Em seguida os RNAs amplificados foram purificados utilizando-se TRIzol (Gibco BRL,

cat#15596). A concentração do RNA foi mensurada. Para todos os RNA amplificados obteve-se uma média de 30ug de aRNA.

#### 4.11.3 Hibridização

Em alíquotas de 3 µg de RNA amplificado (aRNA) preparado das amostras analisadas e de RNA referência (RNA amplificado de queratinócitos normais), foram adicionados 1 µl de uma mistura de RNAs-controle transcritos *in vitro* (inclue o gene Q do fago λ) e a 2µl de random primer 5ug/ul (dN6; Invitrogen, Califórnia, USA) em volume final de 6,5 µl. A mistura foi aquecida a 70°C por 10 min e resfriada em gelo por 1 min. A reação foi feita em um volume de 20µl acrescentando-se 4 µl de *First strand buffer* (Invitrogen, Califórnia, USA), 2,4ul de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 2µl de DTT 0,1 M (Invitrogen, Califórnia, USA), 0,6 µl de dNTPs mix (25 mM de dATP, dTTP, dGTP e 10mM de dCTP), 0,5 µl RNasin (40U/µl, Promega, Madson, USA), 1,0 µl de Improm II (200U/µl, Invitrogen, Califórnia, USA) e 3 µl de nucleotídeo Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP 25 nM (Amersham Biosciences, NJ, USA), de forma a realizar a inversão dos corantes entre amostras teste e referência. A mistura foi incubada a 42°C por duas horas e o RNA foi degradado pela adição de 1,5 µl NaOH 1 M e 1,5 µl de EDTA 0,5 M com incubação a 70°C por 20 min. O pH foi neutralizado com a adição de 1,5 µl HCl 1 M. O cDNA marcado foi purificado em coluna Autoseq G50 (Amersham Biosciences, NJ, USA ). Após a purificação, as duas populações de cDNA marcado (amostra e referência) foram reunidas em um só tubo. Vale a pena ressaltar que, para cada amostra, foram hibridizadas

duas lâminas. Em uma, a amostra foi marcada com Cy3 e o RNA referência com Cy5 (lâmina controle ou *MAIN*) e na outra a mesma amostra foi marcada com Cy5 e o RNA referência com Cy3 (lâmina *SWAP*). Adicionou-se 2 µl de DNA poly(A) (2 µg/µl, Amersham Biosciences, NJ, USA) e 2 µl de DNA Cot1 (2 µg/µl, Invitrogen, Califórnia, USA) e reduziu-se o volume para 12,25µl. Foram adicionados 47,5 µl de tampão de hibridização (SSC 10X, SDS 0,2%), 23,75 µl de formamida deionizada, 9,5 µl de solução Denhardt's 50X e 2 µl de esperma de salmão 5 µg/µl.

Antes do uso, as lâminas de cDNA *microarray* foram incubadas em tampão de pré-hibridização (SSC 5X, SDS 0,2%, BSA 1% e solução Denhardt's 5X) por pelo menos 6h a 42°C. Foram então lavadas em água, centrifugadas para secagem e montadas na estação de hibridização – GeneTac Hybridization Station (Genomic Solutions, MI, USA) (BOWTELL e SAMBROOK 2003).

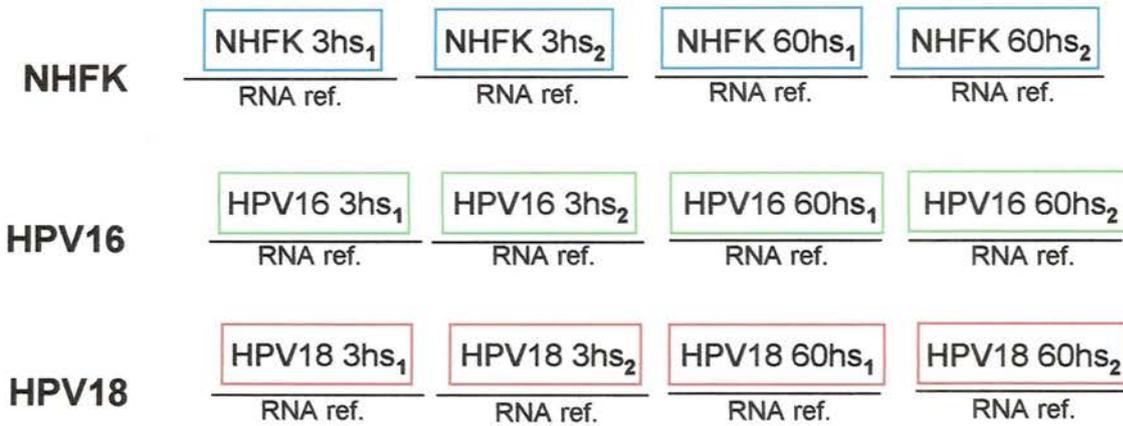
As reações foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e mantidas a 70° até aplicação sobre a lâmina. A reação de hibridização ocorreu a 42° por pelo menos 12 horas. Após a hibridização, as lâminas foram submetidas às seguintes lavagens: 5 min em SSC 2X, duas incubações de 10 min em SSC 0,1X - SDS 0,1% e duas incubações de 2,5 min em SSC 0,1X. Este procedimento foi realizado para as 24 amostras de RNA, totalizando 48 lâminas.

Vale a pena lembrar, que foram feitas réplicas de todos os experimentos, ou seja, para cada condição foram utilizados 2 RNA independentes e que foram comparados ao RNA referência (NHFK 3hs do

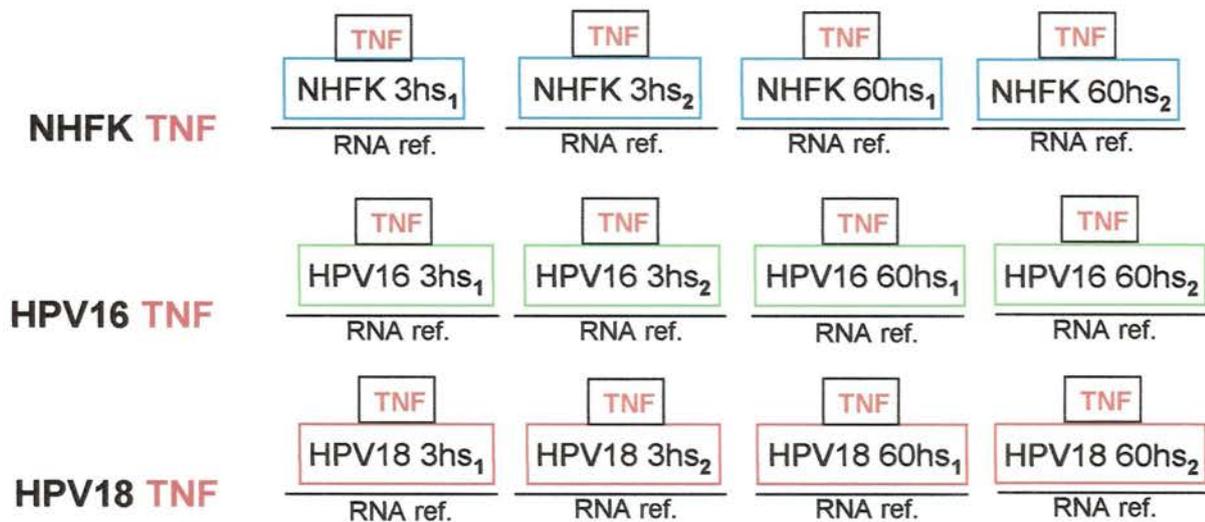
experimento 1). A utilização de um RNA referência possibilita a comparação horizontal entre as diferentes amostras (**Figura 2**).

O perfil do cDNA marcado, bem como a intensidade da marcação foram avaliados pelo protocolo elaborado por CARVALHO et al. (2003). O gel de agarose 1% em TAE 1X (40 mM tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 9,0) foi preparado em uma cuba apropriada. Alíquotas de 1µl das reações de marcação de cDNA com cada corante, já purificadas e sem adição de DNA polyA, DNA Cot1 e foram misturadas a 1 µl de tampão de corrida para DNA 3X (15% glicerol, TAE 3X, bromofhenol blue 0,75%). O marcador foi preparado a partir de uma alíquota de 1µl da reação de digestão do plasmídeo Pel com a enzima de restrição HindIII, à qual foram adicionados 1 µl de tampão 3X para DNA e 1µl do corante fluorescente Vistra Green<sup>TM</sup> (Amershan Biosciences, NJ, USA). A eletroforese foi realizada a 60 V por aproximadamente 30 min em TAE 1X. O gel foi lavado em água e a imagem digitalizada no scanner de câmera CCD (GeneTAC<sup>TM</sup> 2000, Genomic Solutions, MI, USA) e avaliada utilizando o software GeneTAC<sup>TM</sup> Analyser (Genomic Solutions, MI, USA).

## A – AMOSTRAS CONTROLE



## B – AMOSTRAS TRATADAS COM TNF



**Figura 2** – Amostras de RNA utilizadas nos experimentos de *microarray* e normalizadas através de um único RNA referência. Cada retângulo corresponde à uma das amostras de RNA extraído das células NHFK (queratinócitos normais - azul), HF698 (queratinócitos HPV16 - verde) e HF18Nco (queratinócitos HPV18 - vermelho), tratadas ou não com TNF, por 3 ou 60 horas. Os números 1 ou 2 identificam o experimento. As 24 amostras foram hibridizadas com o RNA referência (NHFK 3hs<sub>1</sub>).

#### 4.11.4 Captação das imagens

Os sinais de intensidade de fluorescência de cada *spot*, foram captados através de um scanner a laser confocal (ScanArray Express, PerkinElmer Life Sciences, MD, USA, laser power 100%, PMT50). Cada lâmina gerou uma tabela de dados para cada canal correspondente aos corantes Cy3 e Cy5. Para efeito de visualização, os sinais de intensidade são convertidos em uma escala de cor representados por verde para o canal 1 e vermelho para o canal 2. A sobreposição destas imagens gera sinais amarelos que representam intensidades semelhantes nos dois canais.

#### 4.11.5 Quantificação das imagens

A quantificação dos sinais permite, a obtenção de valores numéricos que são utilizados para estimar a quantidade de RNAm de cada amostra analisada. Devido à diferença na eficiência de incorporação dos corantes Cy3 e Cy5 na reação de marcação, foram realizadas duas hibridizações independentes para cada amostra de RNA. Na primeira, a amostra foi marcada com Cy3 e o RNA referência com Cy5 e na segunda ocorreu a inversão dos corantes, totalizando desta forma, 48 lâminas.

Os dados de cada *spot* de *microarray* contém dois componentes numéricos conhecidos como sinal e *background*. O sinal corresponde aos valores de intensidade associados aos dados reais da hibridização, ou seja, são números que provém da informação quantitativa do cDNA hibridizado. Por sua vez, o *background* corresponde aos valores de intensidade associados à eventos bioquímicos espúrios, como por exemplo, artefatos ou

reflexão de luz no comprimento de onda utilizado. Vale a pena ressaltar, que os cDNAs fixados nas lâminas são descritos como *sondas*, uma vez que suas sequências são conhecidas, ao passo que o cDNA marcado é denominado cDNA *alvo* (SOUTHERN et al. 1999). A distinção entre sinal *background* é um passo essencial para um bom experimento de *microarray*. Neste estudo, os valores de *background* são calculados individualmente para cada *spot*., através da máscara que define cada *spot* (valor do sinal de cada *spot* subtraído-se seu valor de *background* correspondente). A seguir, todos os genes utilizados como controle foram removidos das listas, restando um conjunto de 4600 genes a serem analisados. Em seguida, foi calculada a razão entre a amostra de interesse e a amostra referência (para cada um dos genes de todas as lâminas, utilizando-se os dois corantes) e então realizada a transformação destes valores aplicando-se o logaritmo na base dois ( $\log_2$ ), para facilitar a análise da razão dos dados.

#### 4.11.6 Normalização dos dados

Para a normalização dos dados, utilizamos um método de regressão não linear, localmente ponderado (método de LOESS), com *span* 0,4 e *grau* 2,0 (projeto Bioconductor <http://www.bioconductor.org>). *Span* e *grau* são dois parâmetros que controlam o ajuste local implementado pelo LOESS. Como a regressão utilizada é local, o tamanho de cada trecho da curva leva em consideração apenas os pontos próximos ( $\text{span} < 1$ ). O *grau* simplesmente determina qual é o grau do polinômio a ser utilizado na regressão local.

A normalização visa igualar a intensidade relativa dos dois fluoróforos, uma vez que a eficiência de incorporação do corante Cy3 é maior do que o Cy5. Este tipo de análise possibilita avaliar a influência da intensidade de sinal nas razões de expressão de cada gene. Além disso, para determinar a reprodutibilidade das réplicas, foi calculado o Índice de Correlação de Pearson que possibilita averiguar se existe correlação linear entre os dados provenientes de duas lâminas (*MAIN* e *SWAP*).

#### 4.11.7 Análise dos Dados

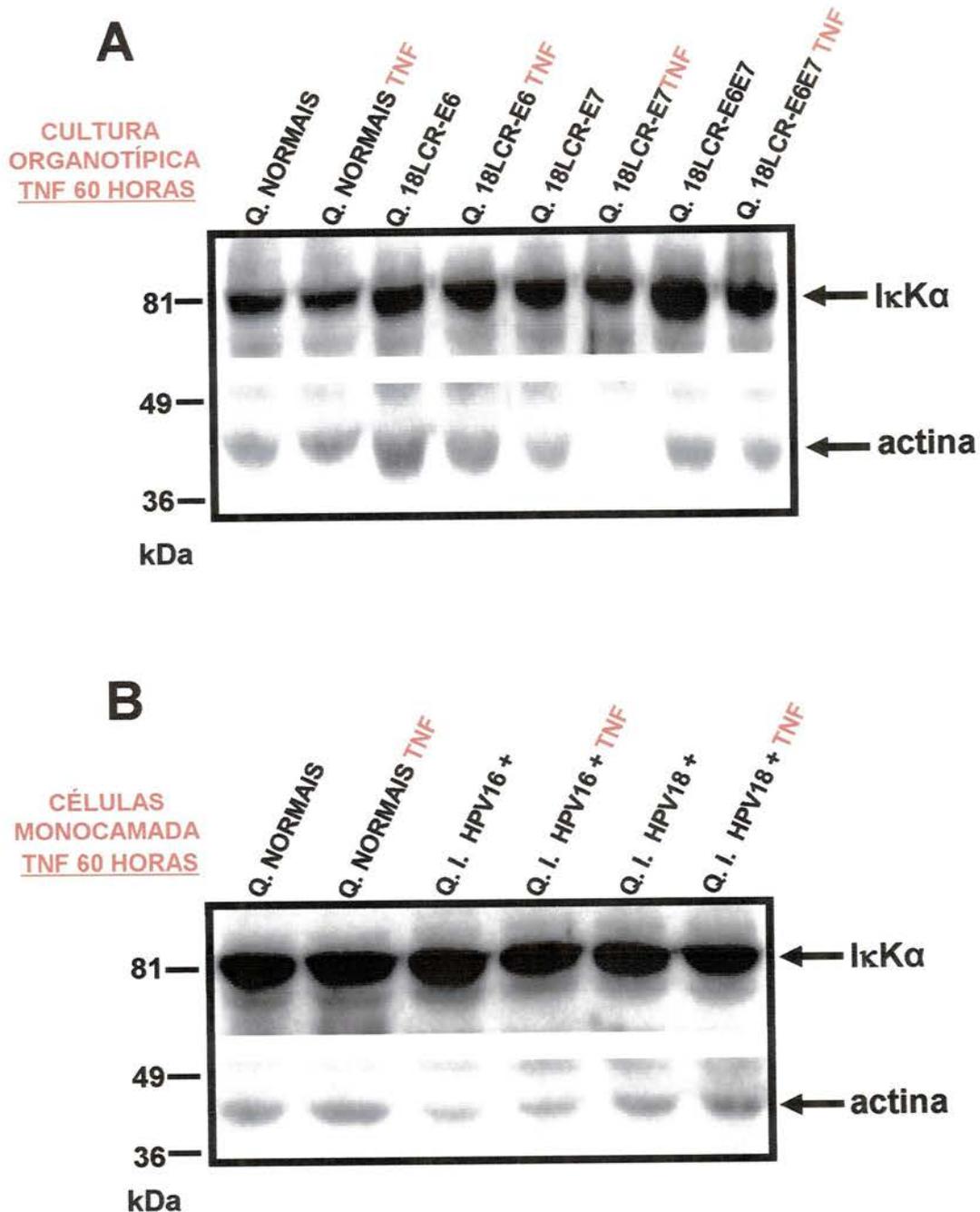
A abordagem matemática e estatística para as análises dos dados gerados por *microarray* tem sido amplamente discutida na literatura e utilizada com sucesso pelo nosso grupo (GOMES et al. 2003; MEIRELES et al. 2003; STOLF et al. 2003; MEIRELES et al. 2004). Diversos cuidados devem ser considerados na elaboração, análise e interpretação dos resultados de experimentos de *microarray*. Dentre eles, a escolha do método para normalização da fluorescência dos dois canais, o número de experimentos e a forma de expressar os resultados (QUACKENBUSH 2001). Neste estudo, os dados foram analisados através do teste estatístico ANOVA, baseado no cálculo da variância das médias para cada gene (vale a pena ressaltar que cada valor corresponde à média de 4 valores de intensidade, 2 gerados por experimentos independentes e 2 pela inversão dos corantes). Além disso, as médias de expressão de cada gene foram comparadas entre duas amostras (Teste t), gerando listas com os genes mais diferencialmente expressos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DO EFEITO DO TNF E HPV NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ e SUMO

No presente estudo foram analisados os níveis de expressão de alguns fatores envolvidos na via de ativação de NF- $\kappa$ B. Utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir das linhagens celulares NHFK (queratinócitos normais), HF698 (queratinócitos imortalizadas com HPV16) e HF18Nco (queratinócitos imortalizados com HPV18), avaliaram-se os níveis de expressão das proteínas IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e SUMO, uma proteína envolvida na prevenção da degradação de algumas proteínas, incluindo I $\kappa$ B $\alpha$ . Os níveis de expressão destas proteínas também foram avaliados em extratos derivados de culturas organotípicas (RAFT), uma vez que este sistema de cultura é capaz de reproduzir o programa natural de diferenciação dos queratinócitos e os efeitos desta diferenciação na expressão dos genes virais (CHOW e BROKER 1997).

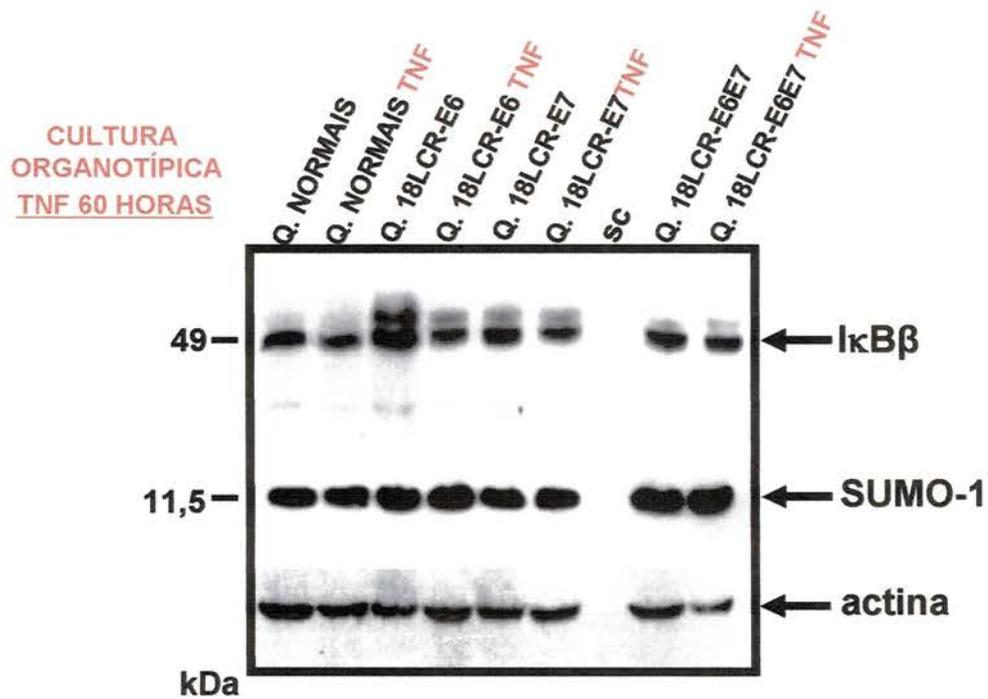
Os níveis de expressão de IKK $\alpha$ , kinase ativada pelo TNF e principal promotora da ativação de NF- $\kappa$ B, não foram alterados após o tratamento de 60 horas com esta citocina, em nenhum dos tipos celulares estudados (Figura 3 – A e B).



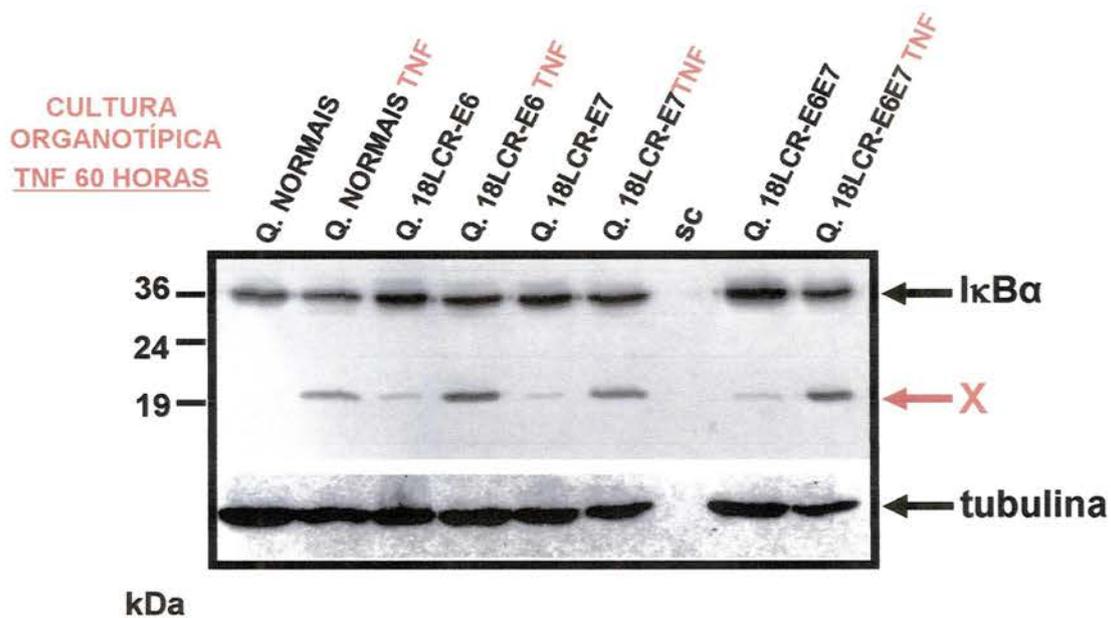
**Figura 3** - A) Efeitos do TNF na expressão de IKK $\alpha$  em amostras de culturas organotípicas de queratinócitos normais e transduzidos com o gene E6 e/ou E7 de HPV18, após tratamento de 60 horas com 2nM de TNF. B) Efeitos do TNF na expressão de IKK $\alpha$  em culturas em monocamada. Foram utilizados queratinócitos normais (Q.) ou imortalizados (Q.I.) com HPV16 ou 18, tratados conforme descrito acima. Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais.

Em seguida, foi avaliado o efeito do TNF nos níveis das proteínas I $\kappa$ B $\beta$  e SUMO, em amostras derivadas de culturas organotípicas (**Figura 4**). Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão de I $\kappa$ B $\beta$  nas amostras estudadas. Vale a pena ressaltar a detecção de uma banda logo acima de I $\kappa$ B $\beta$ , presente apenas nas células transduzidas com os oncogenes E6 e/ou E7. Esta banda poderia corresponder à proteína I $\kappa$ B $\beta$  fosforilada. Este dado necessita de diferentes condições experimentais, como por exemplo, amostras tratadas com TNF por um período de tempo menor, para uma melhor avaliação. Não foi observada a presença de nenhuma banda correspondente a I $\kappa$ B $\beta$  sumonilado, apenas o reconhecimento da proteína SUMO em sua forma livre (aproximadamente 11,5 KDa).

Finalmente, foram avaliados os níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  após tratamento de 60 horas com TNF, em amostras de culturas organotípicas. Observou-se uma leve redução nos níveis de expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  nas culturas organotípicas originadas de queratinócitos normais ou transduzidos com os genes E6, E7 e E6/E7 de HPV18 (**Figura 5**). Além disso, após tratamento com TNF, foi detectada uma banda de aproximadamente 20 kDa em todas as amostras, exceto na cultura organotípica originada de queratinócitos normais. Esta observação sugeriu que esta banda poderia ser um produto da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ . Para este ensaio, foi utilizado um anticorpo policlonal que reconhece a porção carboxiterminal da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ .

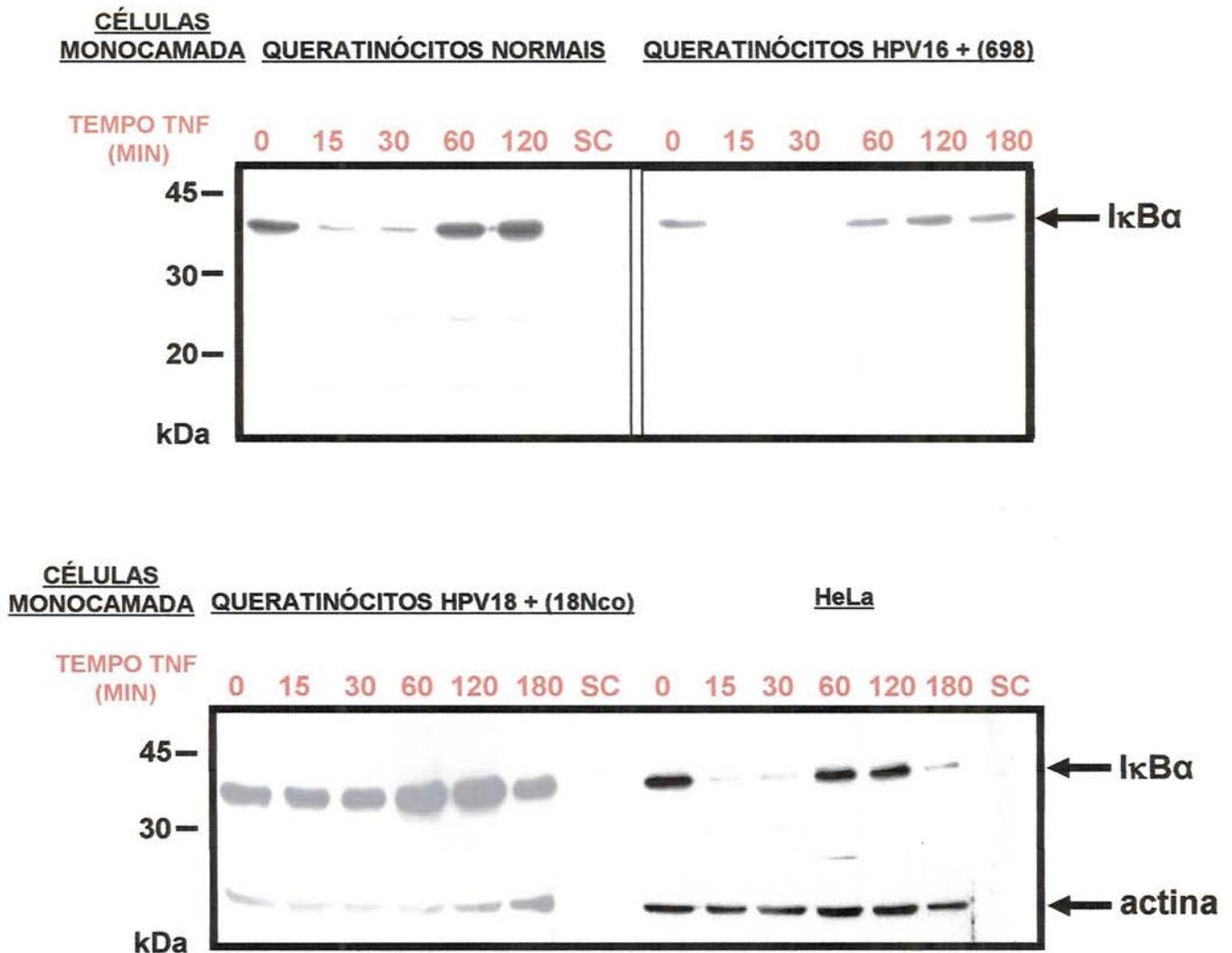


**Figura 4** - Efeitos do TNF na expressão de IκBβ e SUMO-1 em amostras de culturas organotípicas de queratinócitos normais ou transduzidos com os genes E6, E7 e E6/E7 de HPV18, após tratamento de 60horas com 2nM de TNF. Os níveis de expressão destas proteínas foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais. SC – anticorpo secundário apenas.



**Figura 5** - Efeitos do TNF na expressão de IκBα em amostras de culturas organotípicas de queratinócitos normais, transduzidos com os genes E6, E7 e E6/E7 de HPV18, após tratamento de 60 horas com 2nM de TNF. Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais. SC – anticorpo secundário apenas. A seta vermelha indica uma banda desconhecida de aproximadamente 20 kDa.

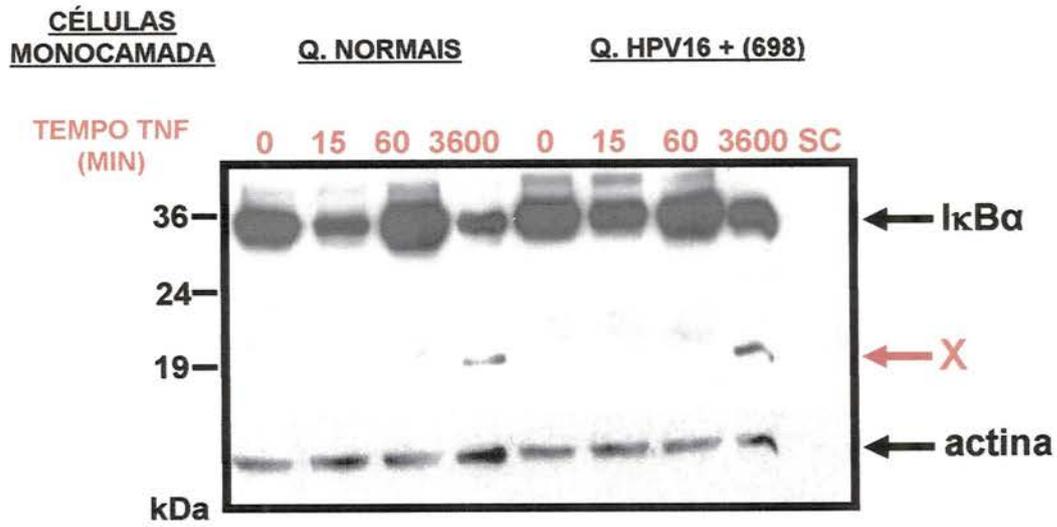
A partir destas observações, optamos primeiramente por realizar uma cinética de degradação do fator  $I\kappa B\alpha$ , para determinar o tempo de tratamento com TNF que induziria sua maior degradação. Na **Figura 6**, tanto nas células normais, como nas células imortalizadas com HPV16, HPV18 e em HeLa (linhagem derivada de um adenocarcinoma de útero, HPV 18 positiva), observou-se uma nítida diminuição nos níveis de expressão de  $I\kappa B\alpha$  após 15-30 minutos de tratamento com TNF. Após este período, os níveis de expressão desta proteína voltam a ser semelhantes aos observados no controle, conforme descrito na literatura para outros tipos celulares (TRAENCKNER et al. 1994; KARIN e DELHASE 2000). Interessantemente, na linhagem imortalizada com HPV18, observamos um aumento generalizado nos níveis de expressão desta proteína, quando comparados aos outros tipos celulares avaliados. Este efeito pode ser ocasionado por alterações na via de sinalização de TNF previamente observadas nestas células (VILLA e SCHLEGEL 1991; VILLA et al. 1992; VIEIRA et al. 1996). No entanto, neste experimento, a banda de 20 kDa não foi observada, fato que associou o aparecimento desta banda ao evento resultante da exposição prolongada ao TNF.



**Figura 6** - Efeitos do TNF na expressão de IκBα em queratinócitos normais, queratinócitos imortalizados com HPV 16 (HF698), queratinócitos imortalizados com HPV 18 (HF18Nco) e em células HeLa (adenocarcinoma do colo uterino, HPV 18 positivo), antes e após tratamento de 15, 30, 60, 120 e 180 minutos, com 2nM de TNF. Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir de culturas em monocamada. SC – anticorpo secundário apenas.

### **5.1.1 Análise da banda de 20 kDa utilizando-se um anticorpo policlonal anti- I $\kappa$ B $\alpha$ em diversos tipos celulares**

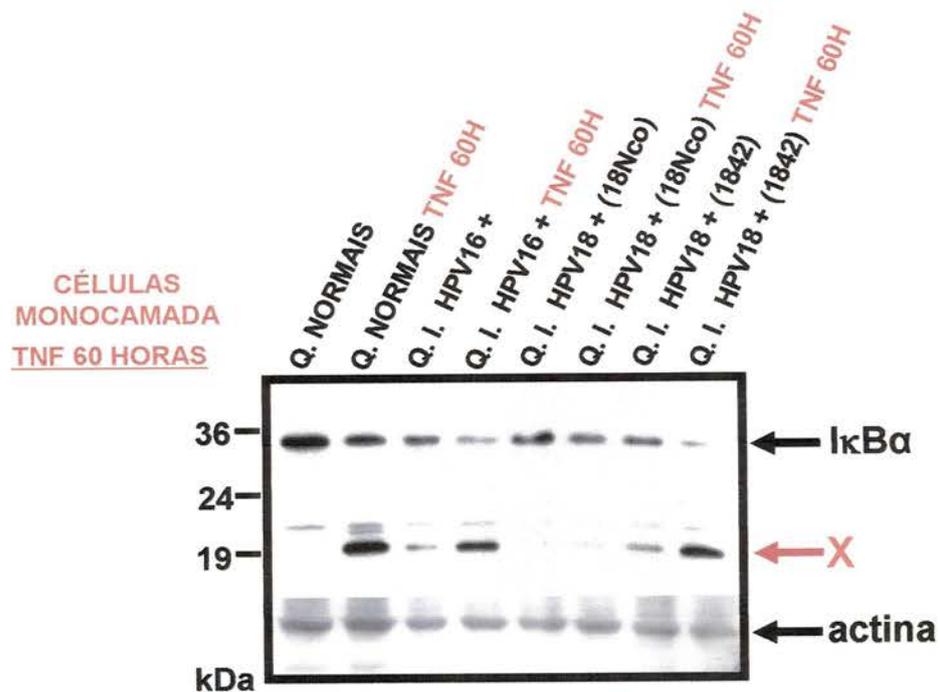
Com o objetivo de avaliar o período em que esta banda era detectada, optamos por determinar os níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  e da banda de 20 kDa, em células normais e imortalizadas com HPV16, tratadas com TNF por diferentes períodos de tempo (15, 60 minutos e 60 horas) (**Figura 7**). Neste experimento, observou-se a presença da banda de 20 kDa apenas nas amostras tratadas por 60 horas com TNF.



**Figura 7** - Efeitos do TNF na expressão de IκBα em queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 (HF698), antes e após tratamento de 15, 60 e 3600 minutos (60 horas), com 2nM de TNF. Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir de culturas em monocamada. A seta vermelha indica a banda de 20 kDa (representada pela letra X). SC – anticorpo secundário apenas.

Em seguida, comparamos o efeito anteriormente descrito em queratinócitos normais e nas linhagens imortalizadas com HPV16 (HF698) e 18 (HF18Nco), além de outra linhagem de queratinócitos imortalizados com HPV18 (HF18.42). Esta última, foi imortalizada apenas com a LCR e os oncogenes virais E6 e E7 de HPV18, enquanto que a linhagem HF18Nco foi imortalizada com o genoma completo (**Figura 8**). Neste experimento, foi observada uma leve diminuição de I $\kappa$ B $\alpha$  em todas as células (vale a pena ressaltar, que após tratamento com 60 horas de TNF, os níveis de expressão desta proteína diminuem ligeiramente), além da clara indução da banda de 20 kDa. Nas células imortalizadas com HPV, a banda em questão é detectada em baixos níveis de expressão, mesmo na ausência de tratamento com TNF, enquanto que nos queratinócitos normais o mesmo efeito não é observado.

Interessantemente, na linhagem HF18Nco não observamos a indução desta banda após o tratamento com TNF. Talvez esta diferença em relação as outras linhagens, possa ser ocasionada pelas alterações na via de sinalização mediadas pelo TNF nestas células. Estudos anteriores apontam diferenças importantes na resposta antiproliferativa mediada pelo TNF nesta linhagem celular, quando comparada aos queratinócitos normais e à linhagem HF698 (VIEIRA et al. 1996).



**Figura 8** - Comparação do efeito do TNF na expressão de IκBα em queratinócitos normais, imortalizados com HPV16 - genoma completo (HF698), HPV18 - genoma completo (HF18Nco) e HPV18 - LCRE6E7 (HF1842), antes e após tratamento de 60 horas com 2nM de TNF. Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir de culturas em monocamada. A seta vermelha aponta a presença da banda de 20 kDa (representada pela letra X).

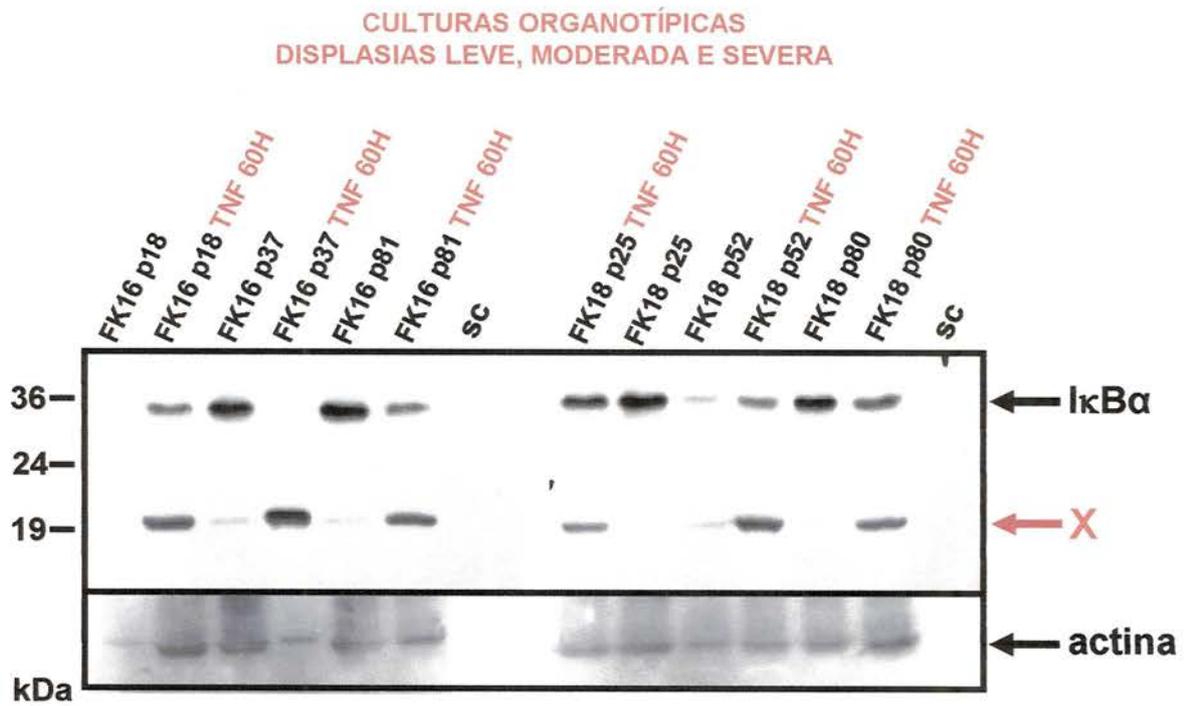
Adicionalmente, realizamos o mesmo ensaio avaliando os níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  em amostras de culturas organotípicas estabelecidas a partir de queratinócitos transfectados com o genoma completo de HPV 16 e 18 e mantidos em cultura ao longo de um número variável de passagens (**Figura 9**). As culturas organotípicas derivadas das células FK16p18 e FK18p25 caracterizam morfológicamente uma displasia leve, as células FK16p37 e FK1852 uma displasia moderada e as células FK16p81 e FK18p80 uma displasia severa (STEENBERGEN et al. 1998). Após o tratamento de 60 horas com TNF, nota-se a redução dos níveis de expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  em todas as amostras avaliadas. A indução da banda de 20 kDa foi observada claramente nas células infectadas com ambos os tipos de vírus.

#### **5.1.2 Determinação do tempo mínimo de tratamento com TNF para a detecção da banda de 20 kDa**

Em seguida, optamos por acompanhar a detecção da banda X por períodos prolongados de exposição ao TNF em queratinócitos normais e em células imortalizadas com HPV18 (HF18Nco) **Figura 10 – A**. Em queratinócitos normais, observa-se a diminuição dos níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  nos primeiros 30 minutos de tratamento, seu aumento após 1 hora e sua estabilização nos períodos seguintes. Este efeito é esperado, uma vez que o fator de transcrição NF- $\kappa$ B é capaz de ativar a transcrição do gene de I $\kappa$ B $\alpha$  (KARIN e DELHASE 2000). Em contrapartida, pode-se observar o aumento gradativo dos níveis de expressão da banda de 20 kDa, a partir das

24 horas de tratamento. Desta forma, poderia-se presumir que se trata de um gene induzido pelo TNF após aproximadamente 24 horas de tratamento em queratinócitos e com pico máximo de expressão a partir de 60 horas. Não foi possível um tratamento por mais de 72 horas com TNF, uma vez que os queratinócitos confluem após este período prolongado de tempo. Por outro lado, não é viável realizar o tratamento com TNF com uma densidade inicial menor, devido as características de densidade mínima em cultura.

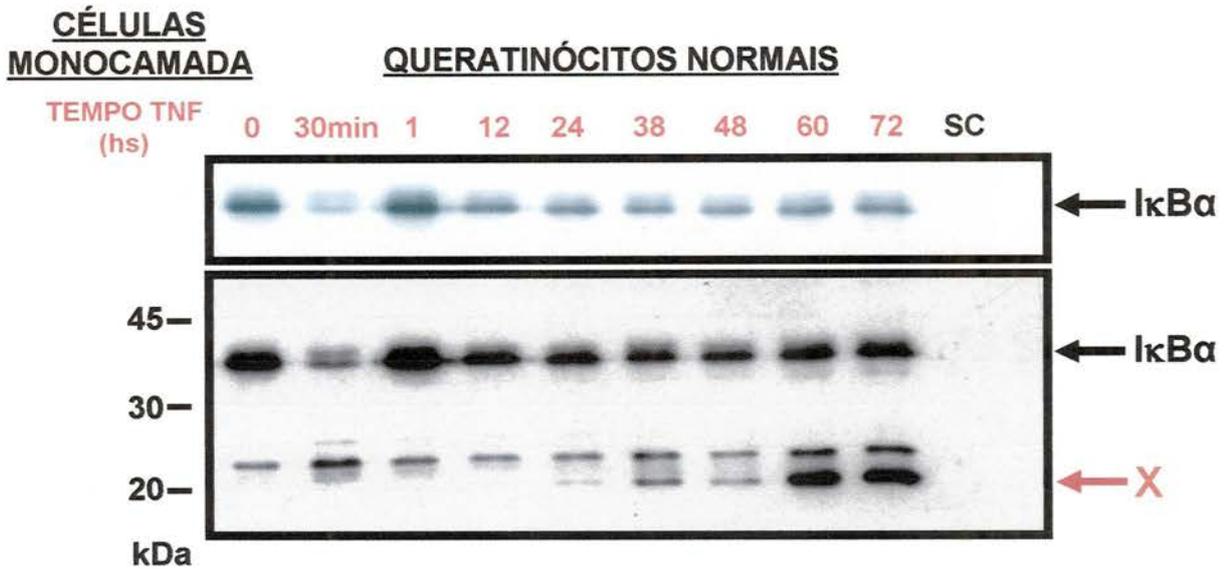
Nas células imortalizadas com HPV 18 (HF18Nco), foi observado o mesmo efeito em relação aos níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  (**Figura 10 - B**). Contrariamente, não constatou-se a presença da banda de 20 kDa. Portanto, tornam-se necessários experimentos utilizando outros tipos celulares imortalizados e transformados por HPV, que possibilitem ulteriores conclusões.



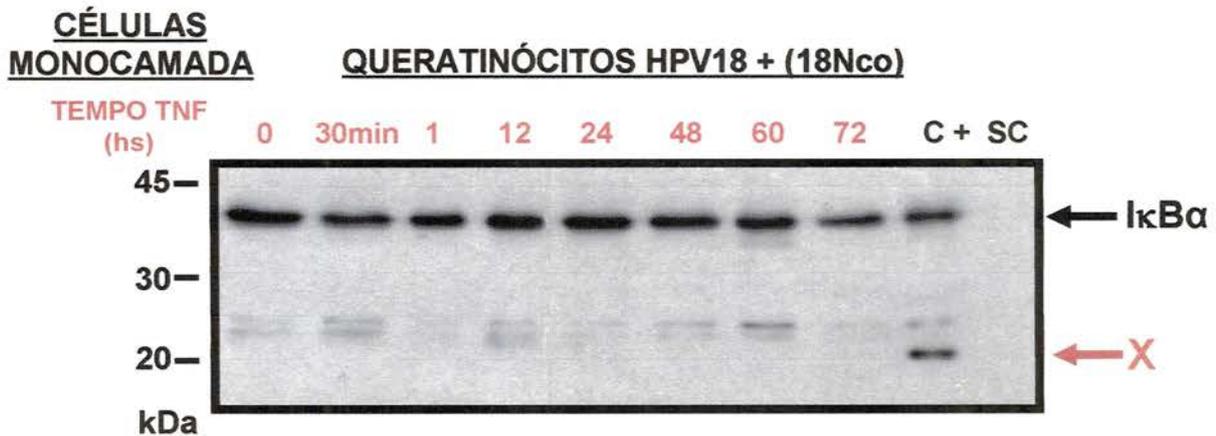
**Figura 9** - Efeitos do TNF na expressão de IκBα em amostras originadas de culturas organotípicas de queratinócitos imortalizados ou transformados por HPV 16 ou 18 e que caracterizam displasias leves, moderadas e severas. Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot. A seta vermelha aponta a detecção de uma banda de aproximadamente 20 kDa. Na primeira canaleta (FK16p18) ocorreu a perda da amostra durante a aplicação. SC – anticorpo secundário apenas.

A

70



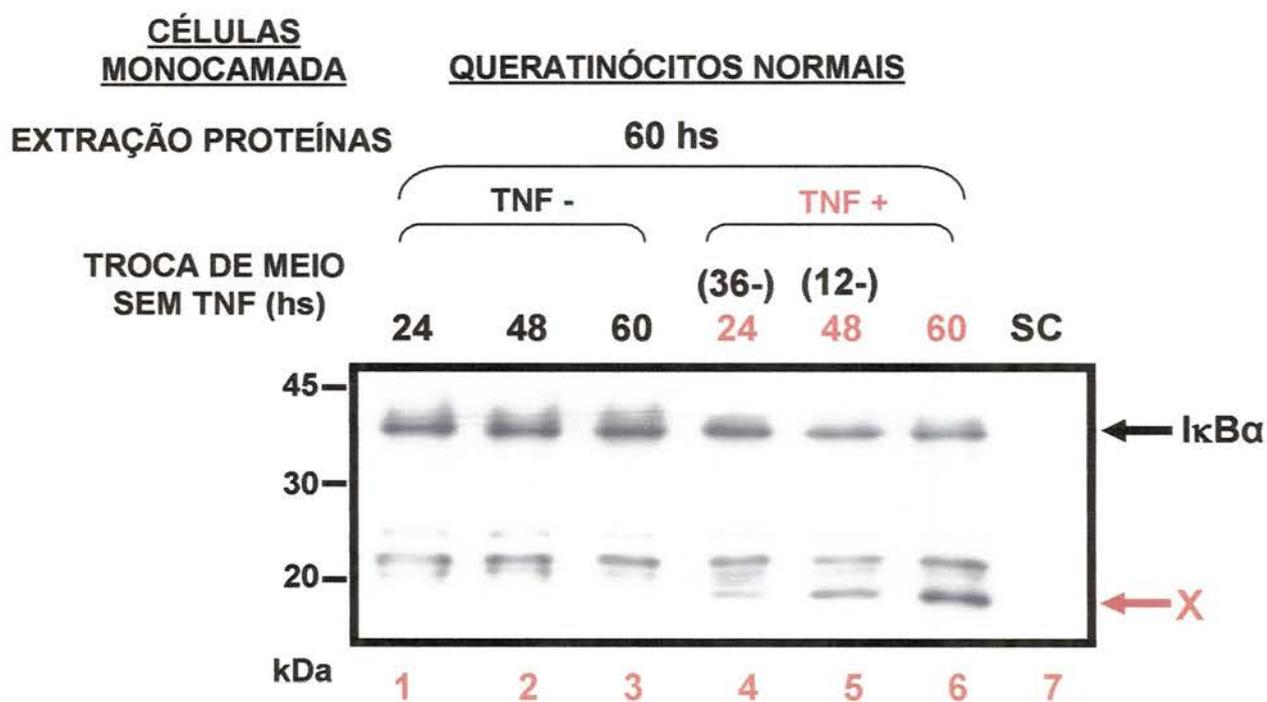
B



**Figura 10** - Efeitos do TNF na expressão de IκBα após 30 minutos, 1, 12, 24, 38, 48, 60 e 72 horas de tratamento com 2nM de TNF. **A)** Avaliação dos níveis de expressão de IκBα em queratinócitos normais (painel superior). O painel inferior representa o mesmo imunoblot exposto por um período maior para evidenciar o aparecimento da banda de 20 kDa. **B)** Avaliação dos níveis de expressão de IκBα em queratinócitos imortalizados com HPV18 (18Nco). Os níveis de expressão desta proteína foram determinados por Western Blot utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir de culturas em monocamada. C+ - controle positivo; SC - anticorpo secundário apenas. A seta vermelha aponta a banda de 20 kDa

### 5.1.3 Efeito da interrupção do tratamento com TNF na detecção da banda de 20 kDa

Com o objetivo de avaliar o efeito da interrupção do tratamento com TNF no aparecimento da banda de 20 kDa, foi realizado um experimento em que as células foram tratadas por 24, 48 e 60 horas com TNF. Os tratamentos de 24 e 48 horas foram seguidos respectivamente por incubações de 36 e 12 horas com meio de cultura fresco (sem TNF), até completar 60 horas. Neste ponto, foram obtidos extratos protéicos totais. Pode-se observar o aparecimento da banda em questão após 24 horas de tratamento, conforme descrito anteriormente (**Figura 10 - A**). Vale a pena ressaltar, que a banda é detectada mesmo após 36 horas de incubação na ausência de TNF. Este dado mostra que nestas células e para esta banda em particular, os efeitos do TNF se estendem além do período de incubação na presença desta citocina. O mesmo efeito é observado quando as células são tratadas por 48 horas com TNF e depois cultivadas com meio fresco sem TNF. Neste caso, a banda de 20 kDa é mais evidente (**Figura 11, colunas 4 e 5**).

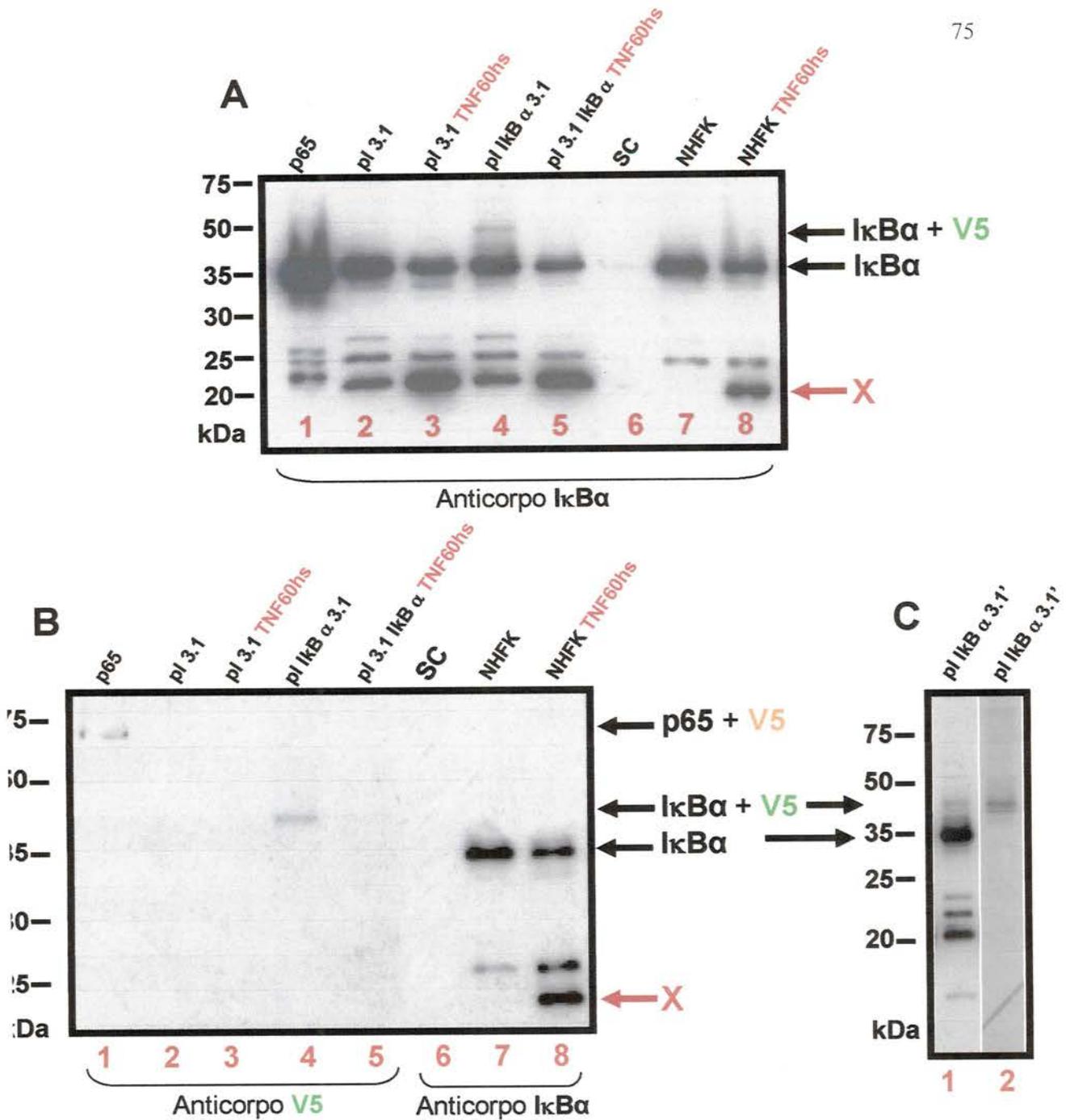


**Figura 11** - Avaliação do efeito do tratamento com TNF em relação à detecção da banda de 20 kDa. Os queratinócitos foram tratados durante 24, 48 e 60 horas com TNF. Os tratamentos de 24 e 48 horas foram seguidos respectivamente por incubações de 36 e 12 horas com meio de cultura fresco (colunas 4 e 5). A banda de 20 kDa é detectada mesmo após 36 horas de incubação na ausência de TNF. A seta vermelha aponta a presença da banda de 20 kDa. SC – anticorpo secundário apenas.

#### 5.1.4 Ensaios para determinar se a banda de 20 kDa corresponde à um produto de degradação de I $\kappa$ B $\alpha$

Para averiguarmos se a banda de 20 kDa correspondia ao produto de degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , o gene que codifica a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  humana foi clonado e inserido em um vetor para expressão transiente e transfectado em queratinócitos normais. Este vetor, pcDNA3.1/V5His(B), contém uma seqüência localizada na região 3' do sítio de clonagem, que insere um peptídeo de 14 aminoácidos na região C terminal da proteína recombinante. Este peptídeo pode ser detectado por um anticorpo específico (V5 anti-*flag*). Se a banda de 20 kDa correspondesse à um produto de degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , este experimento permitiria detectar esta proteína através da seqüência *flag* presente na extremidade carboxiterminal. A análise através de Western Blot utilizando o anticorpo contra I $\kappa$ B $\alpha$ , permitiu detectar a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  endógena e a expressa a partir do vetor (**Figura 12 - A**). Esta última, apenas foi detectada nas células que receberam o vetor de expressão contendo a seqüência do gene I $\kappa$ B $\alpha$ . Conforme esperado, após tratamento com TNF, observou-se a diminuição nos níveis de expressão desta proteína (**Figura 12 - A, colunas 4 e 5**, respectivamente). Em seguida, avaliamos a expressão da proteína recombinante I $\kappa$ B $\alpha$ *flag* nas células transfectadas, utilizando o anticorpo anti-*flag* (**Figura 12 - B**). A expressão da proteína foi observada apenas nas células transfectadas com o vetor I $\kappa$ B $\alpha$ *flag*. No entanto, nas mesmas células tratadas por 60 horas com TNF, não foi detectada a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  recombinante e a proteína de 20 kDa (**Figura 12 - B, colunas 4 e 5**). A coluna B1 corresponde ao controle positivo

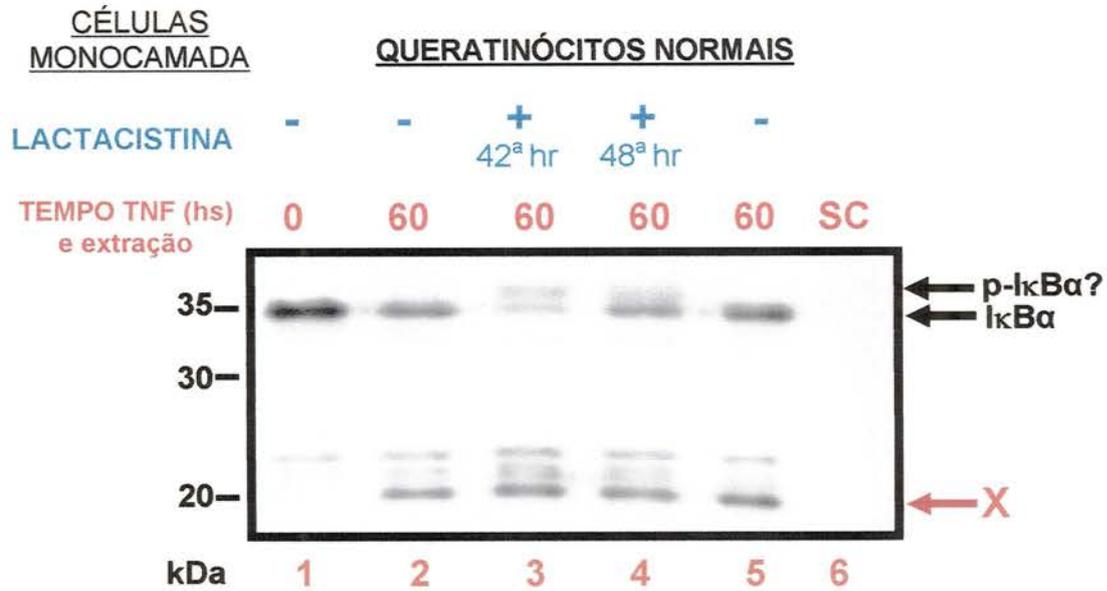
(proteína p65 murina recombinante) e a **Figura C** é a aproximação de duas tiras de filme de um mesmo gel, onde a coluna 1 foi revelada com anticorpo anti I $\kappa$ B $\alpha$  e a tira 2 com anti-*flag*



**Figura 12** - Avaliação da expressão de IκBα **A)** Detecção da proteína IκBα endógena e recombinante em extratos protéicos totais de células transfectadas com vetor de expressão pcDNA3.1/V5His(B). A1- extrato protéico controle de células que expressam a proteína p65flag, A2- células transfectadas com vetor vazio, A3- células transfectadas com vetor vazio tratadas com TNF por 60 horas, A4- células transfectadas com vetor que expressa IκBαflag, A5- células que expressam IκBαflag, tratadas com TNF por 60 horas, A6- anticorpo secundário (SC), A7- queratinócitos normais e A8- queratinócitos normais tratados com TNF por 60 horas. **B)** Detecção da proteína IκBα recombinante através do anticorpo V5. As amostras correspondem às mesmas descritas para a figura 7A. **C)** Detecção na mesma membrana de IκBαflag com anticorpo anti-IκBα (C1) e com anti-flag (C2). A seta vermelha aponta a presença da banda de 20 kDa.

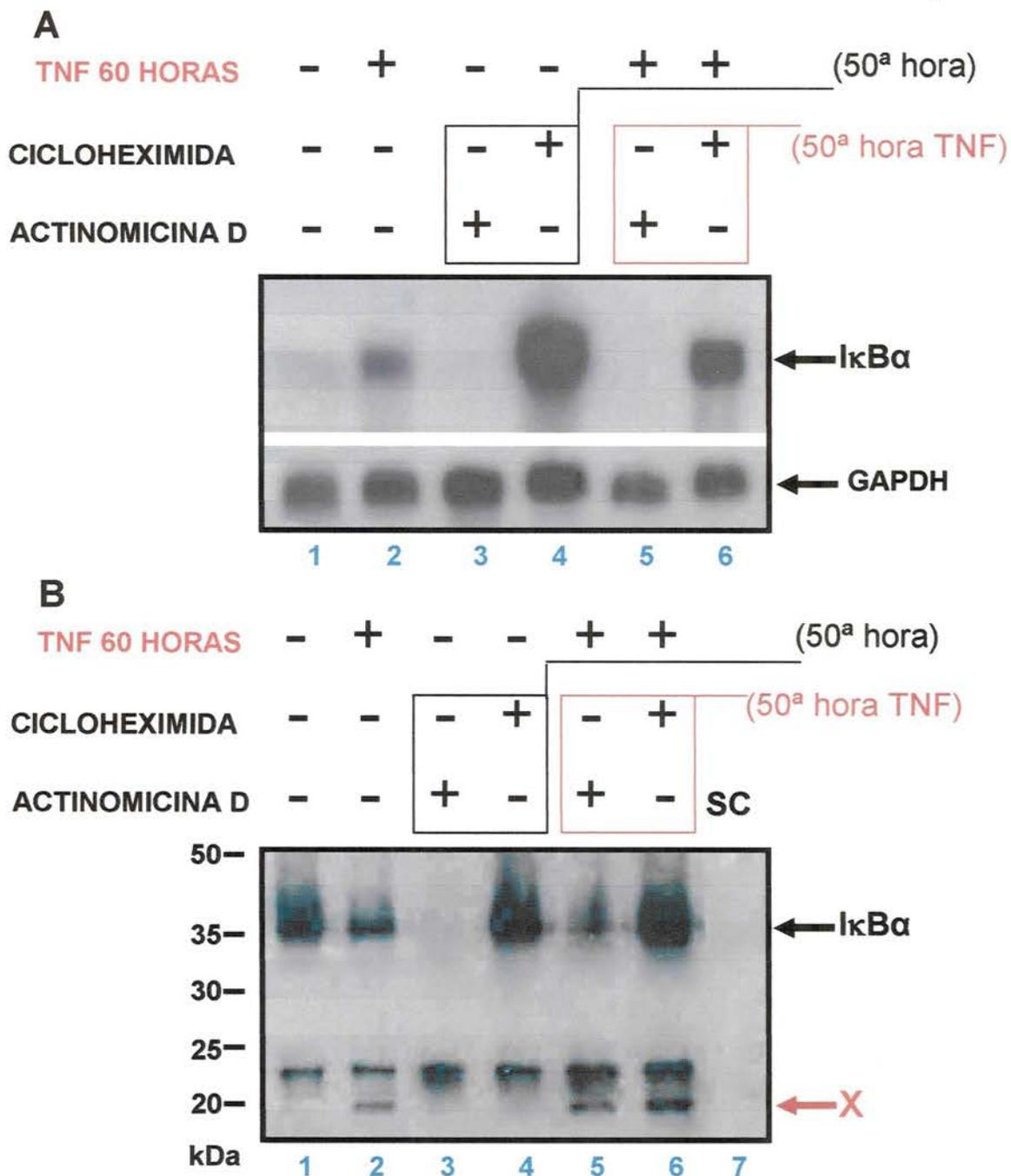
Desta forma, um outro experimento realizado para complementar os dados acima apresentados, foi o ensaio de inibição do proteasoma. Para este fim, utilizamos a lactacistina, um inibidor irreversível do sistema de proteasoma. Esta substância age especificamente bloqueando a atividade da sub-unidade beta da subunidade 20S do proteasoma, impedindo assim a degradação das proteínas por esta via.

Os queratinócitos foram tratados inicialmente com TNF e a lactacistina foi adicionada ao meio na 42<sup>a</sup> e 48<sup>a</sup> hora, pontos de tratamento justificados pela detecção da banda de 20 kDa com maior intensidade (**Figura 13**). Pode-se observar que os níveis de expressão da banda anteriormente citada não diminuem após o tratamento com lactacistina, fato que corrobora com os dados anteriormente descritos, ou seja, que a proteína em questão parece não ser originada da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ . Interessantemente, após o tratamento com TNF e lactacistina, os níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  diminuem, efeito acompanhado do aparecimento de uma banda de peso molecular um pouco maior que da I $\kappa$ B $\alpha$ , banda que poderia representar a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada (**Figura 13, colunas 3 e 4**).



**Figura 13** – Efeito do tratamento com lactacistina nos níveis de expressão da banda de 20 kDa. Os queratinócitos foram tratados inicialmente com TNF por 60 horas e a lactacistina foi adicionada ao meio na 42<sup>a</sup> e 48<sup>a</sup> hora (colunas 3 e 4). Pode-se observar que os níveis de expressão da banda anteriormente citada não diminuem após o tratamento com lactacistina. Por outro lado, os níveis de expressão de IκBα diminuem e este efeito é acompanhado pelo aparecimento de uma banda levemente acima desta, que provavelmente representa a proteína IκBα fosforilada (colunas 3 e 4). SC – anticorpo secundário apenas. A seta vermelha indica a proteína de 20 kDa.

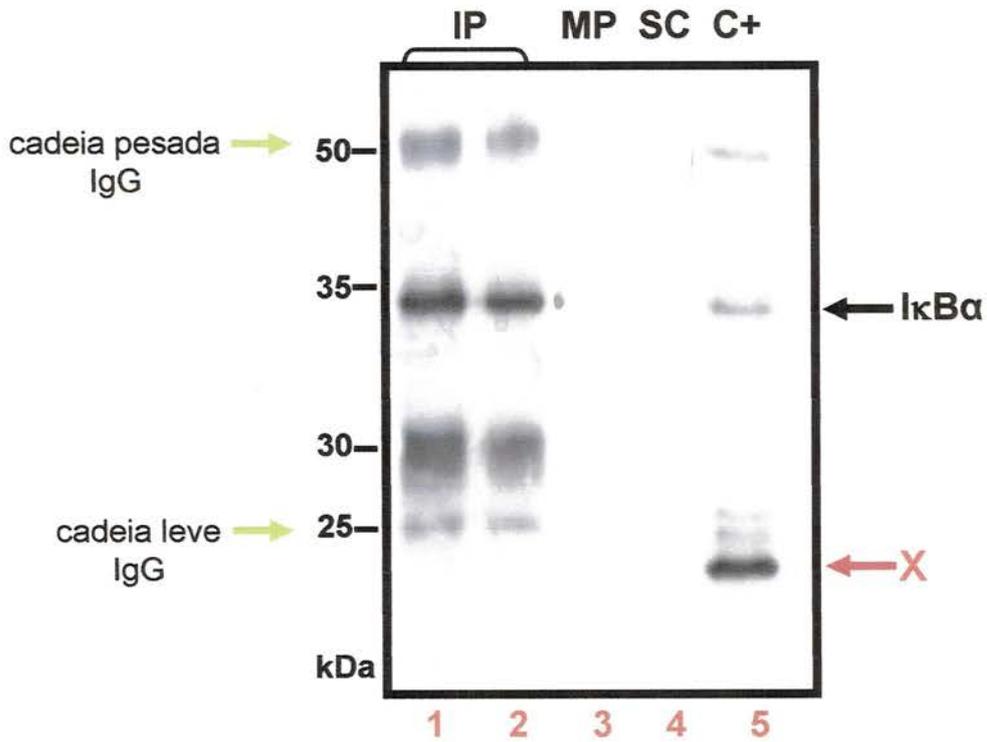
A **Figura 14** visa corroborar com os dados anteriormente obtidos. Amostras de RNA e extratos protéicos obtidos de culturas de queratinócitos foram tratadas com 2nM de TNF por 60 horas, sendo que nas últimas 10 horas foram adicionados actinomicina D (um inibidor da transcrição) ou cicloheximida (um inibidor da tradução). Conforme esperado, os níveis do transcrito  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  são baixos em queratinócitos normais e são induzidos após tratamento com TNF. Além disso, observamos que o tratamento com actinomicina D reduz claramente os níveis deste transcrito. Por outro lado, os níveis do transcrito  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  aumentam na presença de cicloheximida (**Figura 14 - A**). Logo, analisamos os níveis de expressão da proteína  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  e da proteína de 20 kDa em extratos protéicos obtidos a partir de culturas de queratinócitos tratadas conforme descrito acima (**Figura 14 - B**). Neste caso, observamos que o tratamento com TNF e/ou actinomicina D reduz os níveis de expressão de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . Por outro lado, observamos níveis de expressão maiores da proteína  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  na presença de cicloheximida.



**Figura 14** - Efeito do tratamento com actinomicina D ou cicloheximida nos níveis do transcrito e proteína  $I\kappa B\alpha$ . Os queratinócitos normais foram tratados com TNF e a actinomicina D ou cicloheximida foram adicionadas na 50<sup>a</sup> hora **A**) A presença do transcrito de  $I\kappa B\alpha$  foi determinada por Northern Blot. Observa-se o aumento dos níveis do transcrito na presença de TNF, cicloheximida ou ambos (colunas 2, 4 e 6). Por outro lado, após tratamento com actinomicina D os níveis do transcrito são indetectáveis (3 e 5). **B**) Os níveis de expressão da proteína  $I\kappa B\alpha$  foram determinadas por Western Blot. Os níveis de expressão desta proteína diminuem após tratamento com TNF, actinomicina D ou ambas (colunas 2, 3 e 5), não sendo afetados pelo tratamento com cicloheximida. Por outro lado, os níveis de expressão da banda de 20 kDa não foram afetados pelo tratamento com cicloheximida ou actinomicina D (colunas 3, 5 e 6). SC – anticorpo secundário apenas.

### 5.1.5 Estratégia para purificação e identificação da banda de 20 kDa

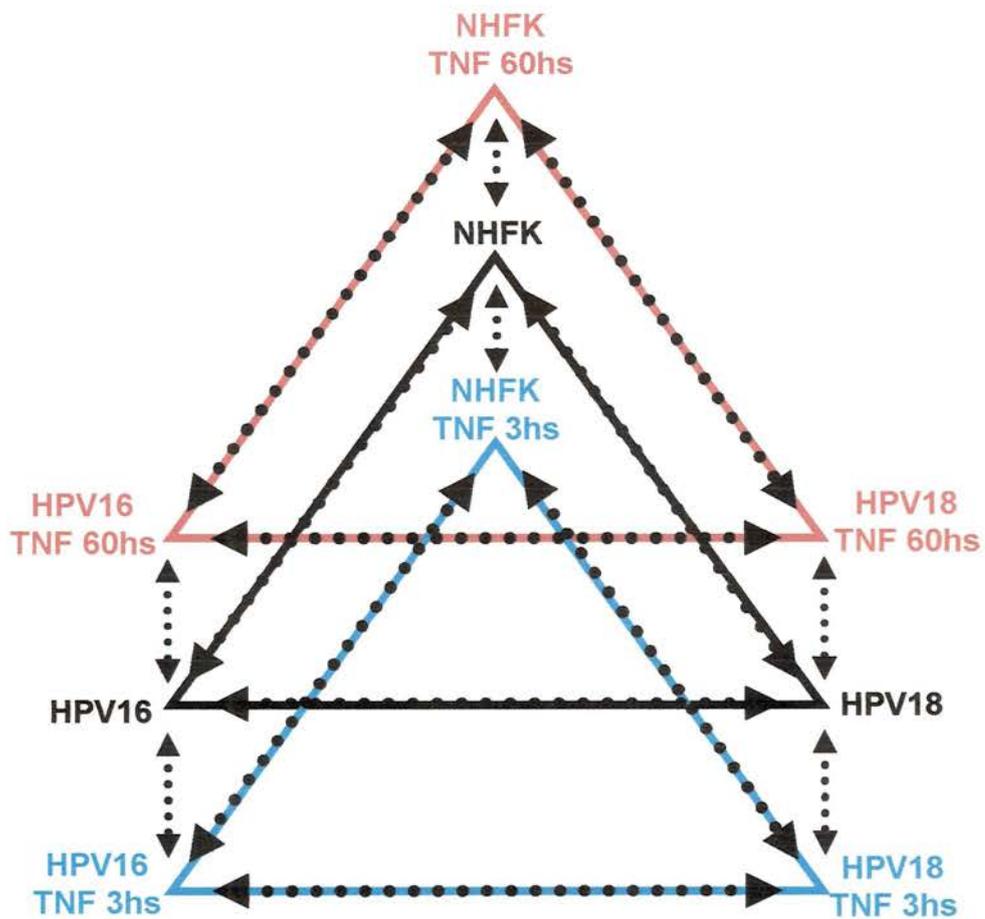
Em vista destes resultados, optamos por seqüenciar a proteína de 20 kDa. Com o objetivo de purificar esta proteína para tal fim, realizamos um ensaio de imunoprecipitação, utilizando o anticorpo  $I\kappa B\alpha$ . Podemos observar claramente a imunoprecipitação da proteína  $I\kappa B\alpha$ , contrariamente da proteína de 20 kDa. Este efeito poderia ser explicado pelo fato de estarmos utilizando um anticorpo policlonal. Poderíamos hipotetizar, que o sub-grupo de anticorpos capaz de reconhecer a proteína de 20 kDa não seja suficiente para imunoprecipitá-la. (**Figura 15, colunas 1 e 2**). Por último, sempre na tentativa de purificar a banda para seu sequenciamento, 200ug de extrato protéico total de queratinócitos tratados com TNF, foram submetidos à um gel SDS-PAGE médio a 15%. A região da banda em questão foi cortada da membrana de PVDF e o material encaminhado ao Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. No entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios devido à co-migração de diferentes proteínas. Optamos então por realizar ensaios em géis bi-dimensionais que estão em andamento em colaboração com a Dra. Solange Serrano do Laboratório de Bio-física do Instituto Butantã de São Paulo..



**Figura 15** - Imunoprecipitação da proteína IκBα. Foram utilizados extratos protéicos totais obtidos de queratinócitos normais. Nas colunas 1 e 2, pode-se observar a clara imunoprecipitação da proteína IκBα, contrariamente da proteína de 20 kDa. MP – marcador de peso, SC – anticorpo secundário, C+ controle positivo. A seta vermelha indica a banda de aproximadamente 20 kDa.

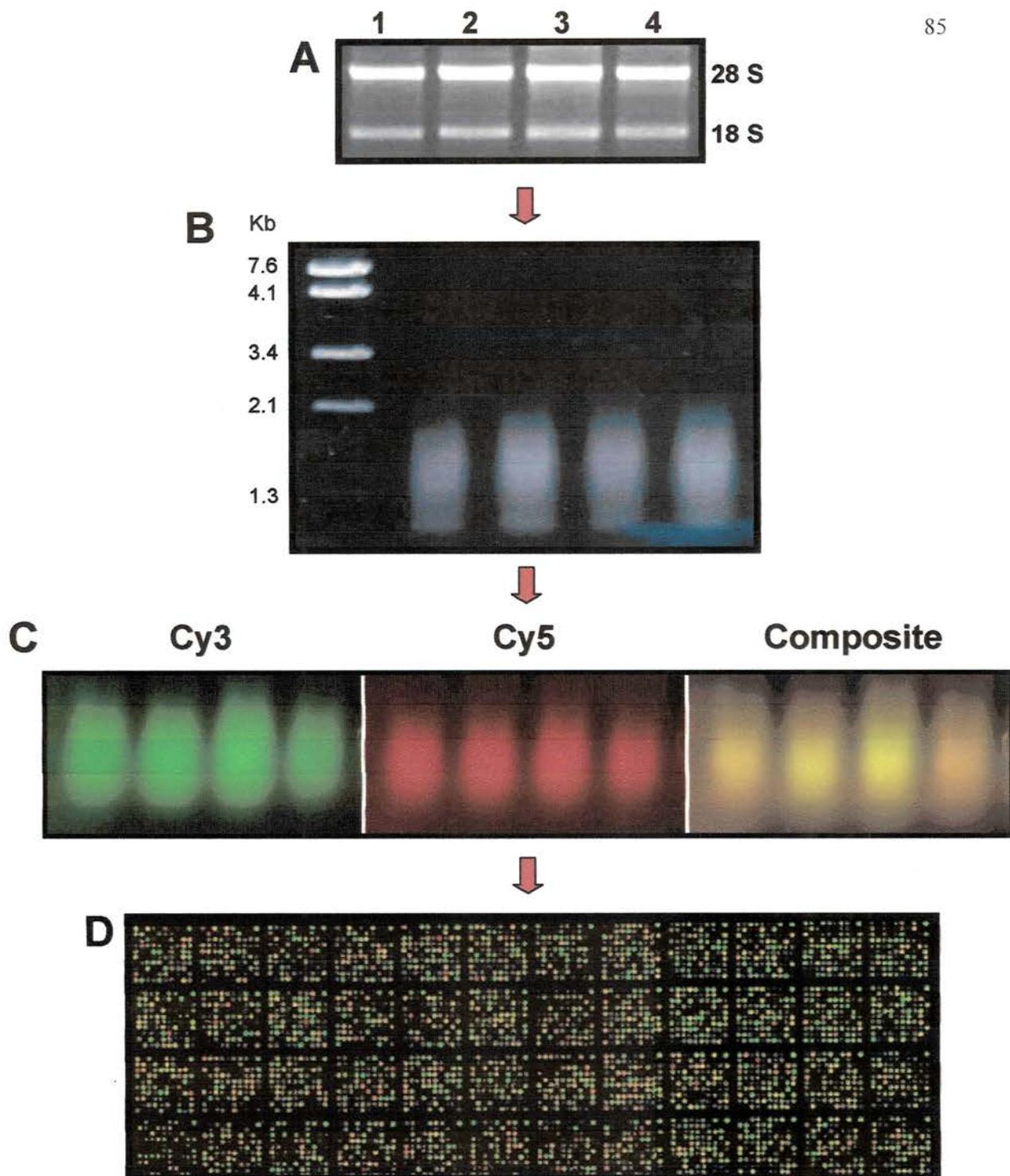
## 5.2 EFEITO DA INFECÇÃO POR HPV NA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL E SUA INTERFERÊNCIA NA SINALIZAÇÃO MEDIADA POR TNF

Na segunda parte deste estudo, foram avaliados os efeitos da infecção por HPV na expressão gênica global e o efeito do tratamento com TNF nas células infectadas, em dois períodos de tempo. Para isso, aplicamos a técnica de cDNA *microarray* com intuito de avaliar a expressão diferencial de genes em culturas primárias de queratinócitos derivados de prepúcios de recém-nascidos (NHFK ou PHK), comparadas às linhagens de queratinócitos normais imortalizados com o genoma completo de HPV16 (HF698) e HPV18 (HF18Nco). Além disso, as células acima descritas foram tratadas durante um período de 3 e 60 horas com 2nM de TNF. Amostras de RNA total obtidas a partir das culturas acima descritas, foram amplificadas, marcadas e hibridizadas com as lâminas 4.8. Utilizamos um desenho experimental que permite: 1) Identificar genes diferencialmente expressos entre células normais e células infectadas com HPV; 2) Identificar genes modulados pelo TNF, tanto nas células normais, como nas células imortalizadas por HPV em diferentes períodos de exposição (3 e 60 horas); 3) Avaliar o efeito da infecção por HPV em genes responsivos ao TNF e 4) Identificar genes diferencialmente modulados em células infectadas por dois tipos diferentes de HPV de alto risco (**Figura 16**).



**Figura 16** - Desenho experimental utilizado para identificação de genes diferencialmente expressos entre células normais e infectadas com dois tipos de HPV de alto risco e o efeito do TNF durante dois períodos de exposição (3 e 60 horas).

Para cada tipo celular e período de exposição ao TNF, foram feitos dois experimentos independentes. Este tipo de abordagem permite avaliar o erro biológico e experimental, possibilitando desta forma, uma melhor interpretação dos dados originados. Os resultados obtidos poderão contribuir para o entendimento dos eventos moleculares envolvidos na infecção por diferentes tipos de HPV e seu efeito em resposta ao TNF. Vale a pena ressaltar, que nestas análises foi avaliada a expressão gênica diferencial com 3 horas de tratamento com TNF, período este, em que ocorre a modulação na expressão da grande maioria dos genes induzidos por TNF. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da exposição prolongada ao TNF (60 horas), uma vez que, nos processos inflamatórios e/ou infecção viral, a exposição à esta citocina ocorre por períodos prolongados (VILLA e SCHLEGEL 1991; BANNO et al. 2004). Um exemplo das etapas de validação da extração de RNA, amplificação, marcação dos cDNAs e hibridização de uma lâmina, está representado na **Figura 17**.



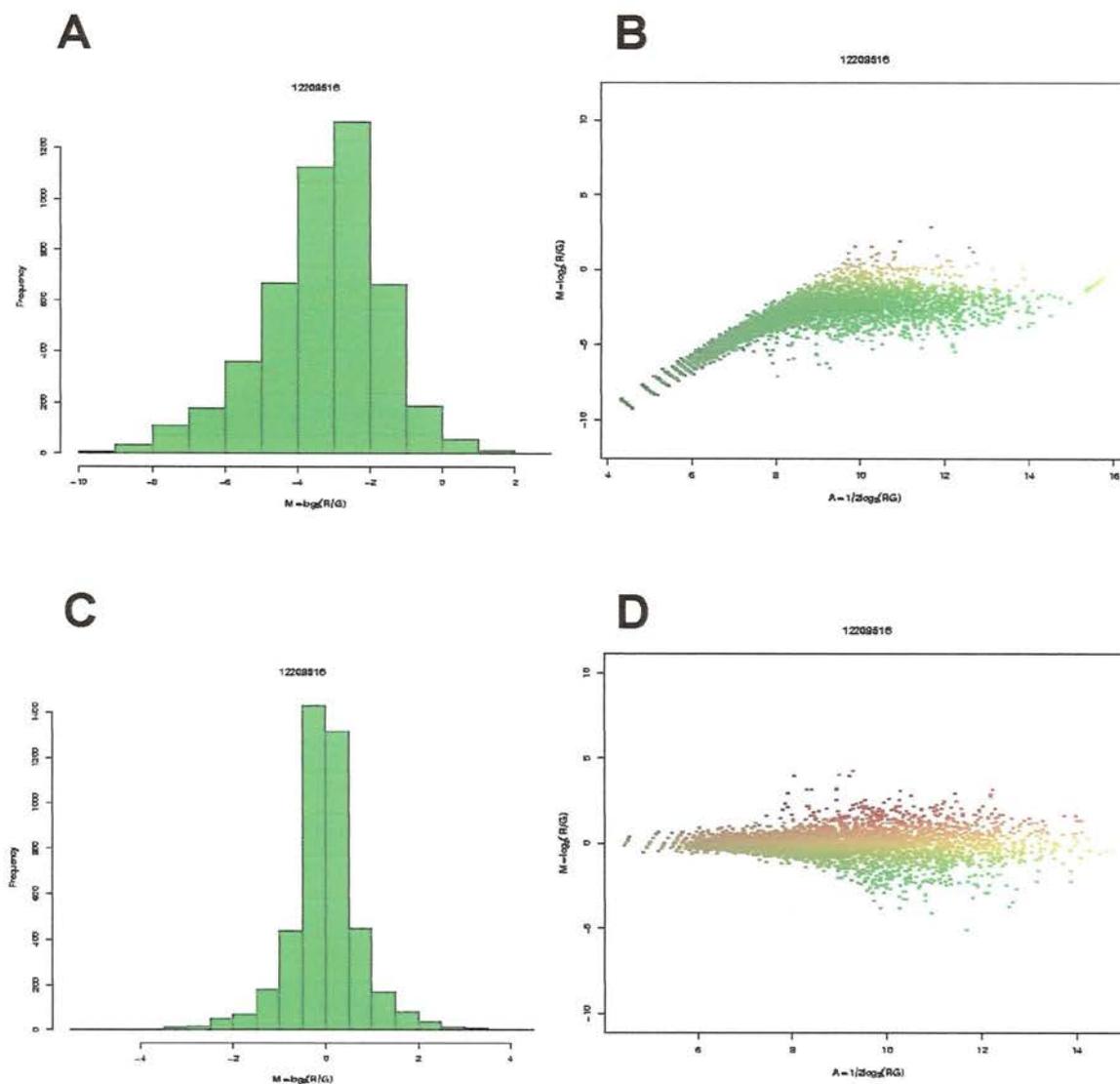
**Figura 17** - Etapas para obtenção das lâminas hibridizadas. **A)** Amostras de RNA utilizadas para amplificação; **B)** Amplificação dos RNAs utilizados para a marcação fluorescente; **C)** Avaliação da marcação dos cDNAs utilizados na hibridização das lâminas; **D)** Exemplo de uma lâmina hibridizada com dois cDNAs marcados com os corantes Cy3 (verde) e Cy5 (vermelho).

### 5.2.1 Normalização dos dados

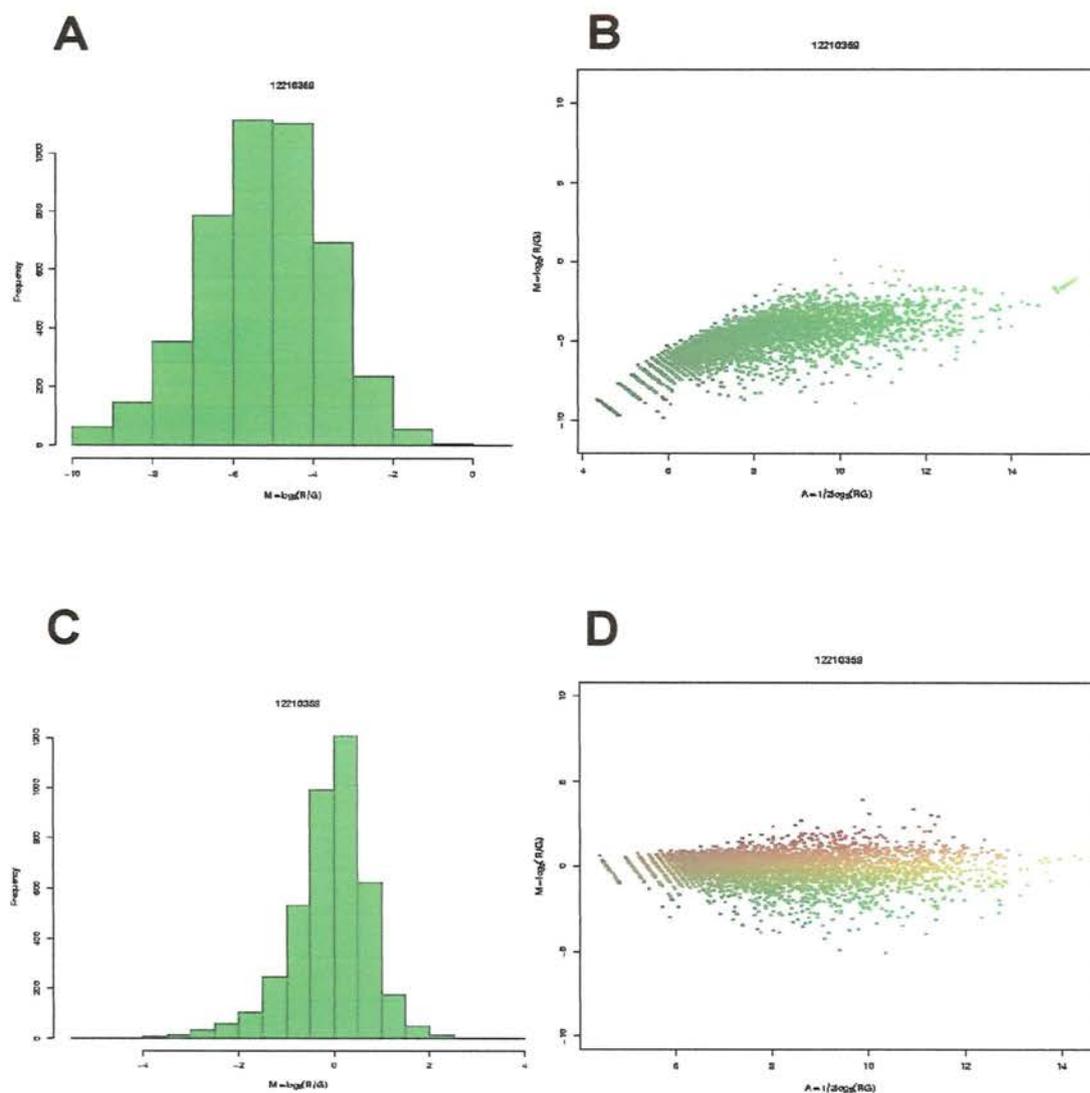
Para a normalização dos dados, utilizamos um método de regressão não linear (método de LOESS). Primeiramente, representações gráficas tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (gráficos *MA-plot*). Este tipo de análise possibilita avaliar a influência da intensidade de sinal sobre as razões de expressão de cada gene (razão X média de intensidade). Entretanto, quando se realizam hibridizações em duplicata, utilizando a inversão de corantes, torna-se imprescindível determinar a reprodutibilidade do experimento. Para isso, calcula-se o Índice de Correlação de Pearson, que permite averiguar se existe correlação linear entre os dados. Quanto mais próximo de 1 for este coeficiente, maior a similaridade entre os experimentos realizados. Representações gráficas tipo *MM-plot*, foram geradas para cada amostra (razão MAIN X razão SWAP).

As **Figuras 18 e 19** mostram os dados brutos e normalizados de uma amostra representativa (HF698-TNF3hs1). A **Figura 18** mostra os dados da lâmina *MAIN*, significando que a amostra foi marcada com Cy3 e o RNA referência com Cy5. Os painéis **18-A e B**, representam respectivamente, um histograma e um gráfico *MA-plot* dos dados não normalizados, ao passo que, os painéis **18-C e D**, representam os mesmos dados após sua normalização. A **Figura 19** mostra os dados da lâmina *SWAP* em que a mesma amostra foi marcada com o corante Cy5 e o RNA referência com o corante Cy3. Os painéis **19-A e B** representam os dados brutos e os painéis **19-C e D**, os normalizados. A **Figura 20**, representa a correlação entre as

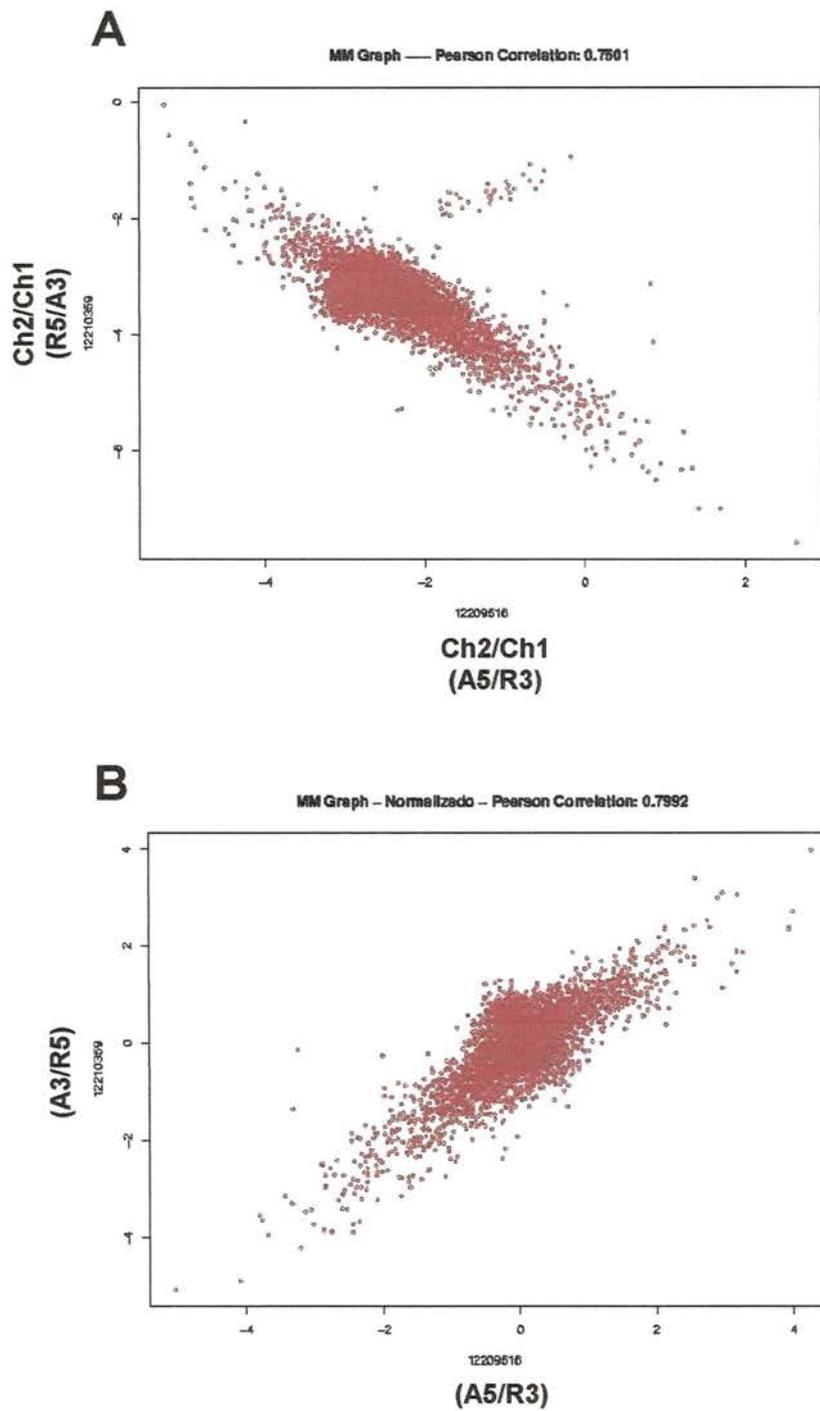
lâminas *MAIN* e *SWAP*, com os dados não normalizados (**Figura 20-A**) e após a normalização (**Figura 20-B**).



**Figura 18** – Exemplo da normalização dos dados obtidos para as amostras HF698- C3hs (marcada com **Cy3**) e RNA referência (marcado com **Cy5**). Utilizou-se para a normalização o método de regressão não linear de LOESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.



**Figura 19** – Exemplo da normalização dos dados obtidos para as amostras HF698- C3hs (marcada com *Cy5*) e RNA referência (marcado com *Cy3*). Utilizou-se para a normalização o método de regressão não linear de LOESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.



**Figura 20** – Representação gráfica tipo MM-plot para a amostra HF698-TNF3hs (razão lâmina MAIN X razão lâmina SWAP). **A)** Índice de correlação das razões não normalizadas (correlação negativa); **B)** Índice de correlação das razões normalizadas (correlação positiva). O Índice de Correlação de Pearson acima dos gráficos, representa a similaridade entre os experimentos realizados.

### 5.2.2 Análise por ANOVA

Primeiramente, os resultados obtidos foram analisados através do teste estatístico ANOVA, que avalia a variância no perfil de expressão gênica quando existem dois grupos ou mais a serem analisados/comparados ou através do cálculo da razão destes genes quando dois grupos ou amostras forem comparados diretamente. Neste estudo, a expressão gênica foi avaliada em função do: 1) tipo celular (independentemente do tempo em cultura e/ou tratamento com TNF), 2) tempo em cultura (independentemente do tipo celular e tratamento com TNF) e 3) tratamento com TNF (independentemente do tipo celular e do tempo em cultura) (**Figura 21**).

Os resultados obtidos estão demonstrados através de representações esquemáticas do tipo *heatmap* por agrupamento (*cluster*), que têm como objetivo encontrar grupos de genes que se comportam de maneira semelhante nas características e condições experimentais estudadas. Agrupamentos hierárquicos a partir dos quais as amostras ou genes são reunidos sucessivamente com base em suas similaridades, formam uma única árvore hierárquica (FREEMAN et al. 2000; ZHANG et al. 2001). Neste tipo de representação, a cor vermelha representa altos níveis de expressão gênica e a cor verde baixos níveis.

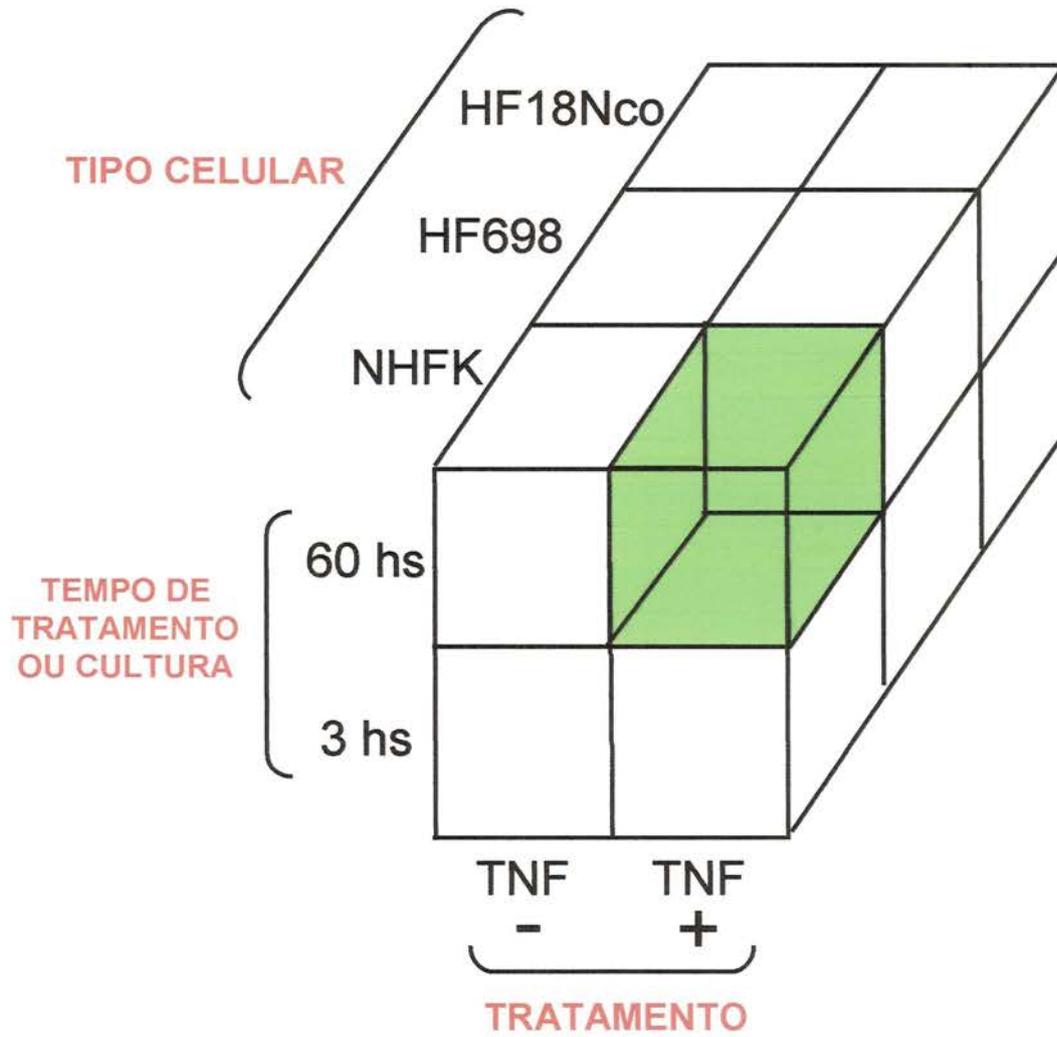
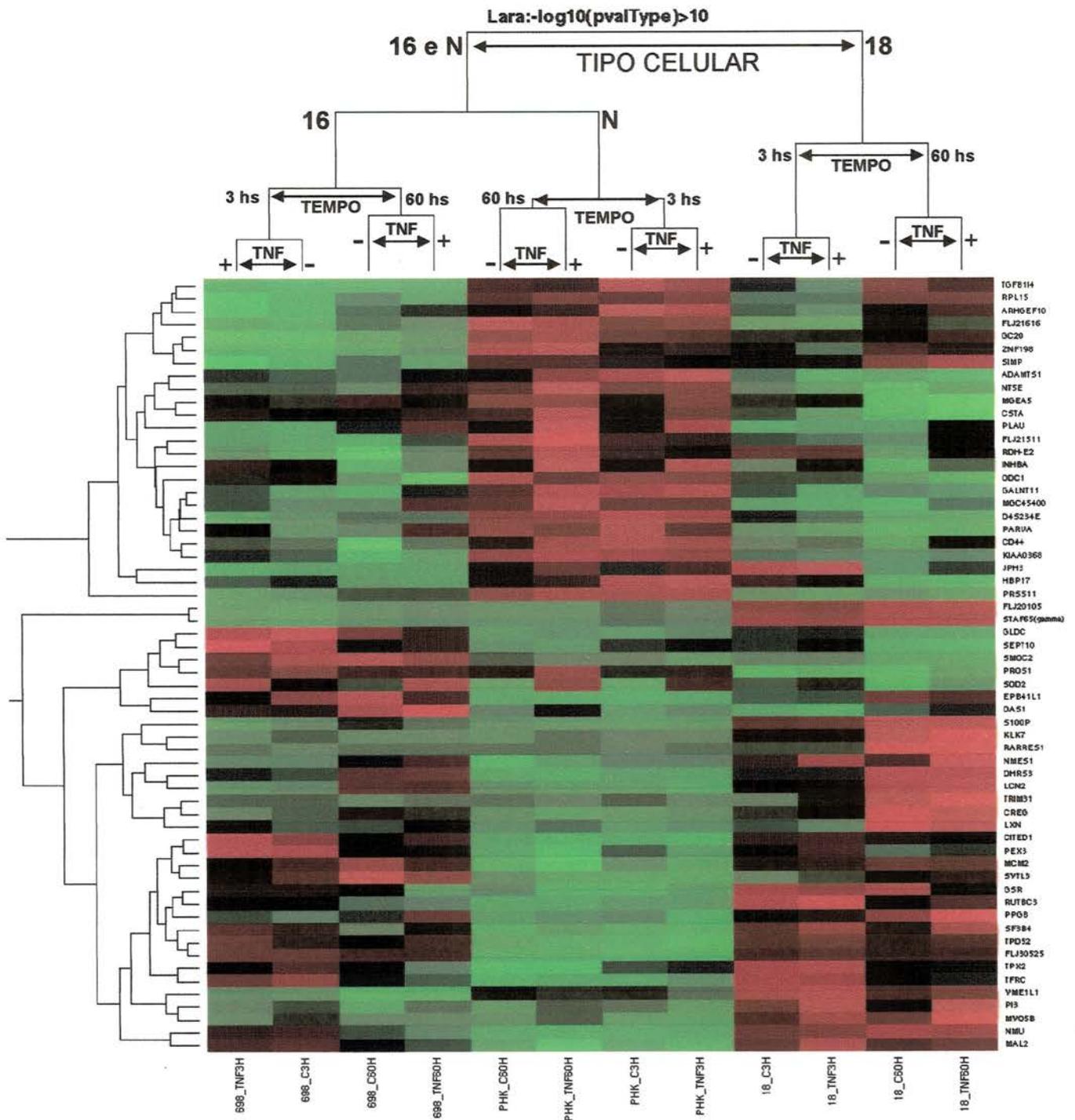


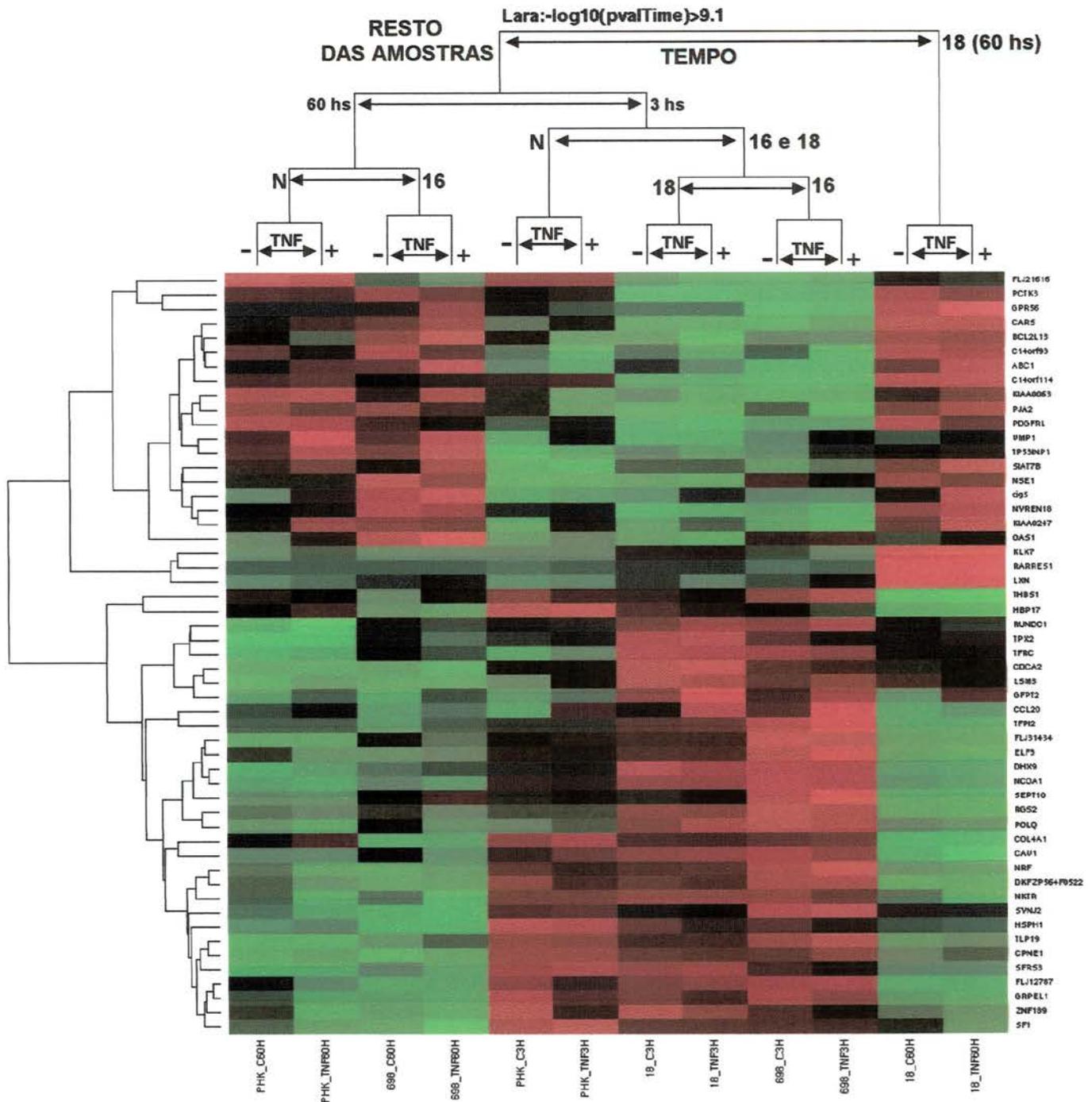
Figura 21 - Representação esquemática das análises realizadas por ANOVA.

A **Figura 22**, representa um gráfico tipo *heatmap* em que avaliou-se o efeito do **tipo celular** (3 linhagens celulares utilizadas neste estudo) na expressão de genes e o valor de corte (p-valor) utilizado foi de  $-\log_{10} >10$  ou  $10^{-10}$ . Pode-se observar no ramo principal do dendograma, o agrupamento dos queratinócitos normais (N) e da linhagem HF698 (HPV16) versus a linhagem HF18Nco (HPV18). Na **Figura 23**, comparou-se o efeito do **tempo** na expressão de genes nas células analisadas e o valor de corte utilizado foi de  $-\log_{10} >9,1$  ou  $10^{-9,1}$ . Interessantemente, no ramo principal do dendograma, ocorre a separação da amostra HF18Nco (HPV18) tratada com TNF por 60 horas, juntamente com seu controle (sem tratamento), das demais amostras. Em seguida, observa-se um sub-ramo em que as amostras de queratinócitos normais (N) e HF698 (HPV16) são separadas. Neste caso, podem ser visualizados genes cuja expressão difere apenas nas células HF18Nco-60horas (tratadas e controle), quando comparadas às demais. Por último foi avaliado o efeito do **tratamento com TNF** na expressão de genes. Na **Figura 24** observamos no ramo principal a separação dos queratinócitos normais tratados por 3 e 60 horas, das demais amostras. Contudo, o tratamento com TNF não mostrou um efeito capaz de superar, de forma significativa, as diferenças entre as células ou tempo em cultura. Vale a pena ressaltar que, neste caso, o valor de corte utilizado foi pouco significativo ( $-\log_{10} >2,9$  ou  $10^{-2,9}$ ).

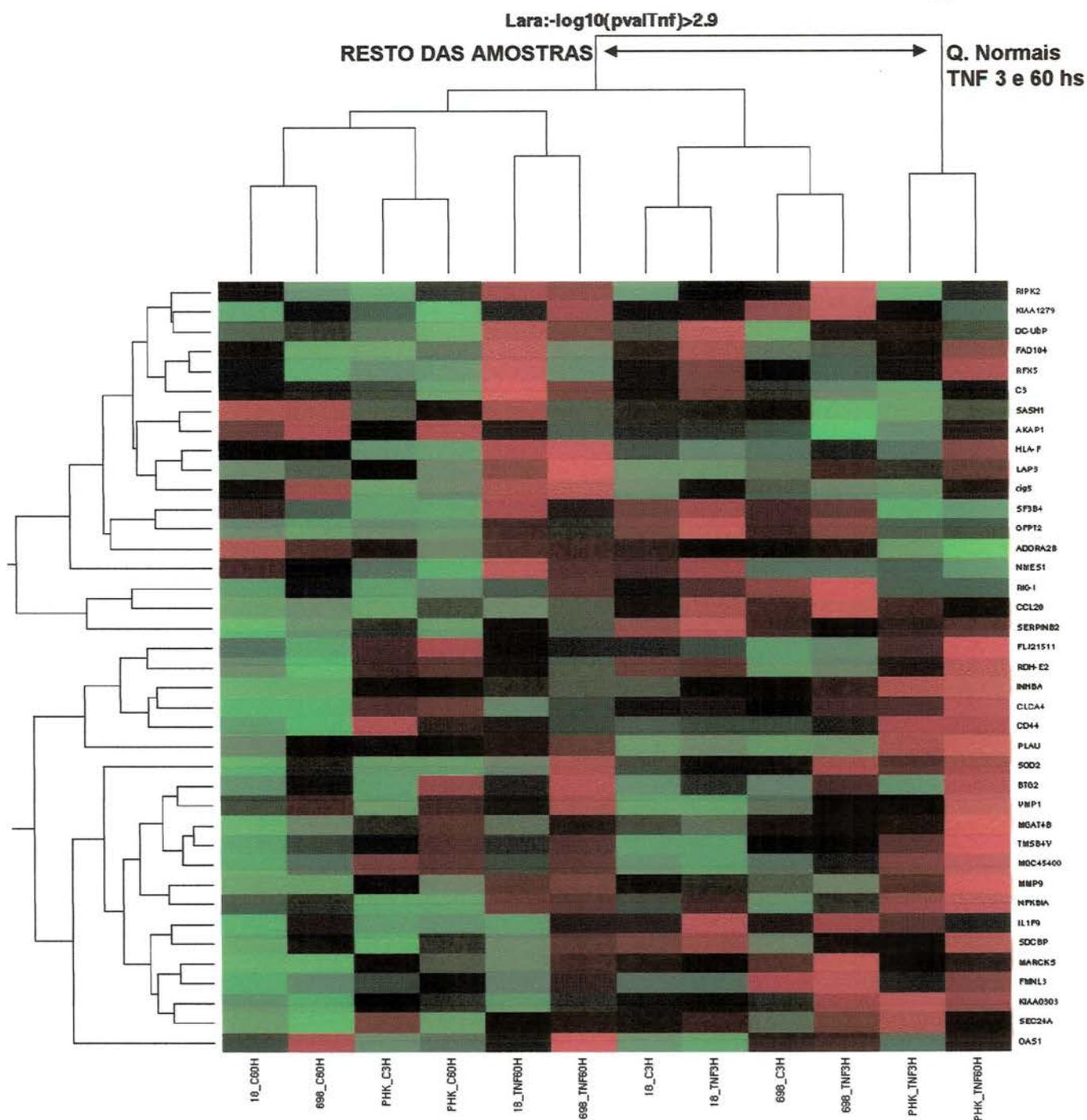


**Figura 22** - Agrupamento hierárquico supervisionado baseado nos genes que melhor diferenciam as amostras em função do **tipo celular**. Os genes foram identificados através do método ANOVA e as amostras agrupadas com base na distância de correlação e linkage completo. Uma vez construído o agrupamento das amostras, os genes foram agrupados hierarquicamente com base na sua distância de correlação. A cor vermelha denota alta intensidade de expressão gênica, a cor verde baixa intensidade e a cor preta intensidade não diferencial.

### Efeito do tempo na expressão de genes



**Figura 23** - Agrupamento hierárquico supervisionado baseado nos genes que melhor diferenciam as amostras em função do **tempo** em cultura e/ou tratamento com TNF. Os genes foram identificados através do método ANOVA e as amostras agrupadas com base na distância de correlação e *linkage* completo. Uma vez construído o agrupamento das amostras, os genes foram agrupados hierarquicamente com base na sua distância de correlação. A cor vermelha denota alta intensidade de expressão gênica, a cor verde baixa intensidade e a cor preta intensidade não diferencial.



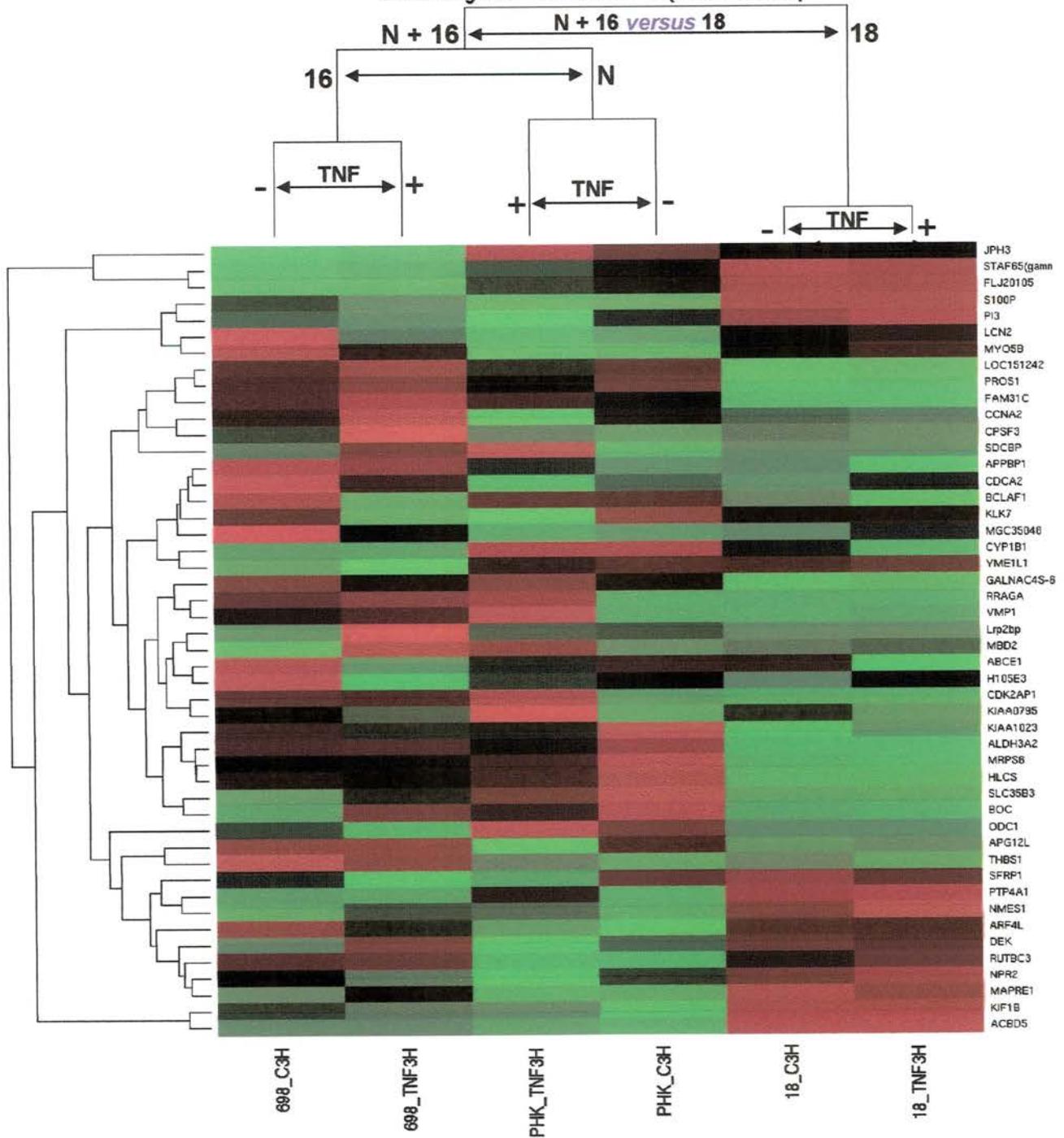
**Figura 24** - Agrupamento hierárquico supervisionado baseado nos genes que melhor diferenciam as amostras em função do efeito do **tratamento com TNF** nos diferentes tipos celulares. Os genes foram identificados através do método ANOVA e as amostras agrupadas com base na distância de correlação e *linkage* completo. Uma vez construído o agrupamento das amostras, os genes foram agrupados hierarquicamente com base na sua distância de correlação. A cor vermelha denota alta intensidade de expressão gênica, a cor verde baixa intensidade e a cor preta intensidade não diferencial.

### 5.2.3 Genes Diferencialmente Expressos entre as Amostras Quando Comparadas Duas a Duas

Numa segunda estratégia, não foi utilizado o método estatístico ANOVA e optamos por identificar os genes diferencialmente expressos através da comparação entre as duas amostras sensíveis ao efeito anti-proliferativo mediado pelo TNF (PHK e HPV16) e as amostras resistentes (HPV18) (VILLA e SCHLEGEL 1991; VILLA et al. 1992).

Foram selecionados os 30 genes com menor p-valor quando comparadas as amostras PHK+HPV16 *versus* HPV18 (controles e amostras tratadas). Desta forma, foram realizados agrupamentos supervisionados e os níveis de expressão dos genes foram representados por Figuras tipo *heatmap*. Para isso, foi utilizada a união dos genes com p-valores mais significativos, ou seja, todos os genes que constaram em pelo menos uma das duas comparações. Estas análises foram realizadas para os dois períodos de tratamento com TNF: 3 horas (**Figura 25**) e 60 horas (**Figura 26**). Nas duas figuras, conseguimos individualizar grupos de genes que claramente diferenciam os queratinócitos imortalizados com HPV18 dos outros tipos celulares. As **Tabelas 1 e 2**, listam os genes e suas funções apresentados nas **Figuras 25 e 26**, respectivamente.

União 30 genes - PHK+16 vs 18 (Ctr e Trat 3hs)



**Figura 25** - Agrupamento hierárquico supervisionado baseado em 30 genes que melhor diferenciam as amostras PHK (N) e HF698 (HPV16) das H18Nco (HPV18), após tratamento de **3 horas com TNF**. Os genes foram identificados através da comparação entre os dois grupos. Uma vez construído o agrupamento das amostras, os genes foram agrupados hierarquicamente com base na sua distância de correlação. A cor vermelha denota alta intensidade de expressão gênica, a cor verde baixa intensidade e a cor preta intensidade não diferencial.

**Tabela 1** – Lista de genes que diferenciam os queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 dos queratinócitos imortalizados com HPV18, após tratamento com TNF por 3 horas.

<b>Símbolo do gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Função<sup>a</sup></b>
<b>JPH3</b>	<i>junctophilin 3</i>	<i>component of junctional complexes</i>
<b>STAF65(gamma)</b>	<i>SPTF-associated factor 65 gamma</i>	<i>Regulation of transcription, DNA-dependent</i>
<b>FLJ20105</b>	<i>hypothetical protein LOC54821</i>	
<b>S100P</b>	<i>S100 calcium binding protein P</i>	<i>cell cycle progression and differentiation</i>
<b>PI3</b>	<i>protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)</i>	<i>elastase-specific inhibitor</i>
<b>LCN2</b>	<i>lipocalin 2 (oncogene 24p3)</i>	<i>transport, binding, transporter activity</i>
<b>MYO5B</b>	<i>acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2</i>	<i>catalyzation of the last step of the mitochondrial fatty acid beta-oxidation spiral</i>
<b>LOC151242</b>	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)</i>	
<b>PROS1</b>	<i>protein S (alpha)</i>	<i>cell adhesion, endopeptidase inhibitor activity</i>
<b>FAM31C</b>	<i>family with sequence similarity 31, member C</i>	
<b>CCNA2</b>	<i>cyclin A2</i>	<i>binding and activation of CDC2 or CDK2 kinases</i>
<b>CPSF3</b>	<i>cleavage and polyadenylation specific factor 3</i>	<i>mRNA processing</i>
<b>SDCBP</b>	<i>syndecan binding protein (syntenin)</i>	<i>intracellular signaling cascade, protein-membrane targeting, substrate-bound cell migration, cell extension</i>
<b>APPBP1</b>	<i>amyloid beta precursor protein binding protein 1</i>	<i>apoptosis, cell cycle, signal transduction, ubiquitin cycle</i>

Tabela 1 – (continuação)

<b>CDCA2</b>	<i>cell division cycle associated 2</i>	<i>this gene's in vivo function is yet unknown</i>
<b>BCLAF1</b>	<i>BCL2-associated transcription factor 1</i>	<i>induction of apoptosis, transcriptional repressor activity</i>
<b>KLK7</b>	<i>encoding kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum)</i>	<i>Epidermis development, proteolysis and peptidolysis, chymotrypsin activity, hydrolase activity</i>
<b>MGC35048</b>	<i>hypothetical protein MGC35048</i>	
<b>CYP1B1</b>	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1</i>	<i>monooxygenases which catalyze many reactions involved in drug metabolism and synthesis of cholesterol, steroids and other lipid</i>
<b>YME1L1</b>	<i>YME1-like 1 (S. cerevisiae)</i>	<i>mitochondrial protein metabolism</i>
<b>GALNAC4S-6ST</b>	<i>B cell RAG associated protein</i>	<i>regulation of DNA recombination, regulation of B-cell differentiation</i>
<b>RRAGA</b>	<i>Ras-related GTP binding A</i>	<i>cell growth and/or maintenance</i>
<b>VMP1</b>	<i>likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1</i>	
<b>Lrp2bp</b>	<i>low density lipoprotein receptor-related protein binding protein</i>	<i>receptor activity</i>
<b>MBD2</b>	<i>methyl-CpG binding domain protein 2</i>	<i>negative regulation of transcription</i>
<b>ABCE1</b>	<i>ATP-binding cassette, subfamily E (OABP), member 1</i>	<i>transport across extra- and intracellular membranes</i>
<b>H105E3</b>	<i>encoding NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like</i>	<i>cholesterol biosynthesis, oxidoreductase activity</i>

Tabela 1 – (continuação)

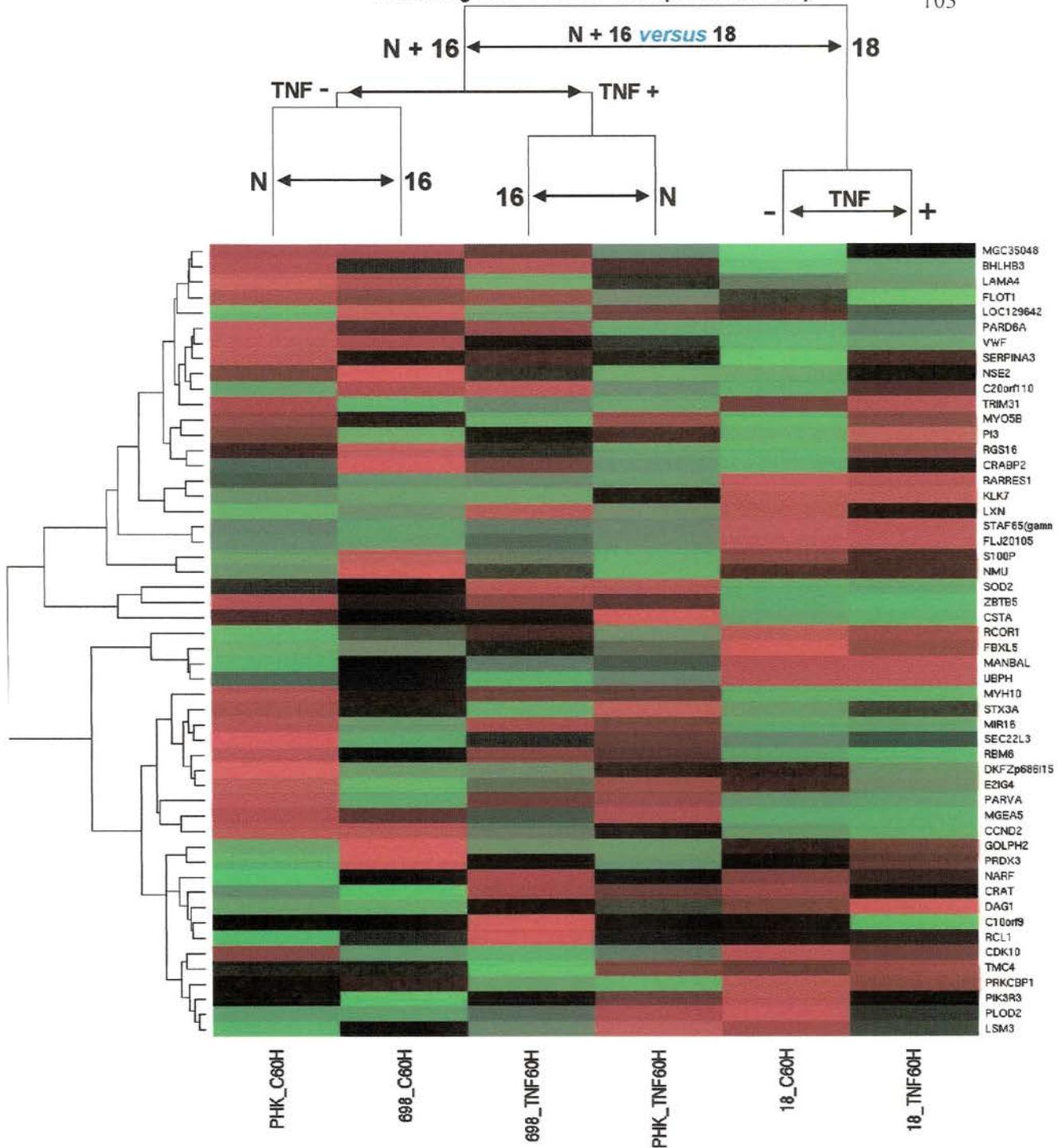
<b>CDK2AP1</b>	<i>CDK2-associated protein 1</i>	<i>negative regulation of cell cycle</i>
<b>KIAA0795</b>	<i>kelch-like 18 (Drosophila)</i>	<i>protein binding</i>
<b>KIAA1023</b>	<i>IQ motif containing E</i>	
<b>ALDH3A2</b>	<i>encoding aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2</i>	<i>detoxification of aldehydes generated by alcohol metabolism and lipid peroxidation, epidermis development</i>
<b>MRPS6</b>	<i>mitochondrial ribosomal protein S6</i>	<i>protein synthesis within the mitochondrion</i>
<b>HLCS</b>	<i>holocarboxylase synthetase</i>	<i>protein modification</i>
<b>SLC35B3</b>	<i>solute carrier family 35, member B3</i>	
<b>BOC</b>	<i>brother of CDO</i>	<i>cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes</i>
<b>ODC1</b>	<i>ornithine decarboxylase 1</i>	<i>polyamine biosynthesis</i>
<b>APG12L</b>	<i>APG12 autophagy 12-like (S. cerevisiae)</i>	<i>apoptosis</i>
<b>THBS1</b>	<i>thrombospondin 1</i>	<i>cell-to-cell and cell-to-matrix interactions</i>
<b>SFRP1</b>	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>	<i>anti-apoptosis</i>
<b>PTP4A1</b>	<i>protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1</i>	<i>protein amino acid dephosphorylation</i>
<b>NMES1</b>	<i>normal mucosa of esophagus specific 1</i>	
<b>ARF4L</b>	<i>ADP-ribosylation factor 4-like</i>	<i>protein secretion</i>
<b>DEK</b>	<i>DEK oncogene</i>	<i>cell growth and/or maintenance</i>

Tabela 1 – (continuação)

<b>RUTBC3</b>	<i>RUN and TBC1 domain containing 3</i>	
<b>NPR2</b>	<i>encoding natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B</i>	<i>cell surface receptor linked signal transduction</i>
<b>MAPRE1</b>	<i>encoding microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1</i>	<i>cell proliferation</i>
<b>KIF1B</b>	<i>kinesin family member 1B</i>	<i>pentose-phosphate shunt, oxidative branch</i>
<b>ACBD5</b>	<i>acyl-Coenzyme A binding domain containing 5</i>	<i>acyl-CoA binding</i>

a. função gênica de acordo com *LocusLink* (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.edu](http://www.ncbi.nlm.nih.edu)) e fontes de referências interligadas à esse banco de dados.

União 30 genes - PHK+16 vs 18 (Ctr e Trat 60hs)



**Figura 26** - Agrupamento hierárquico supervisionado baseado em 30 genes que melhor diferenciam as amostras PHK (N) e HF698 (HPV16) das H18Nco (HPV18), após tratamento de **60 horas com TNF**. Os genes foram identificados através da comparação entre os dois grupos. Uma vez construído o agrupamento das amostras, os genes foram agrupados hierarquicamente com base na sua distância de correlação. A cor vermelha denota alta intensidade de expressão gênica, a cor verde baixa intensidade e a cor preta intensidade não diferencial.

**Tabela 2** – Lista de genes que diferenciam os queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 dos queratinócitos imortalizados com HPV18, após tratamento com TNF por 60 horas.

<b>Símbolo do gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Função<sup>a</sup></b>
<b>MGC35048</b>	<i>hypothetical protein MGC35048</i>	
<b>BHLHB3</b>	<i>basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3</i>	<i>cell differentiation, cell proliferation</i>
<b>LAMA4</b>	<i>laminin, alpha 4</i>	<i>regulation of cell adhesion, regulation of cell migration, structural molecule activity</i>
<b>FLOT1</b>	<i>flotillin 1</i>	<i>caveolae-associated, integral membrane protein</i>
<b>LOC129642</b>	<i>O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 2</i>	
<b>PARD6A</b>	<i>par-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C.elegans)</i>	<i>cell cycle, cytokinesis, establishment of cell polarity</i>
<b>VWF</b>	<i>von Willebrand factor</i>	<i>cell adhesion, platelet activation, response to wounding, protein binding</i>
<b>SERPINA3</b>	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor</i>	<i>inflammatory response, regulation of lipid metabolism</i>
<b>NSE2</b>	<i>breast cancer membrane protein 101</i>	
<b>C20orf110</b>	<i>tumor protein p53 inducible nuclear protein 2</i>	<i>p53-inducible protein</i>
<b>TRIM31</b>	<i>tripartite motif-containing 31</i>	<i>protein ubiquitination, ubiquitin-protein ligase activity</i>
<b>MYO5B</b>	<i>acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2</i>	<i>catalyzation of the last step of the mitochondrial fatty acid beta-oxidation spiral</i>
<b>PI3</b>	<i>protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)</i>	<i>elastase-specific inhibitor</i>

Tabela 2 – (continuação)

<b>RGS16</b>	<i>regulator of G-protein signalling 16</i>	<i>regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway</i>
<b>CRABP2</b>	<i>cellular retinoic acid binding protein 2</i>	<i>epidermis development and differentiation, precise function remains unknown</i>
<b>RARRES1</b>	<i>encoding retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1</i>	<i>negative regulation of cell proliferation</i>
<b>KLK7</b>	<i>encoding kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum)</i>	<i>epidermis development, proteolysis and peptidolysis, chymotrypsin activity, hydrolase activity</i>
<b>LXN</b>	<i>latexin</i>	<i>enzyme inhibitor activity, metalloendopeptidase inhibitor activity</i>
<b>STAF65(gamma)</b>	<i>SPTF-associated factor 65 gamma</i>	<i>Regulation of transcription, DNA-dependent</i>
<b>FLJ20105</b>	<i>FLJ20105 protein</i>	
<b>S100P</b>	<i>S100 calcium binding protein P</i>	<i>cell cycle progression and differentiation</i>
<b>NMU</b>	<i>neuromedin U</i>	<i>neuropeptide signaling pathway, digestion</i>
<b>SOD2</b>	<i>superoxide dismutase 2</i>	<i>age-dependent response to reactive oxygen species, cellular defense response (sensu Vertebrata)</i>
<b>ZBTB5</b>	<i>zinc finger and BTB domain containing 5</i>	<i>regulation of transcription, DNA-dependent</i>
<b>CSTA</b>	<i>encoding cystatin A (stefin A)</i>	<i>cysteine protease inhibitor activity</i>
<b>RCOR1</b>	<i>REST corepressor 1</i>	<i>DNA binding</i>
<b>FBXL5</b>	<i>encoding F-box and leucine-rich repeat protein 5</i>	<i>transport, ubiquitin cycle</i>

Tabela 2 – (continuação)

<b>MANBAL</b>	<i>encoding mannosidase, beta A, lysosomal-like</i>	<i>integral to membrane</i>
<b>UBPH</b>	<i>similar to ubiquitin binding protein</i>	<i>ubiquitin binding protein</i>
<b>MYH10</b>	<i>encoding myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle</i>	<i>cellular morphogenesis, cytokinesis</i>
<b>STX3A</b>	<i>olfactory receptor, family 10, subfamily Y, member 1 pseudogene</i>	<i>recognition and G protein-mediated transduction of odorant signals</i>
<b>MIR16</b>	<i>membrane interacting protein of RGS16</i>	<i>lipid metabolism</i>
<b>SEC22L3</b>	<i>SEC22 vesicle trafficking protein-like 3 (S. cerevisiae)</i>	<i>ER to Golgi transport</i>
<b>RBM6</b>	<i>RNA binding motif protein 6</i>	<i>RNA processing</i>
<b>DKFZp686I15217</b>	<i>encoding hypothetical protein DKFZp686I15217</i>	<i>electron transporter activity</i>
<b>E2IG4</b>	<i>likely ortholog of chicken tsukushi</i>	
<b>PARVA</b>	<i>parvin, alpha</i>	<i>cell adhesion, actin binding</i>
<b>MGEA5</b>	<i>encoding meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)</i>	<i>glycoprotein catabolism, hyaluronoglucosaminidase activity</i>
<b>CCND2</b>	<i>cyclin D2</i>	<i>cytokinesis, regulation of cell cycle</i>
<b>GOLPH2</b>	<i>golgi phosphoprotein 2</i>	<i>modification of proteins exported from the endoplasmic reticulum</i>
<b>PRDX3</b>	<i>peroxiredoxin 3</i>	<i>alkyl hydroperoxide reductase activity, oxidoreductase activity</i>
<b>NARF</b>	<i>nuclear prelamin A recognition factor</i>	<i>electron transporter activity</i>
<b>CRAT</b>	<i>carnitine acetyltransferase</i>	<i>acyl-CoA metabolism</i>

Tabela 2 – (continuação)

<b>DAG1</b>	<i>dystroglycan 1</i>	<i>laminin receptor activity, muscle contraction</i>
<b>C10orf9</b>	<i>chromosome 10 open reading frame 9</i>	<i>cyclin fold protein 1, cyclin-box carrying protein 1</i>
<b>RCL1</b>	<i>terminal phosphate cyclase-like 1</i>	<i>RNA-3'-phosphate cyclase activity</i>
<b>CDK10</b>	<i>encoding cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10</i>	<i>cyclin-dependent protein kinase activity</i>
<b>TMC4</b>	<i>transmembrane channel-like 4</i>	
<b>PRKCBP1</b>	<i>protein kinase C binding protein 1</i>	<i>regulation of transcription, DNA-dependent</i>
<b>PIK3R3</b>	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)</i>	<i>intracellular signaling cascade</i>
<b>PLOD2</b>	<i>procollagen-lysine</i>	<i>protein metabolism</i>
<b>LSM3</b>	<i>LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)</i>	<i>pre-mRNA splicing factor activity</i>

a. função gênica de acordo com *LocusLink* (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.edu](http://www.ncbi.nlm.nih.edu)) e fontes de referências interligadas à esse banco de dados.

Finalmente, foram avaliados os efeitos da infecção por HPV e do TNF nas células analisadas, em dois períodos de tempo, na expressão gênica global. Para isso, foram avaliadas 24 comparações entre as amostras (**Tabela 3**). Estas comparações contêm os genes mais diferencialmente expressos, com p-valores  $< 0,0001$ , exceto para a 16ª comparação (H18\_3 / H18\_T3), cujo p-valor foi  $< 0,01$ , onde sabidamente o TNF tem um efeito discreto. Estes genes foram ordenados por ordem crescente dos p-valores (**Anexo 1**).

Com o intuito de direcionar a procura de genes, a etapa seguinte consistiu em avaliar os genes mais diferencialmente expressos nos módulos de apoptose, ciclo celular e citocinas, para cada uma das comparações. Neste caso, foram considerados apenas os genes com p-valor nominal  $\leq 0,005$  e com razão de expressão entre as comparações  $< 0,5$  ou  $> 2,0$  (**Tabela 4**). A partir da **Tabela 4**, foram elaborados diversos Diagramas de Venn, visando identificar os genes comuns modulados entre as comparações para os genes envolvidos em apoptose, ciclo celular e citocinas (**Figuras 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33**). A **Tabela 5** representa os genes contidos nos diagramas de Venn e inclui um resumo de suas funções. Os dados matemáticos e estatísticos desta tese foram gerados em colaboração com o Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IME-USP), coordenado pelo Prof. Eduardo Jordão Neves (*Mathematical Analysis of Interacting Gene Expression System* – <http://www.maiges.org>).

**Tabela 3** - Comparações das amostras utilizadas neste estudo e seus objetivos. PHK\_3 (queratinócitos normais, 3hs em cultura, sem TNF), PHK\_60 (queratinócitos normais, 60hs em cultura, sem TNF), PHK\_T3 (queratinócitos normais, 3hs em cultura, COM TNF), PHK\_T60 (queratinócitos normais, 60hs em cultura, COM TNF), H16\_3 (HF698, 3hs em cultura, sem TNF), H16\_60 (HF698, 60hs em cultura, sem TNF), H16\_T3 (HF698, 3hs em cultura, COM TNF), H16\_T60 (HF698, 60hs em cultura, COM TNF), H18\_3 (HF18Nco, 3hs em cultura, sem TNF), H18\_60 (HF18Nco, 60hs em cultura, sem TNF), H18\_T3 (HF18Nco, 3hs em cultura, COM TNF), H18\_T60 (HF18Nco, 60hs em culture, COM TNF).

---

1) PHK\_3 / H16\_3      2) PHK\_3 / H18\_3      3) H16\_3/ H18\_3

---

**OBJETIVO:** Genes que variam entre os 3 tipos de células, após 3hs da troca do meio de cultura

---



---

4) PHK\_60 / H16\_60      5) PHK\_60 / H18\_60      6) H16\_60/ H18\_60

---

**OBJETIVO:** Genes que variam entre os 3 tipos de células, após 60hs da troca do meio de cultura

---



---

7) PHK\_3 / PHK\_60      8) H16\_3/H16\_60      9) H18\_3/ H18\_60

---

**OBJETIVO:** Genes que variam entre os 3 tipos de células, comparando 3 e 60hs após troca do meio

---



---

10) PHK\_3 / PHKT3      11) PHK\_60 / PHKT60      12) PHKT3 / PHKT60

---

**OBJETIVO:** Genes que variam nas células PHK após 3hs e 60hs de tratamento com TNF

---



---

13) H16\_3 / H16T3      14) H16\_60 / H16T60      15) H16T3 / H16T60

---

**OBJETIVO:** Genes que variam nas células H16 após 3hs e 60hs de tratamento com TNF

---



---

16) H18-3 / H18T3      17)H18\_60 / H18T60      18) H18T3 / H18T60

---

**OBJETIVO:** Genes que variam nas células H18 após 3hs e 60hs de tratamento com TNF

---



---

19) PHKT3 / H16T3      20) PHKT3 / H18T3      21) H16T3 / H18T3

---

**OBJETIVO:** Genes que variam entre os 3 tipos celulares, após 3hs de tratamento com TNF

---



---

22) PHKT60 / H16T60      23) PHKT60 / H18T60      24) H16T60 / H18T60

---

**OBJETIVO:** Genes que variam entre os 3 tipos celulares, após 60hs de tratamento com TNF

---

**Tabela 4** - Tabela de genes relacionados à apoptose (vermelho), ciclo celular (verde) e citocinas (azul), nas 24 comparações. Foram considerados apenas os genes com p-valor nominal  $\leq 0,005$  e com relação de expressão entre as comparações  $< 0,5$  e  $> 2,0$ .

**Comparação 1: PHK.3 / H16.3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<a href="#">BG002017</a>	<a href="#">CSF2RB</a>	0.12319	0.00087	apoptose
<a href="#">BE698074</a>	<a href="#">CAPN2</a>	2.02441	0.00119	apoptose
<a href="#">AW867730</a>	<a href="#">CASP3</a>	2.42232	0.00201	apoptose
<a href="#">BE934407</a>	<a href="#">BUB3</a>	0.2656	0.00054	c. celular
<a href="#">AW391386</a>	<a href="#">CCL20</a>	0.28742	0.00024	citocinas
<a href="#">BF996555</a>	<a href="#">IL6ST</a>	0.10555	0.00063	citocinas
<a href="#">BG002017</a>	<a href="#">CSF2RB</a>	0.12319	0.00087	citocinas
<a href="#">BQ316492</a>	<a href="#">MET</a>	0.15001	0.00171	citocinas

**Comparação 2: PHK.3 / H18.3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<a href="#">BG002017</a>	<a href="#">CSF2RB</a>	0.15779	0.00335	apoptose
<a href="#">BE839751</a>	<a href="#">NFKBIA</a>	0.49352	0.0045	apoptose
<a href="#">BF996555</a>	<a href="#">IL6ST</a>	0.11239	5e-05	citocinas
<a href="#">BG002017</a>	<a href="#">CSF2RB</a>	0.15779	0.00335	citocinas
<a href="#">AW391386</a>	<a href="#">CCL20</a>	0.3322	0.00429	citocinas

**Comparação 3: H16.3 / H18.3**

**Comparação 4: PHK.60 / H16.60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<a href="#">BF379013</a>	<a href="#">PPP3CA</a>	2.9036	5e-05	apoptose
<a href="#">BQ300376</a>	<a href="#">MCM2</a>	0.22053	0.00136	c. celular
<a href="#">BF924696</a>	<a href="#">PRKDC</a>	0.23067	0.00253	c. celular
<a href="#">BF088063</a>	<a href="#">PDGFC</a>	2.70019	0.00103	citocinas

**Comparação 5: PHK.60 / H18.60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<a href="#">BE698554</a>	<a href="#">CAPN1</a>	0.30405	0.00257	apoptose
<a href="#">BC016847</a>	<a href="#">E2F3</a>	2.30184	2e-05	c. celular
<a href="#">BQ300376</a>	<a href="#">MCM2</a>	0.3116	0.00026	c. celular
<a href="#">BE934407</a>	<a href="#">BUB3</a>	2.08114	0.00111	c. celular
<a href="#">BC010958</a>	<a href="#">CCND2</a>	2.72259	0.00387	c. celular
<a href="#">BE698417</a>	<a href="#">IL4R</a>	0.16855	1e-05	citocinas
<a href="#">BF088063</a>	<a href="#">PDGFC</a>	2.35984	0.00033	citocinas

Tabela 4 - (continuação)

**Comparação 6: H16.60 / H18.60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BC010958</u>	CCND2	3.21246	0.00167	c. celular

**Comparação 7: PHK.3 / PHK.60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BG002017</u>	CSF2RB	0.09653	0.00028	apoptose
<u>AL049703</u>	PDCD8	2.15194	0.00594	apoptose
<u>BC016847</u>	E2F3	0.44405	0.00035	c. celular
<u>BE934407</u>	BUB3	0.27977	0.00287	c. celular
<u>BC010958</u>	CCND2	0.33151	0.00437	c. celular
<u>BG002017</u>	CSF2RB	0.09653	0.00028	citocinas
<u>BF996555</u>	IL6ST	0.06742	0.00087	citocinas
<u>BQ316492</u>	MET	0.17052	0.00339	citocinas

**Comparação 8: H16.3 / H16.60****Comparação 9: H18.3 / H18.60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AW371180</u>	CCNA2	2.07396	0.00112	c. celular
<u>AW391386</u>	CCL20	3.46183	0.00025	citocinas
<u>BF154443</u>	IL18R1	0.4905	0.00088	citocinas
<u>BE698417</u>	IL4R	0.22789	0.00175	citocinas

**Comparação 10: PHK.3 / PHK.T3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BE839751</u>	NFKBIA	0.23785	4e-05	apoptose
<u>BG002017</u>	CSF2RB	0.16265	0.00032	apoptose
<u>BF996555</u>	IL6ST	0.1174	5e-05	citocinas
<u>AW391386</u>	CCL20	0.27329	0.00024	citocinas
<u>BG002017</u>	CSF2RB	0.16265	0.00032	citocinas
<u>BQ316492</u>	MET	0.23741	0.00142	citocinas

**Comparação 11: PHK.60 / PHK.T60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BE839751</u>	NFKBIA	0.31686	2e-05	apoptose
<u>AW385664</u>	INHBA	0.25147	0.00282	citocinas

**Comparação 12: PHK.T3 / PHK.T60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AW362995</u>	IL1B	2.57672	0.00403	apoptose
<u>AW582176</u>	CDKN1B	0.33292	0.00574	c. celular
<u>AW362995</u>	IL1B	2.57672	0.00403	citocinas

Tabela 4 - (continuação)

**Comparação 13: H16.3 / H16.T3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AW391386</u>	CCL20	0.26209	2e-05	citocinas

**Comparação 14: H16.60 / H16.T60****Comparação 15: H16.T3 / H16.T60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AL049703</u>	PDCD8	2.01181	0.00126	apoptose
<u>AW371180</u>	CCNA2	2.63566	0.0039	c. celular
<u>AW391386</u>	CCL20	9.62194	0	citocinas

**Comparação 16: H18.3 / H18.T3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AW391386</u>	CCL20	0.45945	0.00155	citocinas

**Comparação 17: H18.60 / H18.T60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BE839751</u>	NFKBIA	0.44645	0.00029	apoptose
<u>AW385664</u>	INHBA	0.41238	0.00064	citocinas

**Comparação 18: H18.T3 / H18.T60**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BF881199</u>	TRADD	0.36582	4e-04	apoptose
<u>BC010958</u>	CCND2	2.63593	0.00093	c. celular
<u>AW371180</u>	CCNA2	2.04553	0.00372	c. celular
<u>AW391386</u>	CCL20	4.37912	0	citocinas

**Comparação 19: PHK.T3 / H16.T3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BE698074</u>	CAPN2	2.54905	0.00127	apoptose
<u>AW867730</u>	CASP3	4.48494	0.00194	apoptose
<u>BF362267</u>	BID	0.44195	0.00217	apoptose
<u>AW362995</u>	IL1B	2.8747	0.00234	apoptose
<u>BE839751</u>	NFKBIA	2.22165	0.00368	apoptose
<u>BQ300376</u>	MCM2	0.45772	0.00023	c. celular
<u>BF924696</u>	PRKDC	3.46266	0.00085	c. celular
<u>AW582176</u>	CDKN1B	0.34944	0.00105	c. celular
<u>AW391386</u>	CCL20	0.27564	3e-05	citocinas
<u>AW362995</u>	IL1B	2.8747	0.00234	citocinas

Tabela 4 - (continuação)

**Comparação 20: PHK.T3 / H18.T3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AW371180</u>	CCNA2	0.47278	0.00133	c. celular
<u>AW385664</u>	INHBA	3.12956	0.00025	citocinas

**Comparação 21: H16.T3-H18.T3**

Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>AW391386</u>	CCL20	2.02612	0.00076	citocinas

**Comparação 22: PHK.T60 / H16.T60**

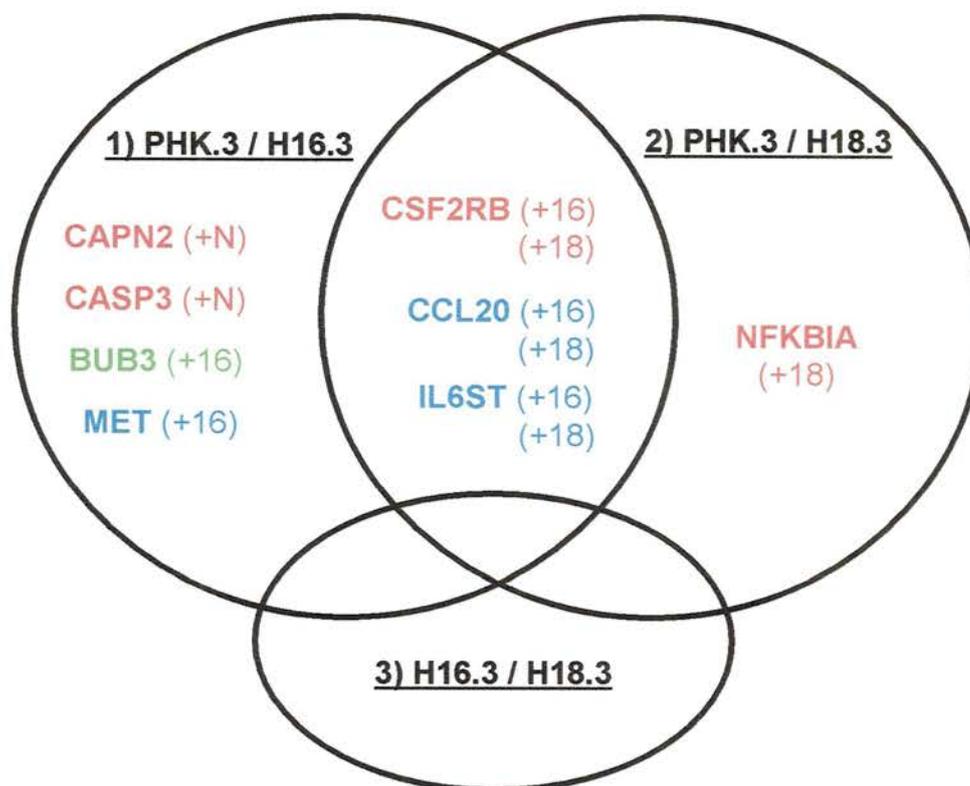
Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BQ300376</u>	MCM2	0.40003	0.0026	c. celular
<u>AW385664</u>	INHBA	6.27587	0.00034	citocinas

**Comparação 23: PHK.T60 / H18.T60**

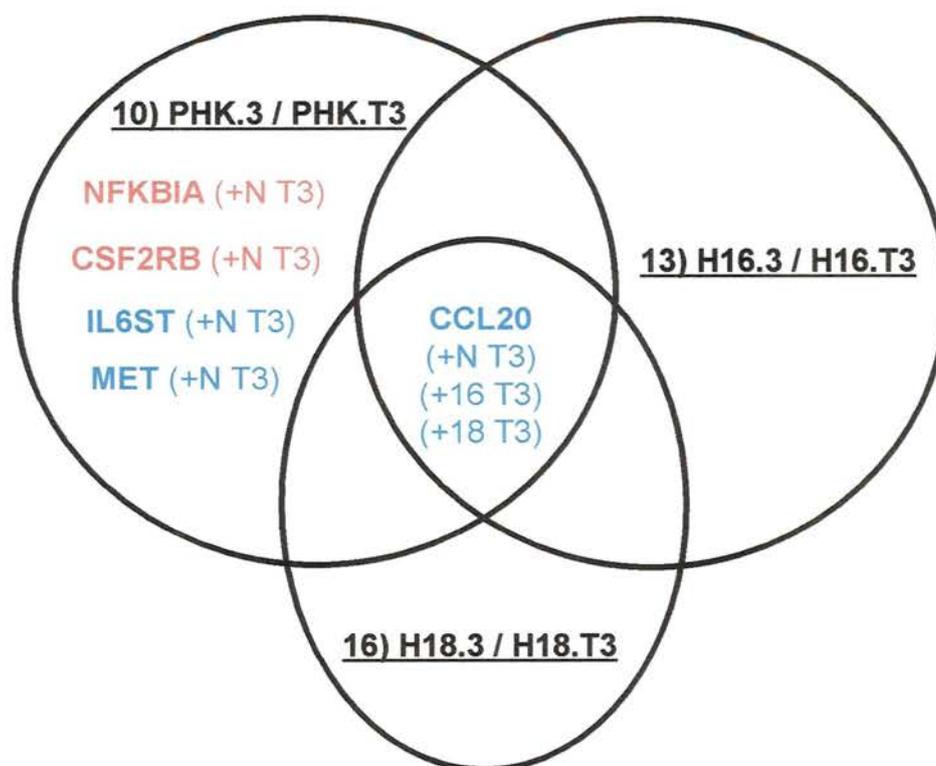
Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BE698554</u>	CAPN1	0.17186	0.00013	apoptose
<u>BG002017</u>	CSF2RB	3.06803	0.00109	apoptose
<u>BF924696</u>	PRKDC	0.34729	4e-05	c. celular
<u>BQ300376</u>	MCM2	0.31436	1e-04	c. celular
<u>BC010958</u>	CCND2	2.95115	0.00126	c. celular
<u>AW899459</u>	CDKN2C	2.87973	0.00263	c. celular
<u>AW385664</u>	INHBA	5.01503	0	citocinas
<u>BE698417</u>	IL4R	0.31966	9e-05	citocinas
<u>BG002017</u>	CSF2RB	3.06803	0.00109	citocinas
<u>BF088063</u>	PDGFC	2.17297	0.00585	citocinas

**Comparação 24: H16.T60 / H18.T60**

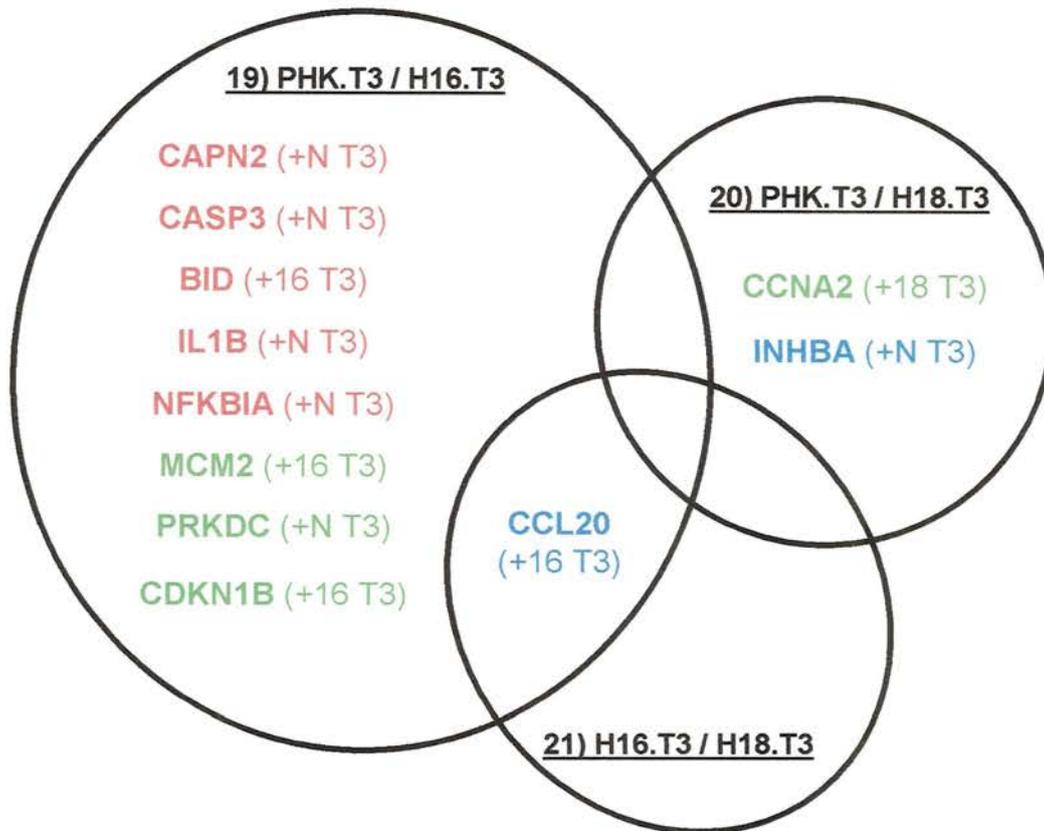
Genebank	Nome do gene	Expressão	pval_ttest	Via de Ação
<u>BG002017</u>	CSF2RB	5.53142	0.00032	apoptose
<u>BF996555</u>	IL6ST	5.54747	2e-04	citocinas
<u>BG002017</u>	CSF2RB	5.53142	0.00032	citocinas



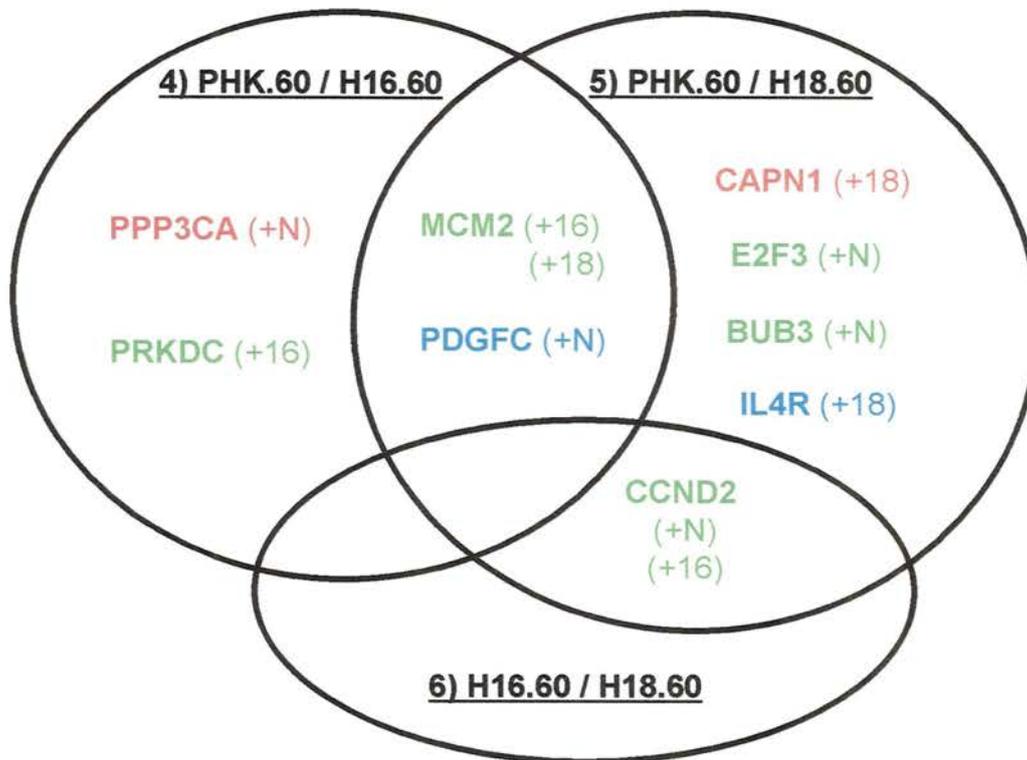
**Figura 27** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (vermelho), ciclo celular (verde) e citocinas (azul). Foram consideradas as comparações 1, 2 e 3 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N): expressão maior nas células normais, (+16): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16, (+18): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18.



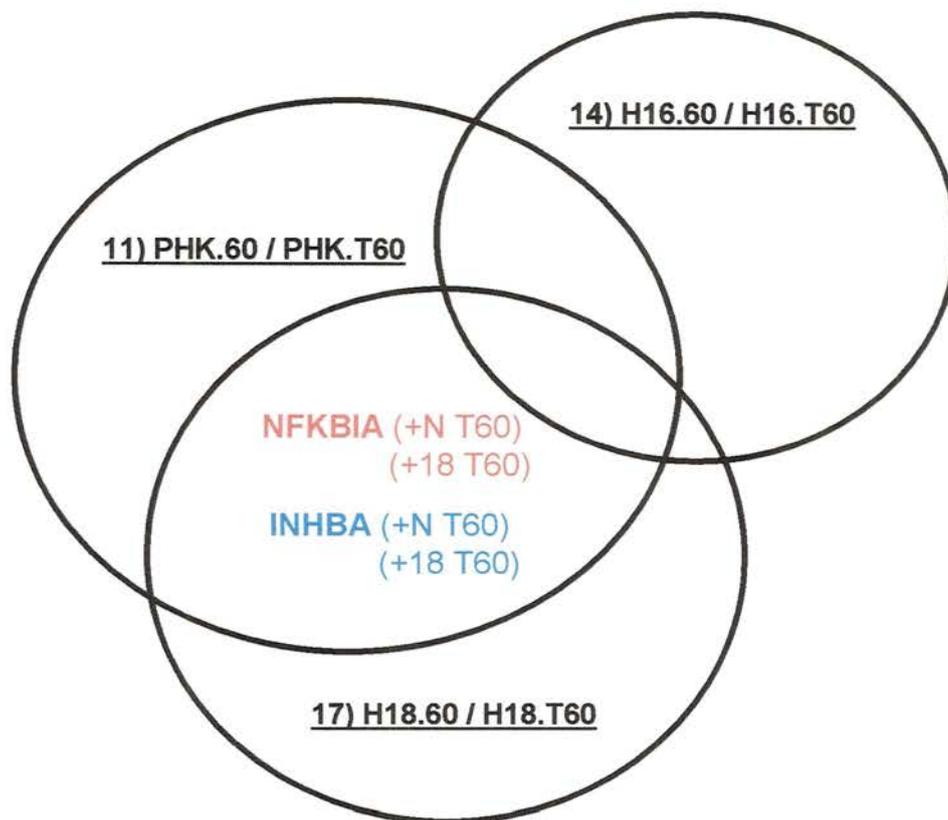
**Figura 28** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (vermelho), ciclo celular (verde) e citocinas (azul). Foram consideradas as comparações 10, 13 e 16 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N): expressão maior nas células normais, (+N T3): expressão maior nas células normais tratadas 3 hs com TNF, (+16): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16, (+16 T3): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16 tratadas 3 hs com TNF, (+18): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18, (+18 T3): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18 tratadas 3 hs com TNF.



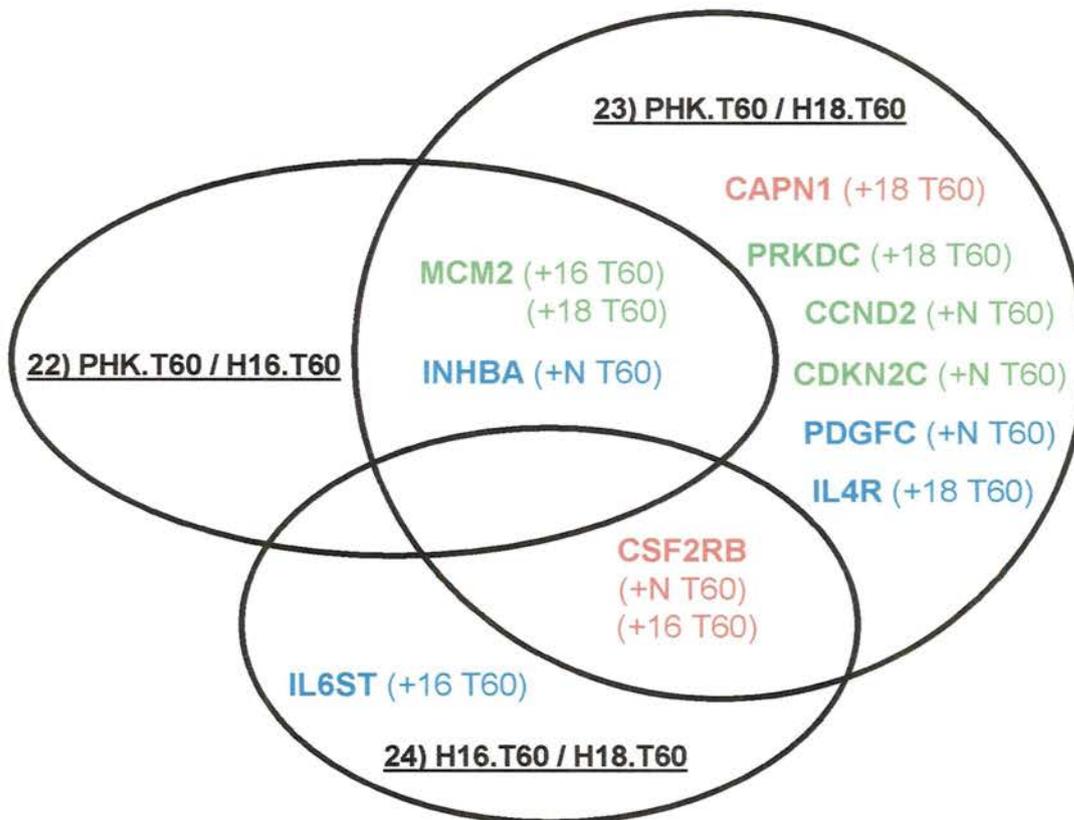
**Figura 29** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (*vermelho*), ciclo celular (*verde*) e citocinas (*azul*). Foram consideradas as comparações 19, 20 e 21 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N T3): expressão maior nas células normais tratadas 3 hs com TNF, (+16 T3): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16 tratadas 3 hs com TNF, (+18 T3): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18 tratadas 3 hs com TNF.



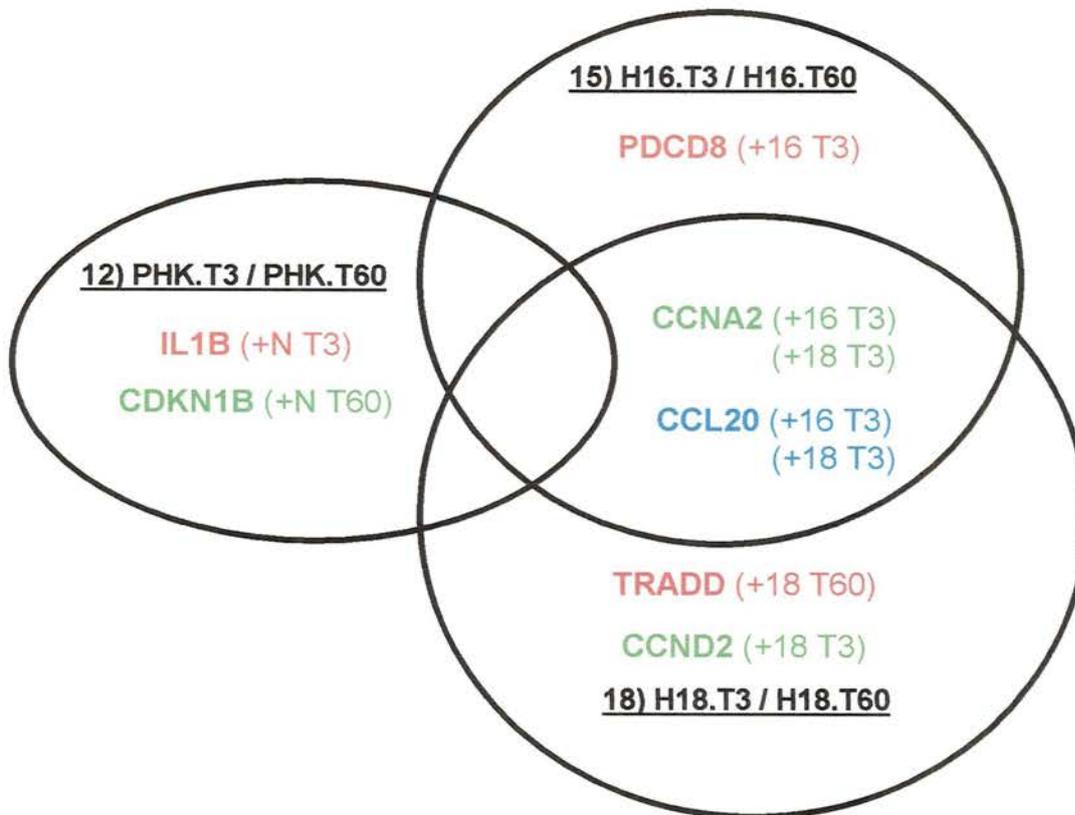
**Figura 30** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (vermelho), ciclo celular (verde) e citocinas (azul). Foram consideradas as comparações 4, 5 e 6 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N): expressão maior nas células normais, (+16): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16, (+18): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18.



**Figura 31** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (**vermelho**), ciclo celular (**verde**) e citocinas (**azul**). Foram consideradas as comparações 11, 14 e 17 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N T60): expressão maior nas células normais tratadas 60 hs com TNF, (+16 T60): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16 tratadas 60 hs com TNF, (+18 T60): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18 tratadas 60 hs com TNF.



**Figura 32** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (**vermelho**), ciclo celular (**verde**) e citocinas (**azul**). Foram consideradas as comparações 22, 23 e 24 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N T60): expressão maior nas células normais tratadas 60 hs com TNF, (+16 T60): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16 tratadas 60 hs com TNF, (+18 T60): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18 tratadas 60 hs com TNF.



**Figura 33** - Diagrama de Venn que representa os genes diferencialmente expressos associados à apoptose (vermelho), ciclo celular (verde) e citocinas (azul). Foram consideradas as comparações 12, 15 e 18 (preto), cujos genes obtiveram p-valor  $\leq 0,005$  e relação de expressão  $< 0,5$  ou  $> 2,0$ . (+N T3): expressão maior nas células normais tratadas 3 hs com TNF, (+N T60): expressão maior nas células normais tratadas 60 hs com TNF, (+16 T3): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16 tratadas 3 hs com TNF, (+16 T60): expressão maior nas células imortalizadas com HPV16 tratadas 60 hs com TNF, (+18 T3): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18 tratadas 3 hs com TNF, (+18 T60): expressão maior nas células imortalizadas com HPV18 tratadas 60 hs com TNF.

Tabela 5 - Características dos genes analisados nos diagramas de Venn.

<b>Símbolo do gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Função<sup>a</sup></b>
<b>BID</b>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	<i>Apoptotic mitochondrial changes, induction of apoptosis via death domain receptors, regulation of apoptosis, death receptor binding</i>
<b>CAPN1</b>	<i>calpain 1, (mu/I) large subunit</i>	<i>Positive regulation of cell proliferation, proteolysis and peptidolysis, calcium ion binding</i>
<b>CAPN2</b>	<i>encoding calpain 2, (m/II) large subunit</i>	<i>Proteolysis and peptidolysis, calcium ion binding, calpain activity, hydrolase activity</i>
<b>CASP3</b>	<i>caspase 3, apoptosis-related cysteine protease</i>	<i>Induction of apoptosis, proteolysis and peptidolysis, caspase activity, cysteine-type peptidase activity, hydrolase activity</i>
<b>CSF2RB</b>	<i>encoding colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage).</i>	<i>Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata), cytokine and chemokine mediated signaling pathway, respiratory gaseous exchange, signal transduction, interleukin-3 receptor activity, interleukin-5 receptor activity</i>
<b>IL1B</b>	<i>encoding interleukin 1, beta</i>	<i>Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata), apoptosis, negative regulation of cell proliferation, inflammatory response, regulation of cell cycle</i>
<b>NFKBIA</b>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	<i>Apoptosis, cytoplasmic sequestering of NF-kappaB, response to pathogenic bacteria, transcription factor binding</i>
<b>PDCD8</b>	<i>encoding programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)</i>	<i>DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis, DNA fragmentation during apoptosis, electron transport, disulfide oxidoreductase activity, electron carrier activity</i>
<b>PPP3CA</b>	<i>encoding protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)</i>	<i>Protein amino acid dephosphorylation, calcium ion binding, calmodulin binding, hydrolase activity, protein serine/threonine phosphatase activity</i>
<b>TRADD</b>	<i>encoding TNFRSF1A-associated via death domain</i>	<i>Induction of apoptosis, positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade, signal transduction, protein binding, signal transducer activity</i>
<b>BUB3</b>	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)</i>	<i>Cell proliferation, mitosis, mitotic spindle checkpoint Different localisations may apply to different isoforms</i>

Tabela 5 - (continuação)

<b>CCNA2</b>	<i>cyclin A2</i>	<i>Cytokinesis, mitosis, mitotic G2 checkpoint, regulation of cyclin dependent protein kinase activity, regulation of cell cycle</i>
<b>CCND2</b>	<i>cyclin D2</i>	<i>Cytokinesis, regulation of cell cycle</i>
<b>CDKN1B</b>	<i>encoding cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>	<i>Cell cycle arrest, negative regulation of cell proliferation, regulation of cyclin dependent protein kinase activity, cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity, transforming growth factor beta receptor, cytoplasmic mediator activity</i>
<b>CDKN2C</b>	<i>encoding cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)</i>	<i>Cell cycle arrest, negative regulation of cell proliferation, cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity</i>
<b>E2F3</b>	<i>encoding E2F transcription factor 3</i>	<i>Regulation of cell cycle, regulation of transcription, DNA-dependent, transcription initiation from Pol II promoter, protein binding, transcription factor activity</i>
<b>MCM2</b>	<i>encoding MCM2 minichromosome maintenance deficient 2</i>	<i>DNA replication initiation, cell cycle, regulation of transcription, DNA-dependent, ATP binding, DNA binding, DNA-dependent ATPase activity associated with laryngeal squamous epithelial lesions</i>
<b>PRKDC</b>	<i>encoding protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>	<i>DNA recombination, double-strand break repair, protein modification, DNA binding, protein serine/threonine kinase activity, transferase activity, phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor</i>
<b>CCL20</b>	<i>encoding chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	<i>Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata), cell-cell signaling, chemotaxis, immune response, inflammatory response, signal transduction</i>
<b>IL4R</b>	<i>interleukin 4 receptor</i>	<i>Immune response, signal transduction, hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor activity, interleukin-4 receptor activity, receptor signaling protein activity</i>
<b>IL6ST</b>	<i>encoding interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)</i>	<i>Cell surface receptor linked signal transduction, immune response, interleukin-6 receptor activity, oncostatin-M receptor activity</i>

**Tabela 5** - (continuação)

<b>INHBA</b>	<i>encoding inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)</i>	<i>Cell cycle arrest, cell differentiation, cell growth and/or maintenance, growth factor activity</i>
<b>MET</b>	<i>met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>	<i>Cell proliferation, cell surface receptor linked signal transduction, protein amino acid phosphorylation, transferase activity, protein kinase activity</i>
<b>PDGFC</b>	<i>encoding platelet derived growth factor C</i>	<i>Cell growth and/or maintenance, cell proliferation, regulation of cell cycle, growth factor activity</i>

função gênica de acordo com *LocusLink* (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.edu](http://www.ncbi.nlm.nih.edu)) e fontes de referências interligadas à esse banco de dados.

## 6 DISCUSSÃO

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

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

Diversos trabalhos indicam que NF- $\kappa$ B é uma das principais proteínas ativadas pelo TNF nos queratinócitos da epiderme e que sua principal função está associada à regulação negativa da proliferação destas células, sendo um fator importante para a diferenciação celular e manutenção da homeostase tecidual (SEITZ et al. 1998; CHATURVEDI et al. 1999; van HOGERLINDEN et al. 1999; KOMINE et al. 2000; SEITZ et al. 2000; HU et al. 2001). Nos epitélios estratificados, NF- $\kappa$ B localiza-se no citoplasma das células proliferativas da camada basal, enquanto que nas células não proliferativas das camadas superiores, este fator é encontrado dentro do núcleo. Além disso, o bloqueio da atividade de NF- $\kappa$ B na epiderme produz hiperplasia enquanto a sua superexpressão resulta em hipoplasia (SEITZ et al. 1998). Por outro lado, a ativação constitutiva de NF- $\kappa$ B tem sido discutida exaustivamente na literatura em diversos tipos de neoplasias,

como por exemplo, leucemias, linfomas, tumores de mama, pâncreas, fígado, estômago e cabeça e pescoço (SOVAK et al. 1997; WANG et al. 1999; SASAKI et al. 2001; CHANG et al. 2005).

Além disso, a interferência de diversos vírus humanos na ativação de NF- $\kappa$ B tem sido e continua sendo descrita até o momento. Dentre os principais exemplos podemos citar: HIV-1, HTLV-1, vírus influenza, hepatite B e C, herpesvírus, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, adenovírus e HPV, como será discutido adiante. A grande maioria destes têm como alvo principal a ativação do complexo quinase IKK (SANTORO et al. 2003). Em vista disso, a principal dúvida converge em: quem se beneficia mais com a ativação de NF- $\kappa$ B, a célula infectada ou o vírus?

Células infectadas geralmente utilizam a ativação do fator NF- $\kappa$ B para desencadear mecanismos de defesa contra diversos patógenos, mas em alguns casos, torna-se evidente o benefício que alguns vírus obtêm com a ativação deste fator, principalmente bloqueando o processo de apoptose. Estudos mais recentes, enfatizam o papel de NF- $\kappa$ B na proliferação e sobrevivência celular através de mecanismos anti-apoptóticos. De fato, este fator de transcrição ativa a expressão de, por exemplo, diversas proteínas que regulam positivamente o ciclo celular, como a ciclina D1 e c-myc, além de promover a ativação de membros da família Bcl2 e de inibidores da apoptose (c-IAP1, c-IAP2 e XIAP), TRAF1 e TRAF2 (KARIN e DELHASE 2000). Desta forma, a desregulação na via de ativação de NF- $\kappa$ B promoveria não apenas uma proliferação celular descontrolada, mas também a provável transformação celular. Além disso, estes efeitos confeririam aos vírus um

ganho de tempo para sua replicação e o aumento no número de partículas virais (UHLIK et al. 1998; LI et al. 1999; XIAO et al. 2000).

Evidentemente, nem todos os genes responsivos ao NF- $\kappa$ B são expressos após sua ativação. Diversos fatores que compõem o complexo de transcrição são necessários para uma indução de transcrição efetiva. Estes fatores são seletivamente expressos em cada tipo celular e conferem especificidade à atividade transcricional do fator NF- $\kappa$ B. Desta forma, tipos celulares diferentes respondem de forma distinta à ativação deste fator ou um mesmo tipo celular, dependendo do estado em que as células se encontram, pode responder de forma diferente ao mesmo estímulo.

A regulação da ativação de NF- $\kappa$ B é um ponto intrigante e ainda não totalmente elucidado. Até o momento, uma série de estudos e revisões vêm sendo publicadas, descrevendo diversas facetas deste fator. Fortes evidências associam a regulação da atividade de NF- $\kappa$ B não apenas à degradação de seu inibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , mas também à modificações pós e co-traducionais que ocorrem na molécula após sua ativação, como por exemplo, eventos de fosforilação e acetilação (BALDWIN 2001; BENNERIAH 2002; GHOSH e KARIN 2002). A relação entre a ativação de NF- $\kappa$ B e seu benefício, depende estritamente do tipo de célula hospedeira e do vírus. No caso de vírus que desenvolveram estratégias para utilizar este fator de transcrição para otimizar sua replicação ou controlar a proliferação e diferenciação das células hospedeiras, a elucidação dos mecanismos moleculares utilizados por estes patógenos para interferir na via de ativação

de NF- $\kappa$ B, tornaria possível o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas contra determinadas infecções virais.

Uma vez que a infecção pelo HPV é necessária, mas não suficiente para a transformação de células cervicais normais em células cancerígenas (PIRISI et al. 1988; STOREY et al. 1998), a identificação de outros eventos ou alterações moleculares nas células infectadas, tornam-se cruciais para o entendimento da progressão tumoral neste tipo celular.

Estudos recentes mostraram que E6 de HPV16 é capaz de induzir resistência ao TNF. Esta oncoproteína é capaz de se ligar ao receptor 1 de TNF (TNFR1), além de proteger fibroblastos de camundongo, células de osteosarcoma humano e histiócitos/monócitos humanos da apoptose mediada por TNF (FILIPPOVA et al. 2002). Mais ainda, a proteína E7 de HPV 16 é capaz de conferir resistência ao efeito antiproliferativo do TNF em queratinócitos (BASILE et al. 2001) e de inibir a apoptose associada à esta citocina em fibroblastos (THOMPSON et al. 2001). Diversos estudos têm mostrado que a síntese de DNA nas camadas de queratinócitos diferenciados é induzida pelo gene E7 de HPV 16 ou 18 (CHENG et al. 1995; JONES et al. 1997; RUESCH e LAIMINS 1997; FLORES et al. 2000). Além disso, foi descrita a associação da proteína E7 ao complexo quinase IKK, diminuindo desta forma, a ativação de NF- $\kappa$ B, ao passo que a oncoproteína E6 reduz a atividade transcricional de p65 no núcleo. Interessantemente, observou-se que a atividade de NF- $\kappa$ B não foi totalmente abolida pela expressão de E6/E7, evento provavelmente associado à necessidade de proliferação celular nas células infectadas pelo vírus

(SPITKOVSKY et al. 2002). Além disso, culturas organotípicas derivadas de queratinócitos transduzidos com retrovírus que expressam E6/E7 ou E7 de HPV 18 também apresentaram síntese de DNA nas camadas suprabasais do tecido epitelial. Nestes casos, a síntese é parcialmente inibida pelo tratamento com TNF, indicando que E7 de HPV18 é suficiente para conferir resistência à esta citocina, fato não observado em queratinócitos normais (BOCCARDO et al. 2004).

Por outro lado, estudos indicam que a ativação de AP-1 e/ou NF- $\kappa$ B contribuem para a progressão neoplásica em queratinócitos humanos imortalizados por HPV (LI et al. 1998). A expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 em queratinócitos cervicais induzem diversos genes responsivos ao fator NF- $\kappa$ B associados à proliferação celular, identificados através da técnica de cDNA-*microarray* (NEES et al. 2001). Um aumento da atividade de NF- $\kappa$ B também foi observado em papilomas laríngeos infectados com HPV 6 e 11 (VANCUROVA et al. 2002). Vale ressaltar que, a proteína E5 de BPV-1 estimula a ativação deste fator de transcrição através da indução de radicais superóxido (KILK et al. 1996). Mais ainda, o aumento dos níveis de estresse oxidativo, resultante da ativação exacerbada de NF- $\kappa$ B, foi observado em cânceres cervicais mais agressivos com baixo nível apoptótico (HOCKEL et al. 1999). Um estudo mais recente, descreve a ativação constitutiva de NF- $\kappa$ B à progressão de lesões intraepiteliais de alto grau e a carcinomas epidermóides da cervix uterina (NAIR et al. 2003).

Não existem indícios consistentes da ativação direta de NF- $\kappa$ B pelo HPV. Contudo, o entendimento das observações controversas quanto à

atividade do fator NF- $\kappa$ B durante a infecção por HPV e progressão das lesões cervicais intraepiteliais, torna-se crucial para a elucidação do processo de eliminação das células infectadas por este vírus.

Estudos anteriores do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig, mostraram níveis nucleares diferentes do fator NF- $\kappa$ B quando comparados queratinócitos normais, imortalizados ou transformados com HPV (BOCCARDO 2002). As células normais e as imortalizadas por HPV16 (HF698), apresentaram níveis altos de NF- $\kappa$ B nuclear. Contrariamente, este efeito não foi observado em células imortalizadas com HPV18 (HF18Nco) ou derivadas de tumor (HeLa, CaSki, Sw756 e SiHa). Estes dados indicam a presença de uma alteração na via de ativação do NF- $\kappa$ B nas linhagens resistentes ao TNF e sugerem que alterações na via de sinalização desta citocina poderiam ser eventos comuns no mecanismo de carcinogênese mediada por HPV.

## **6.1 ANÁLISE DO EFEITO DO TNF E HPV NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ e SUMO**

No presente estudo foram analisadas os níveis de expressão de diversos fatores envolvidos na via de ativação de NF- $\kappa$ B. Utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir de diversas culturas organotípicas (originadas de queratinócitos normais ou transduzidos com as oncoproteínas E6, E7 e E6 e E7 de HPV18), queratinócitos normais e linhagens imortalizadas com HPV16 ou 18, antes e após o tratamento com TNF,

avaliaram-se neste estudo, os níveis de expressão das proteínas  $I\kappa B\alpha$ ,  $IKK\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$  e SUMO-1.

Estudos observaram que a ausência total da proteína  $IKK\alpha$  em camundongos, provoca a indiferenciação da epiderme, com constante proliferação da camada basal, provocando a diminuição das outras camadas mais diferenciadas. Interessantemente, parece que  $IKK\alpha$  não é essencial para o desencadeamento da resposta inflamatória, mas que é crucial para a diferenciação dos queratinócitos (SEITZ et al. 1998; HU et al. 1999; KARIN e BEN-NERIAH 2000). Nas amostras analisadas, tanto provenientes de culturas organotípicas, como de linhagens, os níveis de expressão desta proteína não variaram (**Figura 3**). No entanto, seria interessante determinar a atividade quinase da proteína  $IKK\alpha$  nas células analisadas.

Da mesma forma que  $IKK\alpha$ , a proteína  $I\kappa B\beta$  foi detectada em todas as amostras em níveis de expressão semelhantes (**Figura 4**). A detecção de uma banda logo acima de  $I\kappa B\beta$ , presente apenas nas células que expressam os oncogenes E6 e/ou E7, foi detectada. Esta banda poderia corresponder a proteína  $I\kappa B\beta$  fosforilada. Diversas evidências indicam que esta proteína não responde ao tratamento com TNF, mas seria induzida por LPS e IL-1. Além disso, contrariamente do que ocorre com  $I\kappa B\alpha$ , a transcrição de  $I\kappa B\beta$  não é induzida pelo fator NF- $\kappa$ B. Dados indicam que o fator NF- $\kappa$ B requer eventos de fosforilação antes de sua dissociação de  $I\kappa B\beta$ , além de persistir no núcleo por períodos mais longos. Por último, enquanto  $I\kappa B\alpha$  responde imediatamente a situações de estresse celular, a resposta mediada por  $I\kappa B\beta$  parece estar associada a inflamações e

infecções crônicas, e até mesmo na diferenciação celular (THOMPSON et al. 1995).

Não foi observada nenhuma banda correspondente a I $\kappa$ B $\alpha$  sumonilado, mas apenas o reconhecimento da proteína SUMO em sua forma livre (**Figura 4**). Esta proteína é responsável pela estabilização da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  associada ao fator NF- $\kappa$ B, através de sua ligação nos sítios de ubiquitina presentes em I $\kappa$ B $\alpha$ , prevenindo, desta forma, sua degradação e liberação de NF- $\kappa$ B (SEELER e DEJEAN 2003). Os níveis de expressão das proteínas IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e SUMO-1, não foram alterados após o tratamento com TNF por 60 horas em nenhum tipo celular, no entanto, para uma melhor interpretação destes dados, seria interessante avaliar os níveis de expressão destas proteínas em diversos períodos de tratamento com TNF.

Em seguida, foram avaliados os níveis protéicos de I $\kappa$ B $\alpha$ , utilizando-se extratos protéicos totais obtidos a partir de diversas culturas organotípicas (originadas de queratinócitos normais, transduzidos com vetores retrovirais que expressam os oncogenes virais E6, E7 e E6 e E7 de HPV18), antes e após tratamento de 60 horas com TNF. Em todas as amostras foi observada uma leve redução nos níveis de expressão desta proteína. Um dado interessante, foi a detecção de uma banda de aproximadamente 20 kDa em todas amostras tratadas com TNF. Além disso, níveis de expressão menores desta proteína foram observados em amostras não tratadas mas que expressam os oncogenes virais. Por outro lado, esta proteína não foi observada nas amostras de queratinócitos normais não tratados com TNF (**Figura 5**).

Inicialmente, estes dados nos levaram a crer, que esta banda de 20 kDa poderia corresponder a um produto da proteólise parcial de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , acumulado em células tratadas com TNF, uma vez que, a detecção desta banda coincidia com a diminuição dos níveis de expressão de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . A degradação de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ocorre pela via de proteólise dependente de ubiquitina. Inicialmente, os resíduos de serina 32 e 36 são fosforilados, evento seguido da ubiquitinação das lisinas 21, 22, 38 e 47 desta proteína (região N terminal da proteína).

Os níveis de expressão da proteína  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  foram então avaliados em diversos tipos celulares, incluindo queratinócitos normais, linhagens imortalizadas com HPV16 ou 18 (HF698 e HF18Nco), além de HeLa, uma linhagem derivada de um adenocarcinoma de colo uterino. Tanto nos queratinócitos normais, como nas células imortalizadas com HPV16 ou 18 e HeLa, observa-se uma nítida diminuição dos níveis de expressão de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  após 15-30 minutos de tratamento com TNF. Após este período, os níveis de expressão desta proteína voltam a ser semelhantes aos observados no controle, conforme descrito anteriormente (TRAENCKNER et al. 1994; KARIN et al. 2004). Interessantemente, na linhagem imortalizada com HPV 18, observamos um aumento geral nos níveis de expressão desta proteína, comparados aos outros em tipos celulares. Este efeito pode estar associado a alterações na via de sinalização de TNF previamente observadas nestas células. Além disso, poderíamos especular a ativação/atividade anômala de fator  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , que estaria induzindo uma maior transcrição de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  nestas células (**Figura 6**). Com o objetivo de avaliar o período em que esta banda

era detectada, optamos por analisar os níveis de expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  e da banda de 20 kDa, em células normais e em HF698, após tratamento com TNF por diferentes períodos: 15, 60 minutos e 60 horas, em um mesmo experimento. Observou-se a presença da banda de 20 kDa apenas nas amostras tratadas com 60 horas de TNF (**Figura 7**). Este dado nos indicou que possivelmente esta banda de 20 kDa era induzida apenas após um período de tratamento mais longo com TNF.

A fim de avaliar se a proteína de 20 kDa era detectada em outros tipos celulares, foi realizado um ensaio de Western Blot utilizando extratos protéicos derivados das linhagens HF698, HF18Nco e HF18.42 (**Figura 8**) e em amostras provenientes de culturas organotípicas de queratinócitos transfectados com o genoma completo de HPV16 ou 18 e que caracterizam morfologicamente displasias leves, moderadas e severas (**Figura 9**). Foi observada a diminuição de I $\kappa$ B $\alpha$  em todas as linhagens, como esperado, além da clara detecção da banda de 20 kDa em todas as amostras (exceto na linhagem HF18Nco) após tratamento com TNF. Além disso, com exceção da linhagem HF18Nco, esta banda é detectada em baixos níveis de expressão nas linhagens imortalizadas ou transformadas com HPV não tratadas sugerindo uma possível interferência do HPV na expressão e/ou estabilidade desta proteína. A identidade desta proteína de 20 kDa é desconhecida. No entanto, o simples fato de ser detectada em amostras derivadas de diferentes linhagens de células humanas, assim como, em extratos derivados de culturas de fibroblastos de camundongo tratados com TNF murino após 60 horas de tratamento (dados não mostrados), sugere

que o aparecimento desta banda é um efeito específico do tratamento com TNF e não um artefato da técnica empregada.

Para determinar o período aproximado em que a banda de 20 kDa era inicialmente detectada, culturas de queratinócitos normais e HF18Nco, foram tratadas com TNF por períodos diferentes. Como mostrado na **Figura 10-A** (painel inferior, filme mais exposto), a banda é claramente detectada a partir da 24<sup>a</sup> hora de tratamento com TNF. Além disso, no filme original é possível visualizar uma banda fraca a partir da 12<sup>a</sup> hora de tratamento. Conforme observado anteriormente, esta banda não foi detectada em extratos protéicos derivados da linhagem HF18Nco (**figura 10-B**). Além do mais, observamos que a interrupção do tratamento com TNF não afeta os níveis de expressão desta proteína. Conforme mostrado na **Figura 11**, o tratamento por 24 com TNF é suficiente para induzir níveis de expressão detectáveis desta proteína. Além disso, os mesmos se mantêm estáveis por pelo menos 36 horas, mesmo na ausência de TNF. Isto indica que se trata de uma proteína estável que não requer a presença do TNF após sua indução. No entanto, a manutenção do tratamento com TNF por 48 ou 60 horas mostra níveis de expressão aumentados desta proteína, fato que indica o efeito do TNF nos níveis de expressão da mesma. Por tanto, para caracterizar o comportamento temporal desta proteína, torna-se necessária a realização de novos experimentos em que se prolongue o tempo na ausência de TNF após a indução inicial.

Com intuito de averiguar se esta banda correspondia a um produto de proteólise parcial da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , o gene I $\kappa$ B $\alpha$  foi clonado no vetor

pcDNA3.1/V5His(B) para a produção de uma proteína recombinante contendo uma sequência *flag* de 14 aminoácidos na região carboxiterminal. Este vetor foi utilizado em ensaios de infecção transiente em queratinócitos, visando detectar a banda de 20 kDa a partir do epítipo originado da sequência V5 contida no vetor recombinante. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 12**. Utilizando-se o anticorpo contra o epítipo V5, foi possível detectar a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  recombinante (**Figura 12-B**). No entanto, não conseguimos detectar a proteína de 20 kDa. Existem pelo menos duas explicações possíveis para este fato. Em primeiro lugar, o *flag* poderia ter sido perdido durante o processo de proteólise. Um exemplo amplamente descrito sobre o mecanismo utilizado para originar proteínas através da degradação parcial de outras, ocorre justamente na via de sinalização mediada pelo TNF. As proteínas p50 e p52, pertencentes aos membros que compõem NF- $\kappa$ B, são originadas através da proteólise parcial de seus precursores p105 e p100, respectivamente. Interessantemente, a outra parte das proteínas clivadas, corresponde à membros da família I $\kappa$ B (revisado por KARIN et al. 2004). Outra alternativa possível é que a banda em questão poderia corresponder a uma proteína originada de um gene distinto e não a partir da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ . Neste sentido, é importante destacar que os níveis de expressão desta proteína permanecem constantes em amostras obtidas a partir culturas de queratinócitos tratadas por 60 horas com TNF incluindo as últimas 12-18 horas na presença de lactacistina, um inibidor irreversível do proteasoma (**Figura 13**). Novamente, esta observação admite pelo menos duas explicações. No primeiro caso, a banda

de 20 kDa poderia representar um intermediário de degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  que precisa da atividade do proteasoma para sua degradação total. A segunda possibilidade é, novamente, que esta proteína derive de um gene diferente ao I $\kappa$ B $\alpha$ .

Os dados obtidos a partir do tratamento com lactacistina e da remoção do TNF sugerem que a proteína de 20 kDa não corresponde à um intermediário da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ . Visando corroborar este dado foram obtidos RNA e extratos protéicos de culturas de queratinócitos tratadas com TNF conjuntamente com actinomicina D (um inibidor da transcrição) ou cicloheximida (um inibidor da tradução). A análise dos níveis do transcrito I $\kappa$ B $\alpha$  em queratinócitos normais mostra que os mesmos são baixos e que são claramente induzidos pelo tratamento com TNF. No entanto, conforme esperado, o tratamento com actinomicina D torna indetectáveis os níveis do transcrito I $\kappa$ B $\alpha$ . Finalmente, observamos que o tratamento com cicloheximida induz um aumento nos níveis deste transcrito mesmo na ausência de TNF, sugerindo que sua degradação é dependente de síntese protéica (**Figura 14 - A**). Em seguida, os níveis de expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  e da proteína de 20 kDa foram analisados em extratos protéicos obtidos a partir de culturas de queratinócitos tratadas conforme descrito acima (**Figura 14 - B**). Observamos que o tratamento com TNF reduz os níveis de expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ . Esta redução é mais evidente nos extratos protéicos derivados de culturas tratadas com actinomicina D. No entanto, os níveis de expressão da proteína de 20 kDa (induzida pelo tratamento com TNF) não foram afetados pelo tratamento com actinomicina

D indicando que esta é uma proteína mais estável que  $I\kappa B\alpha$ . Além disso, observamos que o tratamento com cicloheximida estabiliza a proteína  $I\kappa B\alpha$  na presença de TNF indicando que a degradação da mesma é dependente de síntese protéica. Por outro lado, os níveis de expressão da proteína de 20 kDa não foram alterados pelo tratamento com cicloheximida. Em conjunto, estes dados sugerem que a proteína de 20 kDa induzida por TNF tem meia vida maior que  $I\kappa B\alpha$ . Além disso, os níveis de expressão da mesma são independentes da degradação de  $I\kappa B\alpha$  induzida por TNF, na presença ou ausência de actinomicina D.

Paralelamente investimos na análise do gene de  $I\kappa B\alpha$ , visando identificar possíveis produtos alternativos deste gene. Uma revisão exaustiva da literatura, mostra que produtos alternativos deste gene não têm sido descritos até o momento. No entanto, com a colaboração do Dr. Sandro de Souza do Laboratório de Biologia Computacional do ILPC, foi realizada a análise *in silico* do mesmo, mostrando a existência de possíveis eventos de retenção intrônica envolvendo este gene, em particular um produto que retém o intron 2, com o potencial de codificar uma proteína de aproximadamente 20 kDa.

O gene de  $I\kappa B\alpha$  (AY496422 PubMed), é composto por 6 exons e 5 introns apresentando um transcrito primário de 3265 nucleotídeos. Seu mensageiro maduro (incluindo exons, UTRs [untranslated region] e cauda poli A) é composto por 1562 nucleotídeos. A região codificadora (apenas representada pela proteína) é composta por 951 nucleotídeos, que codificam para uma proteína de 317 aminoácidos (aproximadamente 35 kDa). Foram

realizados diversos experimentos na tentativa de identificar um possível evento de retenção intrônica neste gene, no entanto, os resultados obtidos até o presente momento não foram conclusivos (dados não apresentados).

Conforme mencionado em Materiais e Métodos, estão sendo realizados géis bi-dimensionais para a identificação desta proteína. A identificação e possível caracterização de uma proteína ativada tardiamente pelo TNF em queratinócitos, poderia contribuir para a elucidação do efeito antiinflamatório mediado por esta citocina no tecido epitelial, além de permitir o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas associadas à inflamação tardia e/ou crônica.

## **6.2 EFEITO DA INFECÇÃO POR HPV NA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL E SUA INTERFERÊNCIA NA SINALIZAÇÃO MEDIADA POR TNF**

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

extremamente eficiente, por exemplo na busca de marcadores tumorais ou alvos para drogas (GOLUB et al. 1999; BELBIN et al. 2002; POMEROY et al. 2002; BEER et al. 2002; VAN'T VEER et al. 2002). Alterações significativas na expressão gênica podem ser avaliadas visando-se um conjunto de genes que correspondam a uma mesma via ou através de genes que apresentem funções semelhantes (MOOTHA et al. 2003; SEGAL et al. 2003 e 2004).

De maneira geral, a grande maioria dos genes não apresenta diferenças de expressão quando comparamos duas amostras, apenas alguns genes apresentam diferenças significativas em sua expressão. Partindo do princípio que a quantidade de cDNA alvo hibridizado deve ser igual nos dois canais, conseqüentemente os valores de intensidade obtidos para a grande maioria dos *spots* devem ser semelhantes. Aceita-se que em uma hibridização competitiva com duas amostras de RNA, cerca de 10-20% dos spots apresentarão razão  $\geq 2$ . Algumas fontes de imprecisão, onde podemos destacar, diferenças na incorporação dos fluoróforos e erros derivados dos equipamentos utilizados, introduzem falta de exatidão que prejudicam a interpretação real dos dados.

Estudos anteriores, mostraram que queratinócitos normais ou imortalizados com HPV16 são sensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF. Por outro lado, queratinócitos imortalizados com HPV18 ou linhagens derivadas de tumores de cervix uterina são resistentes ao efeito citostático mediado por esta citocina. Estas observações sugerem que a aquisição de resistência ao efeito antiproliferativo do TNF é um fator importante no desenvolvimento de neoplasias associadas à infecção por HPV. No entanto,

a identificação de genes associados à resposta ao TNF em queratinócitos infectados por HPV tem sido dificultada pela ampla gama de efeitos desencadeados e de vias de sinalização ativadas por este fator. No presente estudo, a técnica de cDNA-*microarray* foi aplicada visando identificar genes diferencialmente expressos entre queratinócitos normais e queratinócitos imortalizados com HPV16 ou HPV18, antes e após tratamento com TNF. O objetivo desta análise é identificar diferenças na expressão gênica que permitam explicar o efeito diferencial da citocina nestas células.

Em vista disso, neste estudo visamos identificar genes cuja expressão é regulada pelo TNF em queratinócitos humanos normais e infectados por dois tipos de HPV de alto risco, por dois períodos de tempo, 3 e 60 horas. Optamos por analisar a expressão gênica após 3 horas de exposição ao TNF, pois durante este período ocorre a modulação na expressão da grande maioria dos genes responsivos à esta citocina. Isto permite uma melhor avaliação das possíveis interferências mediadas pelo HPV na via de regulação exercida pelo TNF. No entanto, concomitantemente, foram avaliados os efeitos da exposição prolongada ao TNF (60 horas), uma vez que, nos processos inflamatórios e/ou infecção viral, a exposição à esta citocina ocorre por períodos prolongados (VILLA e SCHLEGEL 1991, BANNO et al, 2004).

Na literatura, alguns estudos investigaram diferenças nos perfis de expressão gênica associados às oncoproteínas virais E6 e E7. A expressão destas oncoproteínas está associada a diminuição da expressão de genes relacionados a resposta imune e inflamatória, como por exemplo genes

induzidos pelo interferon (CHANG & LAIMINIS, 2000 e 2001; NEES, 2001). Um recente estudo determinou que a proteína E6 de HPV16 diminui a expressão de diversos genes relacionados à diferenciação dos queratinócitos, incluindo genes que codificam transglutaminases, involucrina, elafina e citoqueratinas, proteínas que estão envolvidas na produção da camada córnea, como por exemplo a elafina. Contrariamente, E6 aumenta a expressão de genes como, por exemplo, a vimentina, uma proteína do citoesqueleto (DUFFY et al., 2003). A investigação do perfil gênico de amostras originadas de carcinomas cervicais em diferentes estádios, mostraram que a carcinogênese cervical apresenta a diminuição quase completa da expressão de genes associados à morte celular, biossíntese protéica e metabolismo dos ácidos nucléicos. Em contrapartida, observou-se o aumento da expressão de genes associados ao desenvolvimento do citoesqueleto, atividade extracelular, resposta imune e proliferação celular (S100A8, símbolo do gene calgranulina A e RARRES3, símbolo do gene que codifica o receptor 3 do ácido retinóico) (AHN et al., 2003).

Até o momento, na literatura, não existem trabalhos utilizando a técnica de cDNA-*microarray* que avaliam perfis de genes em células imortalizadas com o genoma completo de dois tipos diferentes de HPV de alto risco e sua expressão gênica frente à dois períodos de tratamento com TNF.

### 6.2.1 Seleção de genes através dos clusters hierárquicos

Neste estudo, foram comparados os perfis de expressão gênica de cada linhagem celular aos controles correspondentes, o que permitiu associar genes diferencialmente expressos à presença do HPV. Além disso, foi avaliada a expressão gênica após o tratamento com TNF por períodos diferentes e a influência do tempo de permanência das células em cultura.

Utilizando-se agrupamentos hierárquicos, foi comparada a regulação de genes quando avaliados tipo celular, tempo de tratamento e permanência das linhagens em cultura e o efeito do TNF. Conforme apresentado na **figura 22**, em que avaliou-se o **tipo celular** na expressão gênica, observa-se no ramo principal do dendograma, o agrupamento das amostras PHK e HF698. Interessantemente, na **figura 23**, em que se avaliou o efeito do **tempo** na regulação da expressão gênica, no principal ramo do dendograma observa-se o agrupamento da linhagem HF18Nco tratada com TNF por 60 horas e seu controle, das demais linhagens. Nos ramos subsequentes, observa-se o agrupamento do resto das amostras tratadas com TNF (PHK e HF698) das linhagens tratadas por 3 horas, incluindo a linhagem HF18Nco e seu controle. Nas duas figuras, observa-se que cada amostra tratada parecia com seu controle. Nas duas figuras, destacam-se grupos de genes cuja expressão diferencia a amostra HF18Nco das demais, como por exemplo, STAF65 (gamma), FLJ20105, S100P, KLK7, RARRES1, YME1L1, PI3, MYO5B e NMU (**figura 22**) e KLK7, RARRES1 E LXN (**figura 23**). Por outro lado, quando o agrupamento hierárquico foi baseado nos genes que melhor diferenciam as amostras em função da ação do TNF (**figura 24**), observamos

um agrupamento heterogêneo, em que apenas as amostras PHK tratadas por 3 e 60 horas são agrupadas, em relação ao resto das amostras. Provavelmente, este resultado ocorre porque os queratinócitos normais são as amostras mais sensíveis ao efeito mediado pelo TNF.

Assim sendo, visando individualizar os genes que melhor diferenciavam as amostras PHK e HF698 das HF18Nco, foram elaborados dois agrupamentos hierárquicos supervisionados, considerando os 30 genes com melhor valor estatístico, capazes de separar estas amostras para os dois períodos de tratamento com TNF. Na **figura 25**, avaliando-se 3 horas de tratamento e cultura com TNF, as amostras sensíveis e a amostra resistente ao efeito antiproliferativo mediado pelo TNF, foram agrupadas em diferentes ramos. As amostras sensíveis se agruparam em um ramo secundário, com a separação das amostras HF698 e PHK pareadas com seus controles. Do mesmo modo, na **figura 26**, observa-se que as amostras sensíveis e a amostra resistente ao efeito antiproliferativo mediado pelo TNF, foram agrupadas em diferentes ramos. No entanto, o ramo secundário apresenta uma divisão entre as amostras tratadas e controles. Este dado sugere que após 60 horas de cultura (controles) e tratamento com TNF (amostras), as amostras sensíveis ao TNF regulam estes genes de forma semelhante. Provavelmente, a regulação similar de alguns destes genes após o tratamento de 60 horas com TNF, poderia estar contribuindo, em parte, na resposta diferencial observada nestas células. Nas duas figuras, destacam-se grupos de genes cuja expressão diferencia a linhagem HF18Nco das demais. Na comparação com 3 horas de tratamento (**figura 25**), foram

evidenciados alguns genes de interesse, como por exemplo, STAF65 (gamma), FLJ20105, S100P, ALDH3A2, DEK, MAPRE1 SFRP1, PI3, SFRP1, MAPRE1 e DEK (**tabela 1**). Da mesma forma, na comparação com 60 horas de tratamento (**figura 26**), alguns genes de interesse diferenciam claramente a linhagem HF18Nco das outras. Alguns exemplos são, KLK7, RARRES1, LXN, STAF65 (gamma), FLJ20105O, CDK10, TMC4, PRKCBP1, PIK3R3, S100P e SOD2 (**tabela 2**). Quando comparadas as **figuras 25 e 26**, observamos que apenas os genes FLJ20105, KLK7, MGC35048, MYO5B, PI3, S100P e STAF65(gamma), são comuns.

Analisando as funções e o perfil de expressão dos genes listados nas **tabelas 1 e 2** (destacados em vermelho), selecionamos, baseados em dados da literatura, alguns genes cuja expressão diferencial poderia estar associada à diferença na resposta ao efeito antiproliferativo do TNF exibida por estas linhagens. São eles: KLK7, S100P, PI3, DEK, PIK3R3, RARRES1 e SOD2.

Na comparação correspondente ao período de 3 horas, os genes S100P, PI3 e DEK, têm sua expressão aumentada na linhagem HF18Nco (tratada e controle), quando comparada aos demais tipos celulares (**figura 25**). Além disso, os genes KLK7, PIK3R3 e RARRES1 têm sua expressão aumentada e o gene SOD2, diminuída, na linhagem HF18Nco, considerando o período de 60 horas (**figura 26**).

A proteína codificada pelo gene S100P é um membro da família S100. Estas, são proteínas capazes de ligar cálcio, localizadas no núcleo e citoplasma de diferentes tipos celulares e estão envolvidas na regulação de

diferentes processos biológicos como a progressão do ciclo celular e diferenciação. O mecanismo de ação desta proteína ainda não está bem estabelecido. Estudos recentes associaram esta proteína ao modelo de progressão do adenocarcinoma ductal pancreático (DOWEN et al., 2005, SATO et al., 2004).

O gene PI3 codifica um inibidor específico da elastase. Sua principal função está associada ao processo inflamatório. Esta proteína conhecida como elafina, geralmente é encontrada em baixos níveis de expressão na epiderme e endotélio, mas é induzida em processos inflamatórios, tumores epiteliais e na cicatrização (POL et al., 2003, HENRIKSEN et al., 2004).

A oncoproteína DEK está associada a inúmeros processos celulares, incluindo regulação da transcrição, processamento do RNAm e remodelagem da cromatina. Além disso, o aumento de seus níveis de expressão ocorre em doenças auto-imunes e em processos neoplásicos em glioblastoma, melanoma e carcinoma hepatocelular (SITWALA et al., 2002).

As Calicreínas são um sub-grupo de serina-proteases com diversas funções fisiológicas. Crescentes evidências sugerem que a Calicreína 7 está associada à carcinogênese, sendo considerada um novo marcador tumoral e de outras patologias. Esta proteína está envolvida na proteólise de estruturas intracelulares coesivas, associada à descamação da camada córnea do epitélio. Sua expressão encontra-se aumentada em carcinomas cervicais e em linhagens celulares derivadas deste tipo de tumor, contrariamente dos queratinócitos normais, onde os níveis de expressão desta proteína são baixos (SANTIN et al., 2004). Além disso, esta proteína

encontra-se aumentada em câncer de mama (TALIERI et al., 2004) e em tumores de ovário (DONG et al., 2003). Em todos os casos, esta proteína está sendo considerada um novo marcador tumoral.

A proteína PIK3R3, pertence à subunidade regulatória do complexo fosfatidilinositol 3-quinase. Esta enzima cataliza a conversão do fosfatidilinositol em fosfatidilinositol 3-fosfato. Esta via é de crucial importância em diversos processos, entre eles, reparo de DNA, proliferação e diferenciação celular, controle do ciclo celular e resposta inflamatória e imunológica (SONG et al., 2005).

O gene RARRES1 foi identificado como um gene responsivo ao ácido retinóico e ao tazaroteno e codifica uma proteína de membrana do tipo 1. Observou-se a diminuição de sua expressão em câncer de próstata (YOUSSEF et al., 2004), ao passo que em mesoteliomas malignos, seus níveis de expressão estavam aumentados (MOHR et al., 2004).

Por último, SOD2 ou Superóxido Dismutase 2, pertence a uma família de enzimas que catalizam a conversão de radicais superóxido a oxigênio molecular. Sua função é destruir os radicais produzidos normalmente nas células e que são tóxicos aos sistemas biológicos. Vários estudos indicam que a expressão deste gene é regulada pelo TNF via o fator NF- $\kappa$ B (DELHALLE et al., 2002; DJAVAHERI-MERGNY et al., 2004).

No presente estudo observamos a modulação diferencial destes genes nas células sensíveis ao TNF. Por outro lado, na linhagem HF18Nco estes genes não variaram da mesma forma. Torna-se necessária a

validação destes genes nas amostras analisadas, para eventuais conclusões.

### **6.2.2 Seleção de genes através das listas comparativas**

A literatura adotou como rotina, a seleção de genes que apresentam variações de expressão de duas vezes ou mais, quando dois conjuntos de dados são comparados. Vale a pena ressaltar que, este critério não leva em consideração nenhum valor estatístico que sugira a probabilidade de que tal diferença seja uma associação real com um fenômeno biológico ou estímulo. Por isso, optamos em ordenar os genes mais diferencialmente expressos entre duas amostras, considerando-se o p-valor nominal para cada gene, além da razão de expressão. Esta abordagem tem a vantagem de considerar a variância dos dados comparados, eliminando a probabilidade de selecionar genes cuja expressão diferencial seja um artefato. Esta opção foi previamente discutida e justificada pela impossibilidade de aplicar métodos estatísticos mais rigorosos, tendo em vista o desenho experimental. No que se refere à determinação dos p-valores, vale a pena ressaltar, que há uma intensa discussão sobre o ajuste ou não destes valores, tendo em vista o grande número de testes realizados. Assim sendo, estes valores deverão ser considerados com cautela.

Para facilitar a associação dos genes diferencialmente expressos à determinados processos biológicos, listas de genes presentes nas nossas lâminas, foram agrupados funcionalmente, segundo o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)). Nas análises

realizadas neste estudo, foi constatada uma expressão diferencial global, envolvendo genes relacionados aos mais diversos processos biológicos. Como esperado, foram identificados genes relacionados à diferenciação e morte celular, proliferação, inflamação, resposta imune, remodelamento da matriz extracelular, reparo e metabolismo em geral, entre outros.

Quando comparamos os queratinócitos normais às células imortalizadas por HPV, observamos que a presença do vírus está associada à expressão diferencial de genes envolvidos em toda gama de processos celulares (**ANEXO 1, comparações 1,2,4 e 5**). No entanto, quando comparamos o efeito do tratamento com TNF, observamos principalmente a alteração na expressão de genes associados à morte e diferenciação celular, regulação do ciclo celular, resposta imune e inflamatória (**ANEXO 1, comparações 10, 11, 13, 14, 16 e 17**).

Por tanto, visando elucidar possíveis interferências do HPV na resposta ao TNF, optamos por avaliar apenas genes associados a apoptose, regulação do ciclo celular e citocinas dentre os genes diferencialmente expressos nas 24 comparações.

A lista dos genes selecionados e suas funções é apresentada na **tabela 4**. A partir desta **tabela**, foram elaborados diversos diagramas de Venn visando identificar os genes comuns modulados entre as comparações (**figuras 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33**). A **tabela 5** sumariza os genes contidos nos diagramas de Venn incluindo um resumo de suas funções.

Dentre esses genes, observamos que o aumento na expressão de CSF2RB, CCL20, IL6ST e MCM2 está associada à presença do HPV (**figuras 27 e**

30). Destaca-se o gene CCL20 pelo fato de ser regulado positivamente pelo tratamento com TNF por 3 horas em todas as linhagens estudadas, principalmente na linhagem HF698 (**figuras 28 e 29**).

A proteína CCL20 foi inicialmente caracterizada como uma quimiocina induzida em diversos tipos celulares, tanto de forma constitutiva, como de forma induzida, dependendo da condição das células. Sua expressão constitutiva foi inicialmente observada em fígado, mas atualmente sabe-se que esta citocina é produzida por diversos tipos celulares. Esta proteína tem uma forte ação quimiotática para células dendríticas imaturas na epiderme (que expressam o receptor CCR-6). Em pele e mucosas, esta proteína é constitutivamente expressa em baixos níveis de expressão, mas sua expressão é estimulada pelo TNF e IL-1, além de infecções e trauma (TOHYAMA et al., 2001, SCHUTYSER et al., 2003). Geralmente CCL20 é detectada nas camadas mais diferenciadas do epitélio (camada espinosa).

Interessantemente, o gene NFKBIA, ou seja, o gene que origina a proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , tem sua expressão aumentada nas células PHK e HF18Nco, tratadas por 60 horas com TNF. Podemos inferir que nas células normais, o fator NF- $\kappa$ B estaria induzindo a expressão do gene NFKBIA, seu inibidor, caracterizando o processo de retroalimentação negativa. Por outro lado, nas células HF18Nco, este gene poderia estar constantemente ativado por algum mecanismo inerente à presença das oncoproteínas virais do HPV18. Vale a pena lembrar que esta linhagem não responde efetivamente aos estímulos mediados pelo TNF e que nas análises de Western Blot realizadas

neste estudo, os níveis de expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , eram maiores do que em todas as amostras analisadas (**figura 6**).

Portanto, a elucidação de possíveis interferências mediadas pelo HPV nos mecanismos moleculares que determinam e controlam a ação do TNF, poderiam levar ao desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas, incluindo a inflamação crônica e o câncer do colo uterino. Além disso, uma investigação mais profunda da expressão diferencial dos genes obtida neste estudo, poderia promover a caracterização de marcadores moleculares associados às lesões com maior propensão de progredirem para o câncer cervical.

## 7 CONCLUSÕES

A diferença nos níveis de expressão de  $I\kappa B\alpha$ , mostra que existem alterações na via de ativação de NF- $\kappa$ B, entre as linhagens sensíveis e resistentes ao TNF. Além disso, foi detectada uma banda induzida tardiamente pelo TNF em queratinócitos normais e de forma constitutiva em linhagens imortalizadas por HPV e em culturas organotípicas transduzidas com E6 e E7 de HPV18. O mesmo efeito não é observado na linhagem HF18Nco.

Os dados gerados por ANOVA, indicaram que as diferenças entre os tipos celulares e o tempo de tratamento/cultivo, são mais significativas que aquelas geradas em resposta ao TNF.

Após tratamento de 3 horas com TNF, a resposta dos queratinócitos imortalizados por HPV, se diferencia da dos queratinócitos normais. Por outro lado, após tratamento por 60 horas, a resposta das linhagens sensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF, se diferencia da linhagem resistente.

Conforme esperado, a resposta dos queratinócitos normais, ao tratamento com TNF por 3 ou 60 horas, os diferencia das outras linhagens.

Foram identificados grupos de genes comuns, diferencialmente expressos, entre as células sensíveis ao efeito antiproliferativo mediado pelo TNF (NHFK e HF698) e aquelas resistentes (HF18Nco), após 3 e 60 horas de tratamento.

A confirmação e análise dos níveis de expressão destes genes, entre outros, poderão contribuir para o entendimento da progressão tumoral associada ao HPV, além de elucidar mecanismos moleculares que governam a interação HPV-TNF.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W B Saunders; 2003.

Abrantes EF, Pires EG, Carvalho AF, Costa FF, Savino W, Reis LF. Identification, structural characterization, and tissue distribution of Tsg-5: a new TNF-stimulated gene. **Genes Immunol** 2003; 4:298-311.

Ahn WS, Bae SM, Lee JM, et al. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. **Gynecol Oncol** 2004; 93:41-8.

Androphy EJ. Molecular biology of human papillomavirus infections and oncogenesis. **J Invest Dermatol** 1994; 103:248-56.

Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nature Genet** 1994; 6:157-62.

Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. **Hum Pathol** 1990; 21:686-98.

Arroyo M, Bagchi S. Raychaudhuri association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-Cyclin: a complex. **Mol Cell Biol** 1993; 13:6537-46.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu Rev Immunol** 1996; 14:649-83.

Baldwin AS, Jr. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. **J Clin Invest** 2001; 107:241-6.

Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. **J Biol Chem** 2004; 279:32633-42.

Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. **Oncogene** 1989; 4:1529-32.

Barnard P, Mcmillan NAJ. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- $\alpha$ . **Virology** 1999; 259:305-13.

Barnard P, Payne E, McMillan NA. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. **Virology** 2000 277:411-9

Bartholomew JS, Stacey SN, Coles B, Burt DJ, Arrand JR, Stern L. Identification of a naturally processed HLA A0201-restricted viral peptide from cells expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **Eur J Immunol** 1994; 24:3175-9.

Basile JR, Zacny V, Munger K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (tnf-alpha) and tnf-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 e7 oncoprotein. **J Biol Chem** 2001; 276:22522-8

Bedell MA, Jones KH, Grossman SR, Laimins LA. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. **J Virol** 1989; 63:1247-55.

Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med** 2002; 8:816-24.

Belbin TJ, Singh B, Barber I, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. **Cancer Res** 2002; 62:1184-90.

Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. **Nat Immunol** 2002; 3:20-6.

Berezutskaya E, Bagchi S. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. **J Biol Chem** 1997; 272:30135-40.

Bernard HU, Chan SY, Delius H. Evolution of papillomaviruses. **Curr Top Microbiol Immunol** 1994; 186:33-54.

Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cathetin/tumor necrosis factor: production distribution and metabolic fate in vivo. **J Immunol** 1985; 135:3972-7.

Beutler BA, Cerami A. Cathetin: more than a tumor necrosis factor. **N Engl J Med** 1987; 316:379-85.

Boccardo E. **Efeito do fator de necrose tumoral-Alfa (TNF- $\alpha$ ) sobre células imortalizadas por papilomavírus humano (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-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology** 2004; 328:233-43.

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

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:796-802.

Bosch FX, Muñoz N, de Sanjose S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. **Biomed Pharmacother** 1997; 51:268-75.

Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. **EMBO J** 1994; 13:5451-9

Bowtell D, Sambrook JT. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2004**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, et al. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. **EMBO J** 1999; 18:2449-58.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

Broker TR. Structure and genetic expression of papillomavirus. **Obstet Gynecol Clin North Am** 1987; 14:329-47.

Brown DR, Fife KH. Human papillomavirus infections of the genital tract. **Med Clin North Am** 1990; 74:1455-85.

Camargo AA, Samaia HP, Dias-Neto E, et al. The contribution of 700000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:12103-8.

Cappiello G, Garbuglia AR, Salvi R, et al. HIV infection increases the risk of squamous intra-epithelial lesions in women with HPV infection: an analysis of HPV genotypes DIANAIDS Collaborative Study Group. **Int J Cancer** 1997; 72:982-6.

Carvalho AF, Neves EJ, Hirata R Jr, Reis LFL. Glass slide-based agarose gel electrophoresis for determining the efficiency of RNA amplification and cyanine dye incorporation during RNA labeling. **Biotechniques** 2003; 35:688-92.

Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. **J Virol** 1989; 63:3261-9.

Chang AA, Van Waes C. Nuclear factor-KappaB as a common target and activator of oncogenes in head and neck squamous cell carcinoma. **Adv Otorhinolaryngol** 2005; 62:92-102.

Chang YE, Laimins LA. Interferon-inducible genes are major targets of human papillomavirus type 31: insights from microarray analysis. **Dis Markers** 2001; 17:139-42.

Chang YE, Laimins LA. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. **J Virol**. 2000; 74(9):4174-82

Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. **J Biol Chem** 1999; 274:23358-67.

Chen JJ, Reid CE, Band Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoprotein with a putative calcium-binding protein. **Science** 1995; 269:529-31.

Chen M, Popescu N, Woodworth C, et al. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. **J Virol** 1994; 68:1173-8.

Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. **Genes Dev** 1995; 9:2335-49.

Chow LT, Broker TR. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. **Clin Dermatol** 1997; 15:217-27.

Cromme FV, Meijer CJ, Snijders PJ, et al. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. **Br J Cancer** 1993; 67:1372-80.

Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be target by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell** 1991; 67:547-56.

Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. **J Virol** 1993; 67:2521-8.

Delhalle S, Deregowski V, Benoit V, Merville MP, Bours V. NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis. **Oncogene** 2002; 21:3917-24.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virology** 2004; 324:17-27.

Desaintes C, Hallez S, Van Alphen Burny A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. **J Virol** 1992; 66:325-33.

Djavaheri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J, Besancon F. NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. **FEBS Lett** 2004; 578:111-5.

Dong Y, Kaushal A, Brattsand M, Nicklin J, Clements JA. Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1710-20.

Downen SE, Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, et al. Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer. **Am J Pathol** 2005; 166:81-92.

Duffy CL, Phillips SL, Klingelhutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. **Virology** 2003; 314:196-205.

Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 in benign and malignant genital tumors. **J Gen Virol** 1985; 66:1515-22.

Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp Fusenig NE, Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. **Oncogene** 1987; 1:251-6.

Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. **Virology** 1992; 189:132-40.

Dyson N, Howley M, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science** 1989; 243:934-7.

Evander M, Edlund K, Gustafsson A, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population based cohort study. **J Infect Dis** 1995; 171:1026-30.

Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. **J Virol** 1977; 2:1210-4.

Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2002; 277:21730-9.

Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. **J Virol** 2000; 74:6622-31

Franco EL, Villa LL, Richardson H, Rohan T, Ferenczy A. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In: Franco EL, Monsonogo J, editors. **New developments in cervical cancer and prevention**. London: Blackwell Science; 1997. p.14-22. (WHO/EUROGIN monograph)

Franco EL, Villa LL, 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. **Pan Am Health Organ J** 1999; 6:223-32.

Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and keratinocyte activation Cycle. **J Dermatol** 2001; 116:633-40.

Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques** 2000; 29:1042-55.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes Dev** 1997; 11:2090-100.

Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein E6TP1 and target it for degradation. **Mol Cell Biol** 1999; 19:733-44.

Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene** 2000; 19:4930-5.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell** 2002; 109 Suppl:S81-96.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science** 1999; 286:531-7.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, Cristo EB, et al. Comparative analysis of amplified and non-amplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

Gröne A. Keratinocytes and cytokines. **Vet Immunol Immunopathol** 2002; 88:1-12.

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J Virol** 1991; 65:473-8.

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. **J Virol** 1992; 66:2125-34.

Hawthorn RJS, Murdoch JB, Mac Lean AB, Mackie RM. Langerhans cells and subtypes of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. **Br Med J** 1988; 297:643-6.

Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, et al. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli. **J Immunol** 2004; 172:4535-44.

Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:464-74.

Hilders CGJM, Houbiers JGA, Van Ravenswaay Claasen HH, Veldhuizen RW, Fleuren GJ. Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma. **Lab Invest** 1993; 69:651-9.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt E, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **J Infect Dis** 1994; 9:235-40.

Ho GY, Burk R, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1365-71.

Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. **Cancer Res** 1999; 59:4525-8.

Howley M. **Fundamental virology**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. Papillomavirinae: the viruses and their replication; p.947-78.

Hu Y, Baud V, Delhase M, et al. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. **Science** 1999; 284:316-20.

Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. **Nature** 2001; 410:710-4.

[IARC] International Agency for Research on Cancer-World Health Organization. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses**. Lyon: Human papillomavirus 2005. Available from: <URL:<http://www-dep.iarc.fr/>> [2005 maio 12].

Jablonska S, Majewski S. Immunology of genital papillomavirus infections. In: Gross G, Jablonska S, Pfister H, Stegner HE, editors. **Genital papillomavirus infection**. New York: Springer-Verlag; 1990. p.263.

Jenson AB, Kurman RJ, Lancaster WD. Tissue effects and host response to human papillomavirus infection. **Obstet Gynecol Clin North Am** 1987; 14:397-406.

Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. **Genes Dev** 1997; 11:2101-11.

Kanda T, Watanabe S, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. **Virology** 1988; 165:321-5.

Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signaling. **Semin Immunol** 2000; 12:85-98.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. **Annu Rev Immunol** 2000; 18:621-63.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Rev Cancer** 2002; 2:301-10.

Karin M, Yamamoto Y, Wang MG. The IKK NF- $\kappa$ B system: a treasure trove for drug development. **Nat Rev** 2004; 3:17-26.

Kast WM, Brandt RM, Sidney J, et al. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. **J Immunol** 1994; 152:3904-12.

Kaur P, McDougall JK. Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. **J Virol** 1988; 62:1917-24.

Kilk A, Talpsepp T, Vali U, Ustav M. Bovine papillomavirus oncoprotein E5 induces the NF kappa B activation through superoxide radicals. **Biochem Mol Biol Int** 1996; 40:689-97.

Kiviat NB, Critshlow CW, Holmes KK, et al. Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. **AIDS** 1993; 7:43-9.

Kiyono T, Hiraiea A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila disc large tumor suppressor protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:11612-6.

Klingelhutz AJ, Foster AS, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature** 1996; 380:79-81.

Komine M, Rao LS, Kaneko T, et al. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. **J Biol Chem** 2000; 275:32077-88.

Koromilas AE, Li S, Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine Growth Factor Rev** 2001; 12:157-70.

Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **N Engl J Med** 1992; 327:1272-8.

Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. **Virology** 1994; 200:130-9.

Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? **Nat Rev Cancer** 2001; 1:151-7.

Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA by human papillomavirus E6 proteins. **J Virol** 1994; 68:4262-73.

Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Sauer G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. **J Gen Virol** 1988; 69:187-96.

Levine AJ. p53 the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31.

Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH, Colburn NH. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppress anchorage independent growyh of HPV immortalized human keratinocytes. **Oncogene** 1998; 16:2711-21.

Li XH, Murphy M, Palka KT, Surabhi RM, Gaynor RB. The Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein regulates the activity of IKK kinase complex. **J Biol Chem** 1999; 274:34417-24.

Liu X, Han S, Baluda MA, Park N. HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes. **Oncogene** 1997; 14:2347-53.

Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Gynecol** 1992; 79:328-37.

Luff RD. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda workshop. The Bethesda System Editorial Committee. **Hum Pathol** 1992; 23:719-21.

Lunger TA, Kock A, Danner M. Production of distinct cytokines by epidermal cells. **Br J Dermatol** 1985; 113:145-56.

Maciag C, Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz J Med Biol Res** 2000; 32:915-22.

Martin AG, San-Antonio B, Fresno M. Regulation of nuclear factor kappa B transactivation. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in c-Rel activation by tumor necrosis factor alpha. **J Biol Chem** 2001; 276:15840-9.

Massimi Pim D, Banks L. HPV-16 E7 and adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein kinase II phosphorylation. **Oncogene** 1996; 12:2325-30.

Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. **EMBO J** 1987; 6:1741-6.

Meireles SI, Carvalho AF, Hirata R, et al. Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array. **Cancer Lett** 2003; 190:199-211.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Mohr S Bottin MC Lannes B et al. Microdissection mRNA amplification and microarray: a study of pleural mesothelial and malignant mesothelioma cells. **Biochimie** 2004; 86:13-9.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, et al. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately down regulated in human diabetes. **Nat Genet** 2003; 34:267-73.

Münger K, Phelps WC, Bubb Howley M, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **J Virol** 1989; 63:4417-21.

Muñoz N, Bosch FX. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. **Bull Pan Am Health Organ** 1996; 30:362-77.

Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunagaran D. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. **Oncogene** 2003; 22:50-8.

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** 2001; 75:4283-96.

Nickoloff BJ, Turka LA. Keratinocytes key immunocytes of the integument. **Am J Pathol** 1993; 143:325-31.

Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. **Lancet** 1999; 354:20-5.

O'Connor M, Apt D, Bernard HU. DNA tumor viruses: papilloma. In: Bertino JR, editor. **Encyclopedia of cancer**. San Diego: Academic Press; 1997. p.520-31.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene** 1999; 18:6853-66.

Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Ahn DK, Greenspan JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. **Cancer Res** 1991; 51:1014-9.

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

Petry KU, Scheffel D, Bode U, et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. **Int J Cancer** 1994; 57:836-40.

Pillai S, Bikle DD, Eessalu TE, Aggarwal BB, Elias M. Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes. **J Clin Invest** 1989; 83:816-21.

Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. **Oncogene** 1992; 7:27-32.

Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. **J Virol** 1987; 61:1061-6.

Pirisi L, Creek KE, Doniger J, DiPaolo JA. Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. **Carcinogenesis** 1988; 9:1573-9.

Pirisi L, Zyzak LL, Geslani G, Creek KE. In vitro progression of HPV16-immortalized human keratinocytes is associated with a progressive loss of sensitivity to growth inhibition by retinoic acid and transforming growth factor-beta. In: **Anais** do 14<sup>th</sup> International Papillomavirus Conference; 1995; Quebec (CA) 1995. p.166.

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int J Cancer** 2002; 97:72-81.

Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. **Science** 1998; 280:248-53.

Pol A, Pfundt R, Zeeuwen P, Molhuizen H, Schalkwijk J. Transcriptional regulation of the elafin gene in human keratinocytes. **J Invest Dermatol** 2003; 120:301-7.

Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. **Nature** 2002; 415:436-42.

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. **Nat Rev Genet** 2001; 2:418-27.

Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, Howley PM. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. **J Virol** 1991; 65:2739-44.

Ronco L, Karpova AY, Vidal M, Howley M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev** 1998; 12:2061-72.

Rösl F, Lengert M, Albrecht J, et al. Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids. **J Virol** 1994; 68:2142-50.

Rothe J, Gehr G, Loetscher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors: structure and function. **Immunol Res** 1992; 11:81-90.

Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:469-76.

Rozendaal L, Walboomers JMM, van den Linden JC, et al. PCR-based high risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytologically normal cervical smears. **Int J Cancer** 1996; 68:766-9.

Rubin BY, Anderson SL, Sullivan AS, Williamson BD, Carswell EA, Old LJ. Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. **J Exp Med** 1986; 164:1350-5.

Ruesch MN, Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. **J Virol** 1997; 71:5570-8.

Sadovnikova E, Strauss HJ. T cell epitops in human papillomavirus proteins Behring. **Inst Mitt** 1994; 94:87-93.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Santin AD, Cane' S Bellone S, Bignotti E et al. The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. **Gynecol Oncol** 2004; 94:283-8.

Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-kB and virus infection: who controls whom. **EMBO J** 2003, 11:2552-60.

Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, et al. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. **Clin Cancer Res** 2001; 7:4136-42.

Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Goggins M. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. **Oncogene** 2004; 23:1531-8.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell** 1990; 63:1129-36.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell** 1993; 75:495-505.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:958-64.

Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, Lowy DR. The E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. **J Virol** 1986; 57:1-6.

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

Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa MS. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities on human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinomas. **EMBO J** 1988; 7:3181-7.

Schoenfeld HJ, Poeschl B, Frey JR, et al. Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from E coli yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both TNF receptors. **J Biol Chem** 1991; 266:3863-9.

Schuttyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. **Cytokine Growth Factor Rev** 2003; 14:409-26.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequence in cervical carcinoma cells. **Nature** 1985; 314:111-4.

Seeler JS, Dejean A. Nuclear and unclear functions of SUMO. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2003; 4:690-9.

Segal E, Shapira M, Regev A, et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. **Nat Genet** 2003; 34:166-76.

Segal E, Friedman N, Kollerr D, Regev A. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. **Nat Genet** 2004; 36:1090-98.

Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:2307-12.

Seitz CS, Deng H, Hinata K, Lin Q, Khavari PA. Nuclear factor kappaB subunits induce epithelial cell growth arrest. **Cancer Res** 2000; 60:4085-92.

Sherlaw-Johnson C, Gallivan S, Jenkins D. Evaluating cervical cancer screening programmes for developing countries. **Int J Cancer** 1997; 72:210-6.

Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. **Int J Cancer** 2005 Mar 8; [Epub ahead of print]

Sitwala KV, Adams K, Markovitz DM. YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter. **Oncogene** 2002; 21:8862-70.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **J Cell Mol Med** 2005, 9(1):59-71.

Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer zur Hausen H, Rösl F. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF- $\alpha$  mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. **Oncogene** 1999; 18:3187-8.

Southern E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. **Nat Genet** 1999; 21(1 Suppl):5-9.

Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. **J Clin Invest** 1997; 100:2952-60.

Spitkovsky D, Hehner SP, Hofmann TG, Moller A, Schmitz ML. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. **J Biol Chem** 2002; 277:25576-82.

Steenbergen RD, Parker JN, Isern S, et al. 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** 1998; 72:749-57.

Stolf BS, Carvalho AF, Martins WK, et al. Differential expression of IGFBP-5 and two human ESTs in thyroid glands with goiter, adenoma and papillary or follicular carcinomas. **Cancer Lett** 2003; 191:193-202.

Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature** 1998; 393:229-34.



Szatmáry Z. Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. **Neoplasma** 1999; 46:257-66.

Talieri M, Diamandis EP, Gourgiotis D, Mathioudaki K, Scorilas A. Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. **Thromb Haemost** 2004; 91:180-6.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Paladino MA, Goeddel D. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular response. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:9292-6.

Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel D. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. **Cell** 1993; 73:213-6.

Tay SK, Jenkins D, Maddox Campion M, Singer A. Subpopulation of Langerhans' cells in cervical neoplasia. **Br J Obstet Gynecol** 1987; 94:10-5.

Termini L. **Expressão diferencial de genes em células imortalizadas por papilomavírus humano expostas ao TNF $\alpha$** . São Paulo, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências). Curso de Pós-Graduação Fundação Antônio Prudente.

Thierry F, Yaniv M. The BPV1 E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region. **EMBO J** 1987; 6:3391-7.

Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. **J Gen Virol** 1999; 80:1513-7.

Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, et al. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. **Oncogene** 2001; 20:3629-40.

Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. **Cell** 1995; 80:573-82.

Tizard IR. Immunity at body surfaces. **Vet Immunol** 2000; 222-34.

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

Tong X, Howley M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxilin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:4412-7.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. **Nature** 2002; 420:853-9.

Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. **EMBO J** 1994; 13:5433-41.

Uhlik M, Good L, Xiao G, et al. NF-kappaB-inducing kinase and I kappa B kinase participate in human T-cell leukemia virus I tax-mediated NF-kappaB activation. **J Biol Chem** 1998; 273:21132-6.

Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Lett** 2002; 179:205-12.

van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. **Cancer Res** 1999; 59:3299-303.

Vancurova I, Wu R, Miskolci V, Sun S. Increased p50/p50 NF-kappaB activation in human papillomavirus type 6- or type11-induced laryngeal papilloma tissue. **J Virol** 2002; 76:1533-6.

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappaB family: intimate tales of association and dissociation. **Genes Dev** 1995; 9:2723-35.

Vieira KBL, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor  $\alpha$  interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. **Cancer Res** 1996; 56:2452-7.

Villa LL, Franco EL. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:332-40.

Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. **Virology** 1991; 181:374-7.

Villa LL, Vieira KBL, Pei X, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. **Mol Carcinog** 1992; 6:5-9.

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

Vousden KH, Doniger J, Di Paolo JA, Lowy DR. The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. **Oncogene Res** 1988; 3:167-75.

Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. **Int J Biochem Cell Biol** 2001; 33:19-32.

Walboomers JM, Jacobs M, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanism. **Annu Rev Immunol** 1999; 17:331-67.

Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. **Clin Cancer Res** 1999; 5:119-27.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415:530-6.

Watanabe S, Kanda T, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. **J Virol** 1989; 63:965-9.

Winkelstein WJ. Smoking and cervical cancer: current status: a review. **Am J Epidemiol** 1990; 131:945-60.

Wong GHW, Tartaglia LA, Lee MS, Goeddel D. Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type 1 TNF receptor. **J Immunol** 1992; 149:3550-3.

Woodworth CD, Waggoner S, Barnes W, Stoler MH, DiPaolo JA. Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vivo. **Cancer Res** 1990; 50:3709-15.

Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. Domain-specific interaction with the ikappaB kinase (IKK) regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK. **J Biol Chem** 2000; 275:34060-7.

Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, et al. Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. **Cancer Res** 2004; 64:2411-7.

Zhang W, Laborde PM, Coombes KR, Berry DA, Hamilton SR. Cancer genomics: promises and complexities. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2159-67.

Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele Oehen S, Kündig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunol Rev** 1997; 156:199-209.

zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochem Biophys Acta** 1996; 1288:55-78.

zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:690-8.

Zwerschke W, Mazurek S, Massimi Banks L, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:1291-6.

***ANEXO***

---

**Anexo 1** - Lista dos genes diferencialmente expressos nas 24 comparações

COMPARAÇÃO: PHK\_3 / H16\_3

p valor <0,0001

Nome do Gene	Razão de expressão (log <sub>2</sub> )	NOME DO GENE
301	-1.78	hypothetical protein FLJ11301
.	-1.20	splicing factor 3b, subunit 4
T5	1.74	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
3	3.79	potassium channel, subfamily K, member 6
	0.45	NCK adaptor protein 2
	1.81	phosphoglucomutase 1
	-2.37	glycine dehydrogenase (decarboxylating; glycine decarboxylase, glycine cleavage system protein P)
	1.20	polymerase (DNA directed) sigma
i851	1.90	chromosome 15 open reading frame 24
A6	1.02	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
11	4.27	protease, serine, 11 (IGF binding)
	1.41	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
	1.69	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog
	-2.09	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)
	-6.60	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C
PB	-1.19	chromosome 2 open reading frame 30
	2.53	ribosomal protein L15
11	3.20	ankyrin repeat domain 11
	1.28	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
	1.98	solute carrier family 38, member 2
F4	-6.59	chemokine-like factor super family 4
	2.26	signal recognition particle 72kDa
3P2	-3.79	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
2	-0.62	zinc finger protein 262
3	0.93	zinc finger protein 266
	-5.38	exostoses (multiple)-like 2

**COMPARAÇÃO: PHK\_3 / H18\_3**

p valor <0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
E2	-6.89	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
	-3.33	B-cell CLL/lymphoma 3
2	-1.90	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52
	-5.84	lipocalin 7
3	-6.69	cyclin M3
	-6.16	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C
	-1.85	ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)
15	-6.30	potassium channel tetramerisation domain containing 15
	-6.38	G protein-coupled receptor kinase interactor 1
IF4	-6.26	chemokine-like factor super family 4
	-1.90	upstream binding protein 1 (LBP-1a)
700	-4.33	hypothetical protein FLJ10700
	-3.15	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
	-2.80	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinasase)
	-1.61	ADP-ribosylation factor 4-like
9	-3.85	sperm associated antigen 9
i	-0.95	surfeit 5
	0.67	membrane interacting protein of RGS16

**COMPARAÇÃO: H16\_3 / H18\_3**

p valor <0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
3	-1.47	chromosome 6 open reading frame 48
5(garr	-6.16	SPTF-associated factor 65 gamma
.2	1.03	target of myb1-like 2 (chicken)
	-1.23	spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome)

COMPARAÇÃO: PHK\_60 / H16\_60

p valor <0,0001

Nome	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
511	2.85	hypothetical protein FLJ21511
1	2.48	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
SH	-1.06	suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae)
32	-1.69	lactamase, beta 2
	-2.19	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
	-1.41	transferrin receptor (p90, CD71)
3	-1.41	cytochrome c oxidase subunit VIIIb
9	-2.15	interferon-induced protein 44
	2.16	ornithine decarboxylase 1
SA	1.54	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)
	0.63	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
	-1.55	mesoderm specific transcript homolog (mouse)
	1.77	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
1	-1.69	TSPY-like 1

COMPARAÇÃO: PHK\_60 / H18\_60

p valor <0,0001

Nome do Gene	Log2 de expressão	Nome do Gene
	-2.09	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
	-2.33	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
	-2.45	fibroblast activation protein, alpha
IF6	2.22	chemokine-like factor super family 6
C1	-1.18	RUN domain containing 1
3	-4.22	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
	2.13	ornithine decarboxylase 1
	-4.26	latexin
851	-1.63	chromosome 15 open reading frame 24
	-1.86	mal, T-cell differentiation protein 2
	-1.44	Ufm1-conjugating enzyme 1
	2.37	chloride channel, calcium activated, family member 4
9642	-2.15	O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 2
	-3.37	activating transcription factor 7
333	-0.65	hypothetical protein FLJ34633
	-1.38	protein 7 transactivated by hepatitis B virus X antigen (HBxAg)
A1	-1.99	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 1
111	1.95	hypothetical protein FLJ21511
P1	3.68	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1
	-2.71	peripheral myelin protein 22
	-2.57	interleukin 4 receptor
	-1.57	tumor suppressing subtransferable candidate 1
	1.47	chloride intracellular channel 4
1	1.36	Nedd4 family interacting protein 1
1	-2.01	TSPY-like 1
5(garr	-6.17	SPTF-associated factor 65 gamma
	2.34	cullin 4A
	-1.53	transferrin receptor (p90, CD71)
5	-1.74	zinc finger protein 335
	2.02	cadherin 18, type 2
29	-2.23	KIAA1529
	-2.91	signal seq. receptor, delta (translocon-associated protein delta)
12	1.80	Notch homolog 2 (Drosophila)
1	1.25	centaurin, delta 1
	-3.04	kallikrein 8 (neuropsin/ovasin)
	-1.25	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)
1	2.01	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
3P1	-1.02	protein kinase C binding protein 1
	-1.66	cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10
	-2.15	mitochondrial translation optimization 1 homolog (S. cerevisiae)
	-2.90	potassium channel, subfamily K, member 6
	1.00	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle
	2.40	sarcolemma associated protein
	-1.76	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)

	-2.20	exportin 7
IA9	-1.54	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9
i7	-2.29	family with sequence similarity 46, member A
	-0.93	RNA terminal phosphate cyclase-like 1
853	0.83	KIAA0853
A3	-0.68	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3
A3	-1.90	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3
	-4.79	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)
3	2.45	methionine adenosyltransferase II, beta
1	1.85	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1
H3	1.53	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)
3	-1.15	cytochrome c oxidase subunit VIIb
	-2.08	BENE protein
3	0.79	hect domain and RLD 3
H1	-1.74	suppressor of Ty 4 homolog 1 (S. cerevisiae)
	-1.38	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)

#### COMPARAÇÃO: H16\_60 / H18\_60

p valor <0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	-3.82	latexin
3	2.97	interferon-induced protein 44
5(garr	-6.30	SPTF-associated factor 65 gamma
	-0.72	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
3642	-1.27	O-acyltransferase (membrane bound) domain containing
P1	-0.86	protein kinase C binding protein 1
1	-1.66	YME1-like 1 (S. cerevisiae)
2B	0.51	chromosome 2 open reading frame 30

#### COMPARAÇÃO: PHK\_3 / PHK\_60

p valor <0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
6	-2.27	chemokine-like factor super family 6
	-3.09	peroxisome proliferative activated receptor, alpha
4	-7.19	chemokine-like factor super family 4
P2	-4.08	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
	1.43	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
	-1.92	metastasis associated 1 family, member 2
1	1.24	RUN domain containing 1
5	-7.23	potassium channel tetramerisation domain containing 15
	-2.32	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
2	1.75	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
	-0.73	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide

**COMPARAÇÃO: H16\_3 / H16\_60**

p valor &lt;0,0001

Nome do Gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
247	-1.42	KIAA0247
118	-1.78	NEDD8 ultimate buster-1
	0.94	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
761	-1.26	ethanolamine kinase 2
2124	-4.56	hypothetical protein MGC32124
	-2.08	beta-2-microglobulin
1	-1.57	TSPY-like 1
173	-1.37	PRO1073 protein
	-1.40	OCIA domain containing 1
	0.91	surfeit 5
1	0.93	BCL2-like 1
130	-1.95	chromosome 14 open reading frame 130
	-2.00	interferon, gamma-inducible protein 16

**COMPARAÇÃO: H18\_3 / H18\_60**

p valor &lt;0,0001

Nome do Gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	-1.31	chromosome 6 open reading frame 48
	-2.09	cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10
	-3.87	latexin
	2.29	cathepsin C
	3.21	thrombospondin 1
	1.97	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1
	-1.73	Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes
	2.10	fibroblast growth factor binding protein 1
	-1.48	mitochondrial translation optimization 1 homolog (S. cerevisiae)
	-1.06	ubiquitin 1
1	1.68	collagen, type IV, alpha 1
	-2.70	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
	-0.93	Ufm1-conjugating enzyme 1
14	-0.99	chromosome 14 open reading frame 114
	1.35	chromosome 20 open reading frame

**COMPARAÇÃO: PHK\_3 / PHK\_T3**

p valor &lt;0,0001

Nome do gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
3F4	-6.16	chemokine-like factor super family 4
E2	-6.88	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
3P2	-3.16	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
	-1.57	integrin, alpha 6
λ	-2.80	peroxisome proliferative activated receptor, alpha
	-3.40	B-cell CLL/lymphoma 3
	-1.78	desmocollin 3
011	2.45	ankyrin repeat domain 11
700	-4.31	hypothetical protein FLJ10700
5	-1.43	nucleoporin 205kDa
5	-6.25	potassium channel tetramerisation domain containing 15
3	-6.68	cyclin M3
120	-3.65	chromosome 14 open reading frame 120
	-6.09	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C
	-6.29	G protein-coupled receptor kinase interactor 1
	-5.82	lipocalin 7
	-3.81	sperm associated antigen 9
λ	-2.07	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
	-3.09	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
	-3.84	kallikrein 2, prostatic
	-5.62	very low density lipoprotein receptor

**COMPARAÇÃO: PHK\_60 / PHK\_T60**

p valor &lt;0,0001

Nome do gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
488	0.68	THAP domain containing, apoptosis associated protein 3
	1.71	mal, T-cell differentiation protein 2
	-2.42	superoxide dismutase 2, mitochondrial
	-2.30	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

**COMPARAÇÃO: PHK\_T3 / PHK\_T60**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log <sub>2</sub> )	NOME DO GENE
511	-1.83	hypothetical protein FLJ21511
	1.59	splicing factor, arginine/serine-rich 3
	-1.29	PP784 protein
21	1.87	RUN domain containing 1
2	0.89	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
EF10	0.94	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10
	-0.57	hect domain and RLD 3
A9	1.10	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9
	1.26	fibroblast growth factor binding protein 1
06	2.24	thioesterase domain containing 1
	-0.96	serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)
	1.39	carbonic anhydrase XIV
	0.83	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform
	1.12	endoplasmic reticulum thioredoxin superfamily member, 18 kDa

**COMPARAÇÃO: H16\_3 / H16\_T3**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log <sub>2</sub> )	NOME DO GENE
	-1.93	chemokine (C-C motif) ligand 20

**COMPARAÇÃO: H16\_60 / H16\_T60**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log <sub>2</sub> )	NOME DO GENE
	-2.029659266	superoxide dismutase 2, mitochondrial

**COMPARAÇÃO: H16\_T3 / H16\_T60**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log <sub>2</sub> )	NOME DO GENE
	3.27	chemokine (C-C motif) ligand 20
	-1.62	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
6	1.82	timeless-interacting protein
	2.75	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)
3	1.38	hypothetical protein FLJ13213
	1.96	natural killer-tumor recognition sequence
	-0.80	source of immunodominant MHC-associated peptides
34F1	1.45	DKFZP564F0522 protein
	0.98	exosome component 9
	1.42	centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)
	1.05	RAN binding protein 5

**COMPARAÇÃO: H18\_3 / H18\_T3**

p valor &lt;0,01

Nome do Gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	-1.12	chemokine (C-C motif) ligand 20
	0.17	poly(rC) binding protein 1

**COMPARAÇÃO: H18\_60 / H18\_T60**

p valor &lt;0,0001

Nome do Gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	-1.42	laminin, alpha 3
A3	-1.75	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3

**COMPARAÇÃO: H18\_T3 / H18\_T60**

p valor &lt;0,0001

Nome do Gene	Razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	2.13	chemokine (C-C motif) ligand 20
	-0.61	ataxin 2-binding protein 1
	1.19	Huntingtin interacting protein K
	-3.21	latexin
	-1.29	NSE1
P1	1.87	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 1
	-1.64	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
	1.54	chromosome 20 open reading frame 6
	-3.19	PCTAIRE protein kinase 3
	2.25	fibroblast growth factor binding protein 1
	-1.09	cysteinyl-tRNA synthetase
	-1.20	ubiquitin 1
	-2.30	G protein-coupled receptor 56
	1.04	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9
I	1.38	collagen, type IV, alpha 1
	-1.82	sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase) B
	1.07	lamin B receptor
	1.17	NO QUERY
	-1.26	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
	1.26	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)

COMPARAÇÃO: PHK\_T3 / H16\_T3

p valor <0,0001

Nome do Gene	Log2 de expressão	NOME DO GENE
310	1.18	KIAA0310
114	2.37	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
EF10	2.71	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10
	2.28	fibroblast growth factor binding protein 1
	2.42	trophoblast glycoprotein
R	1.90	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
1	4.71	protease, serine, 11 (IGF binding)
06	2.55	thioesterase domain containing 1
3	1.61	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform
88	2.84	hypothetical protein FLJ11588
	1.73	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 alpha, 35kDa
3619	1.92	hypothetical protein MGC12103
	3.31	integrin, alpha 6
	2.49	plasminogen activator, urokinase
	1.62	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)
	1.68	source of immunodominant MHC-associated peptides
	-1.83	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa
)	1.88	ring finger protein 130
	1.99	transmembrane channel-like 4
	2.06	FK506 binding protein 5
	-0.64	transmembrane protein 2
30	1.54	hypothetical protein PRO2730
351	2.14	chromosome 15 open reading frame 24
	3.94	chromosome 1 open reading frame 43
	-1.31	peroxisomal biogenesis factor 3
	2.41	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)
1	1.36	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
	2.28	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 2
	4.30	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
73	1.15	PRO1073 protein
	-0.62	active BCR-related gene
	-1.35	growth and transformation-dependent protein
	1.64	translation factor sui1 homolog
	1.15	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
	-2.69	enabled homolog (Drosophila)
11	1.35	hypothetical protein FLJ21511
	2.87	laminin, alpha 3
.1	1.61	suppressor of var1, 3-like 1 (S. cerevisiae)
	-2.13	poly (ADP-ribose) glycohydrolase
	1.36	LIM domain kinase 2
19.1	1.74	hypothetical protein DJ167A19.1
	-1.86	chemokine (C-C motif) ligand 20
	4.38	odd-skipped related 1 (Drosophila)
	1.60	zinc finger protein 90 homolog (mouse)
	-1.22	ACN9 homolog (S. cerevisiae)
	-2.77	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)

	1.64	phosphoglucomutase 1
	2.24	hypothetical protein H41
	1.45	microtubule-associated protein 4
	-1.68	pogo transposable element with ZNF domain
3	1.25	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)
R1	2.48	protein phosphatase 4, regulatory subunit 1
l661	-1.01	dpy-30-like protein
	1.90	cullin 1
111	-0.93	chromosome 20 open reading frame 111
lA3	1.73	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
434DC	1.08	SH3 domain protein D19
494	-0.68	KIAA0494 gene product
	-1.06	glutathione reductase
	-3.13	mal, T-cell differentiation protein 2
	1.14	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
	-1.24	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
i2	-1.86	lactamase, beta 2
	1.78	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
	-1.66	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene
4E	1.18	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence
	0.86	PP784 protein
!BPA	-0.92	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
l73	-0.99	sterile alpha motif domain containing 9
	-1.50	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3
	3.62	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
	2.10	lipopolysaccharide-induced TNF factor
	1.39	ADP-ribosylation factor 1
l	-0.80	nuclear receptor coactivator 1
:	0.99	fem-1 homolog c (C.elegans)
5714	-1.05	chromosome 17 open reading frame 32
	4.03	activating transcription factor 7
	-0.54	G protein pathway suppressor 1
586NI	2.26	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)
i71	-0.67	KIAA1671 protein
-l	-0.81	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
2B1	-1.18	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
	-0.72	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle
3	2.70	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)
89	-1.07	hypothetical protein FLJ13089
5	3.16	mitochondrial ribosomal protein S15

---

**COMPARAÇÃO: PHK\_T3 / H18\_T3**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
11	4.75	protease, serine, 11 (IGF binding)
	-3.76	mal, T-cell differentiation protein 2
	-2.04	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa
	1.65	fibroblast growth factor binding protein 1
	2.06	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
B	-1.14	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa
	-0.62	hexosaminidase B (beta polypeptide)
A3	0.68	solute carrier family 41, member 3
.1	-1.39	YME1-like 1 (S. cerevisiae)
	1.39	ornithine decarboxylase 1
5(garr	-4.79	SPTF-associated factor 65 gamma
!	1.09	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
3400	0.78	transcription elongation factor A (SII)-like 8

**COMPARAÇÃO: H16\_T3 / H18\_T3**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	1.72	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
5(garr	-5.54	SPTF-associated factor 65 gamma
361	0.92	dpy-30-like protein
3	-1.39	chromosome 6 open reading frame 48

**COMPARAÇÃO: PHK\_T60 / H16\_T60**

p valor &lt;0,0001

Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
	-2.24	mal, T-cell differentiation protein 2
1	1.29	transcription elongation regulator 1
	3.30	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2
488	-1.63	THAP domain containing, apoptosis associated protein 3
	2.28	dedicator of cytokinesis 9
	-1.21	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain1
	2.54	sarcolemma associated protein
	-0.53	tachykinin receptor 2
1	3.38	protease, serine, 11 (IGF binding)
12	1.50	Notch homolog 2 (Drosophila)
	-0.54	formin binding protein 3
	2.12	fibroblast growth factor binding protein 1
	1.67	FK506 binding protein 5
	1.56	trans-prenyltransferase
	-1.26	protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)

## COMPARAÇÃO: PHK\_T60 / H18\_T60

p valor &lt;0,0001

Nome do Gene	razão de expressão (log2)	NOME DO GENE
3	-2.54	myosin VB
	-4.50	mal, T-cell differentiation protein 2
	-2.13	G protein-coupled receptor 56
	-3.12	latexin
3400	0.85	transcription elongation factor A (SII)-like 8
35	-1.93	mitochondrial ribosomal protein S35
11	2.31	hypothetical protein FLJ21511
	-2.12	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa
21	-1.98	RUN domain containing 1
	-1.06	mesoderm specific transcript homolog (mouse)
1	4.89	protease, serine, 11 (IGF binding)
	3.83	cystatin A (stefin A)
	-3.79	normal mucosa of esophagus specific 1
	-1.73	glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase)
	2.68	RAB31, member RAS oncogene family
19	-1.91	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9
	-4.01	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
	2.08	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
	-2.05	peripheral myelin protein 22
	2.62	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2
19.1	-1.60	hypothetical protein DJ167A19.1
	2.82	snail homolog 2 (Drosophila)
	-0.93	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)
	2.23	chloride channel, calcium activated, family member 4
1	-2.20	Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae)
	-1.23	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain1
	-2.71	potassium channel, subfamily K, member 6
E24	-2.07	zinc metallopeptidase (STE24 homolog, yeast
i(garr	-6.09	SPTF-associated factor 65 gamma
6	2.05	chemokine-like factor super family 6
	-2.24	translocation associated membrane protein 1
P1	-1.57	RAN binding protein 1
	1.61	sarcolemma associated protein
	-1.61	breast cancer membrane protein 101
6	-3.46	chromosome 10 open reading frame 76
	2.19	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)
	2.09	superoxide dismutase 2, mitochondrial
2B	-2.32	adenosine A2b receptor
	-3.00	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
A	1.69	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
	-0.85	signal peptide peptidase 3
	-2.09	family with sequence similarity 46, member A
	2.58	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
	-5.11	lipocalin 2 (oncogene 24p3)

J	2.04	myosin X
A	1.41	parvin, alpha
	-3.12	golgi-specific brefeldin A resistance factor 1
	0.85	HCF-binding transcription factor Zhangfei
i	-1.37	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
	2.63	fibroblast growth factor binding protein 1
B	1.12	jumonji domain containing 1B
A1	1.89	casein kinase 1, alpha 1
-t2	-1.47	golgi phosphoprotein 2
	1.66	enabled homolog (Drosophila)
1	-2.29	EPS8-like 1
	-2.84	fibroblast activation protein, alpha
-t2	1.52	Notch homolog 2 (Drosophila)
	-1.84	enthoprotin
o	-1.53	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
204	-1.68	clone HQ0477 PRO0477p
3	-1.61	chromosome 6 open reading frame 48
	-1.84	chromosome 1 open reading frame 43
	-4.57	HS1 binding protein
	-1.24	Ufm1-conjugating enzyme 1
	-3.47	capping protein (actin filament), gelsolin-like
	-2.35	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
IP1	-1.18	protein kinase C binding protein 1
2	-1.50	lactamase, beta 2
I18	-0.65	ultimate buster-1
	-2.53	signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta)
	-2.56	testis derived transcript (3 LIM domains)
5	-1.90	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
	-1.19	HIRA interacting protein 5
	-2.10	mitochondrial translation optimization 1 homolog (S. cerevisiae)
	0.65	zinc finger protein 38
AP2	-1.10	CDK5 regulatory subunit associated protein 2
i	1.19	chromosome 1 open reading frame 25
_3	-0.95	SEC22 vesicle trafficking protein-like 3 (S. cerevisiae)
	-1.08	tumor suppressing subtransferable candidate 1
P1	3.47	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 1
	-3.10	activating transcription factor 7
P1	-1.08	SH3-domain kinase binding protein 1
	-0.71	microtubule-associated protein 1B
PPT	-1.11	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase
	-2.57	TH1-like (Drosophila)
	-1.65	interleukin 4 receptor
i	-1.29	WD repeat domain 13
	-1.67	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)
D1	-1.03	tumor-associated calcium signal transducer 1

## COMPARAÇÃO: H16\_T60 / H18\_T60

p valor &lt;0,0001

Nome do Gene	Razão de expressão (log2)	Nome do Gene
B	-2.88	myosin VB
	2.50	superoxide dismutase 2, mitochondrial
	-2.25	mal, T-cell differentiation protein 2
5(garr	-6.02	SPTF-associated factor 65 gamma
	-0.90	Era G-protein-like 1 (E. coli)
.P1	1.12	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1
42	-1.46	golgi phosphoprotein 2
A9	-1.04	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9
	-2.10	ribosomal protein L15
I	-1.90	normal mucosa of esophagus specific 1
	1.05	likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1

**Anexo 2** - Artigo: Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array



## Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array

Izabela I. Meireles<sup>a,b</sup>, Alex F. Carvalho<sup>b</sup>, Roberto Hirata Jr.<sup>c,d</sup>, André L. Montagnini<sup>a</sup>, Aleska K. Martins<sup>b</sup>, Franco B. Runza<sup>b</sup>, Beatriz S. Stolf<sup>b,e</sup>, Lara Termini<sup>a</sup>, Chamberlein E.M. Neto<sup>b</sup>, Ricardo L.A. Silva<sup>b</sup>, Fernando A. Soares<sup>a</sup>, E. Jordão Neves<sup>c</sup>, Luiz F.L. Reis<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Hospital do Câncer A.C. Camargo, Rua Professor Antonio Prudente 109, 01509-010 São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, Rua Professor Antonio Prudente 109, 01509-010 São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Matemática e Estatística and BIOINFO, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup>SENAC College of Computer Science and Technology, São Paulo, SP, Brazil

<sup>e</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Received 21 August 2002; received in revised form 8 October 2002; accepted 10 October 2002

### Abstract

Using cDNA fragments from the FAPESP/IICR Cancer Genome Project, we constructed a cDNA array having 4512 elements and determined gene expression in six normal and six tumor gastric tissues. Using *t*-statistics, we identified 80 cDNAs whose expression in normal and tumor samples differed more than 3.5 sample standard deviations. Using Self-Organizing Map, expression profile of these cDNAs allowed perfect separation of malignant and non-malignant samples. Using the revised learning procedure Support Vector Machine, we identified trios of cDNAs that could be used to classify samples as normal or tumor, based on single-array analysis. Finally, we identified genes with altered linear correlation when their expression in normal and tumor samples were compared. Further investigation concerning the function of these genes could contribute to the understanding of gastric carcinogenesis and may prove useful in molecular diagnostics. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Gene expression; Gastric cancer; cDNA array; Molecular marker

### Introduction

During the last 10 years, the incidence of gastric cancer is declining worldwide but, nevertheless, it is a tumor of high incidence [1]. Worldwide, tumors of the stomach are the fourth in incidence and second

in cancer-related deaths (IARC home page: <http://www.dep.iarc.fr>).

At the molecular level, little is known about the mechanisms involved in gastric carcinogenesis. As established for tumors in general, it was proposed that, for gastric adenocarcinomas, accumulation of genetic alterations in a multistep fashion would correlate with disease progression and differences between diffuse and intestinal type adenocarcinomas would be linked to distinct mutation pathways [2]. These genetic

\*Corresponding author. Tel.: +55-11-3207-4922; fax: +55-11-7001.

E-mail address: [lreis@ludwig.org.br](mailto:lreis@ludwig.org.br) (L.F.L. Reis).

arrangements can be either chromosomal aberrations or confined to mutations in one or more genes.

For chromosomal aberrations, several studies employing comparative genomic hybridization identified the 20q region as the most frequent gain. Other frequent gains were observed at 6p, 7q, 8q, and 17q. Losses were at 4q, 5q, 9p, and 18q [3–5]. A high level amplification of the region 17q12–21 was observed in the intestinal type of tumors [4] and recurrent in situ hybridization analyses using probes for either gastrin or ERBB2 revealed that both genes are simultaneously amplified [6]. Using at least two highly polymorphic microsatellite markers for each acrocentric chromosomal arm, an exhaustive screening for loss of heterozygosity (LOH) revealed significant LOH at several loci such as 3p, 4p, 5q, 8p, 13q, 17p, and 18q, suggesting the presence of potential tumor suppressor genes [7].

Altered expression of genes known to play a role in oncogenic transformation has also been detected in gastric cancer, either in freshly isolated tissue or in cell lines. It is well documented that mutations in the p53 gene is a frequent event in gastric cancer and detected in as much as 50% of advanced cases [8,9]. Interestingly, p53 knockout mice, carrying either one or two mutated alleles appear to be more sensitive to experimental *Helicobacter* infection [10]. Other genes with altered expression or frequently amplified in gastric cancer are cErbB2 and c-met [11], TGF- $\beta$ II receptor [12], e-Cadherin [13,14],  $\beta$ -Catenin [15], and many others.

Another tumor type of gastric cancer that accounts for 10% of the cases is designated GIST (gastrointestinal stromal tumor) and comprises the majority of gastrointestinal mesenchymal tumors (reviewed by Hirota and colleagues [16]). At the molecular level, GIST is commonly associated with losses in chromosomes 14 and 22 whereas gain or high-level amplification is observed in 3q, 8q, 5p, and Xp [17]. Mutations in the c-Kit gene have been frequently associated with GIST [19,20] and these tumors exhibited a remarkably homogeneous gene expression profile [21].

More recently, several groups described the application of high throughput methodology in order to identify genes differentially expressed in gastric cancer [3,22–24].

The FAPESP/IICR Human Genome Cancer Pro-

ject finished a major effort in sequencing over 1 100 000 ORESTES (open reading frame ESTs) derived from various tumor types and a significant proportion of yet unknown sequences were generated [25]. Taking advantage of the clone collection generated by this project, we constructed a cDNA array and searched for genes differentially expressed in normal versus tumor gastric mucosa and searched for differentially expressed genes that could distinguish between normal and tumor tissues. Detailed analysis of the genes could help in understanding the molecular events related to gastric carcinogenesis and also, could bring some improvement towards diagnostics and prognostics of gastric cancer.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Tissue specimens and RNA extraction

Fresh tissues from surgically resected gastric cancers were collected by the Gastric Surgery Department from Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo. All patients signed an informed consent and the project was approved by the in-house ethics committee. Six gastric tumors (four adenocarcinomas and two gastrointestinal stromal tumors) and six, not paired, disease-free gastric mucosa were used. Disease-free tissue from tumor margins or obtained from radical gastrectomy was considered as normal tissue. At the time of RNA extraction, histological confirmation of normal or tumor status was performed by hematoxylin–eosin staining of frozen sections. The frozen sections were also used for dissection of samples in order to enrich for tumor cells (see Fig. 1, upper panels). Only samples with at least 70% of tumor tissue and negative for infiltrating inflammatory cells were further processed. In the case of normal samples, only gastric mucosa was used. Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY) following the procedure recommended by manufacturer.

### 2.2. Production of cDNA arrays

A collection of 4512 ORESTES fragments derived from the FAPESP/LICR Human Cancer Genome Project [25] was immobilized in nylon membranes.

As a positive control for labeling and hybridization, we used, in serial dilutions, a cDNA corresponding to a fragment of the lambda phage Q gene. Bacterial strains were grown in LB medium containing 7.5% glycerol and, from each clone, the cDNA insert was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using reverse and forward primers in a final volume of 50 µl. From all 4512 PCR products, 5 µl were separated through a 1% agarose gel in order to identify control DNA products and the remaining 95 µl were purified with QIAquick 96 PCR purification kit (Qiagen) or Sephadex G50 (Amersham Pharmacia). The purified DNA was printed onto nylon membranes by

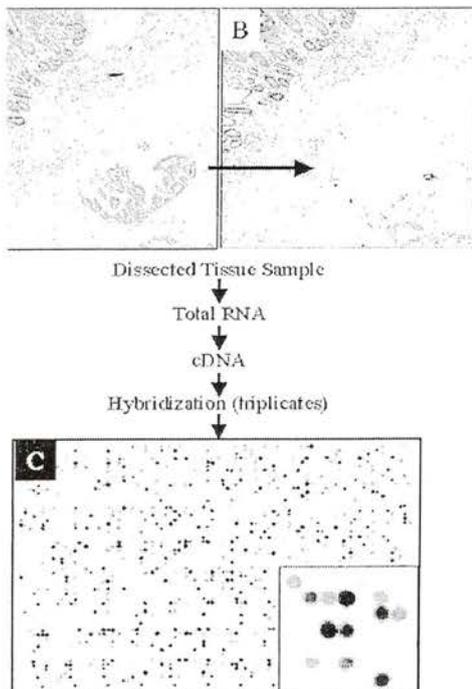
Flexys robot (Genomic Solutions, UK) using a 96 flat pinhead in 96 blocks of 7 × 7 elements.

### 2.3. Labeling, hybridization, and scanning of arrays

Thirty micrograms of total RNA were contaminated with a defined concentration of synthetic, polyadenylated RNA corresponding to the lambda phage Q gene. To this mix, we added 2.0 µg (dT)<sub>15</sub> in a final volume of 11 µl of water, and the mix was heated to 70 °C for 10 min and subsequently cooled to 43 °C. Reverse transcription was performed in a total volume of 50 µl using Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies Inc.) for 2 h at 43 °C in the presence of 0.25 mM each of dATP, dGTP and dTTP, 1.66 µM-dCTP and 30 µCi of [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham, UK). Subsequently, 1.5 µl 1% SDS, 1.5 µl 0.5 M EDTA and 3 µl 3 M NaOH were added and the RNA was hydrolyzed for 30 min at 65 °C and 15 min at room temperature. The solution was then neutralized with 1.5 µl 1 M Tris-HCl (pH 8) and 4.5 µl 2 M HCl. Probes were purified by gel chromatography (BioSpin 6; Bio-Rad). Prior to hybridization, the solution was boiled for 2 min, and then cooled on ice. Arrays were prehybridized for at least 1 h in 0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2), SDS 7%, BSA 1%, 1 mM EDTA. Hybridization was conducted in the same buffer at 65 °C overnight [26]. For each cDNA sample, three identical membranes were hybridized simultaneously (normal samples correspond to membranes 1–18 and tumor samples correspond to membranes 19–36). The filters were then washed for 30 min in 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2), SDS 1%, 1 mM EDTA and image acquired by a phosphorimager (Molecular Dynamics Storm Imager, Molecular Dynamics, USA).

### 2.4. Data acquisition

Data acquisition was performed with the ArrayVision software (Amersham, UK), using gel files. To quantify signal intensities of the hybridized spots, a template composed by equal-sized ellipses were drawn around all spots. Following the identification of the spots, the software calculated the spot-intensity value and array background intensity.



Identification of genes differentially expressed in gastric cancer. Schematic representation of our experimental design. (A,B) Dissection of the dissecting procedure were only the invasive part of an adenocarcinoma was excised and processed for RNA extraction. Each RNA sample was hybridized with three identical membranes. (C) Representative image of our nylon array after hybridization with [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP-labeled cDNA. Signals were detected on a phosphorimager and data was acquired by the ArrayVision software using gel files.

*Data normalization*

The background from a given array was subtracted from all 4512 spot-intensity values and we considered for our analysis only the 4388 genes with positive background-corrected values across all 36 arrays. We then normalized the data in all arrays using total energy (4388 spots) on each given array.

*Statistical analysis*

Single genes with difference in expression when comparing normal and tumor samples were identified by their  $t$ -values, denoted by  $t_{nc}$ , which is the difference between Normal and Tumor sample-mean log-transformed gene expressions, standardized by corresponding sample standard deviation. For a given gene, say gene  $k$ , and  $j = 1, \dots, 18$ , let  $N_j^k$  denote log-transformed gene expression on the  $j^{\text{th}}$  normal sample and  $T_j^k$  its log-transformed gene expression on the  $j^{\text{th}}$  tumor sample. The  $t_{nc}$  value for gene  $k$  is computed as follows:

$$t_{nc} = \frac{\bar{N}^k - \bar{T}^k}{\sqrt{\frac{S_{N^k}^2}{18} + \frac{S_{T^k}^2}{18}}}$$

where  $\bar{N}^k$  (respectively  $\bar{T}^k$ ) denotes gene  $k$  sample mean expression value in normal (tumor) arrays,  $S_{N^k}$  (respectively  $S_{T^k}$ ) denotes its sample standard deviation in normal (tumor) arrays. We choose the normalization term for  $t_{nc}$  as in Ref. [27] even though our experimental setting is different because it involves strongly replica measurement errors and therefore provides a simple and yet stringent statistics to evaluate differences in gene expression.

Elements with  $t_{nc}$  values equal or higher than 3.5 in absolute values were considered as differentially expressed. This set of cDNAs was then analyzed by Organizing Map (SOM) and hierarchical clustering algorithms, both implemented in Matlab (Mathworks) neural networks and statistics toolboxes.

To find pairs and trios of genes that would allow for linear separation of Normal and Tumor classes we used a supervised learning technique known as Support Vector Machines, also implemented in Matlab (Cawley, G.C., Support Vector Machine Toolbox v0.50, <http://theoval.sys>.

[uea.ac.uk/~gcc/svm/toolbox](http://uea.ac.uk/~gcc/svm/toolbox), Support Vector Machine toolbox for Matlab Version 2.4, August, 2001, copyright Anton Schwaighofer (2001) <mailto:anton.schwaighofer@gmx.net>).

Write  $(N^k = N_1^k, N_2^k, \dots, N_{18}^k)$  and  $(T^k = T_1^k, T_2^k, \dots, T_{18}^k)$  for the vectors of expressions of gene  $k$ , respectively, among normal and tumor samples. To look for pairs of genes whose coordinated patterns of expression would change in comparing the two conditions we computed, for each pair of genes  $k$  and  $l$ , their Pearson linear correlation coefficient among normals,  $\text{corr}(N^k, N^l)$ , and among tumors,  $\text{corr}(T^k, T^l)$ .

**3. Results**

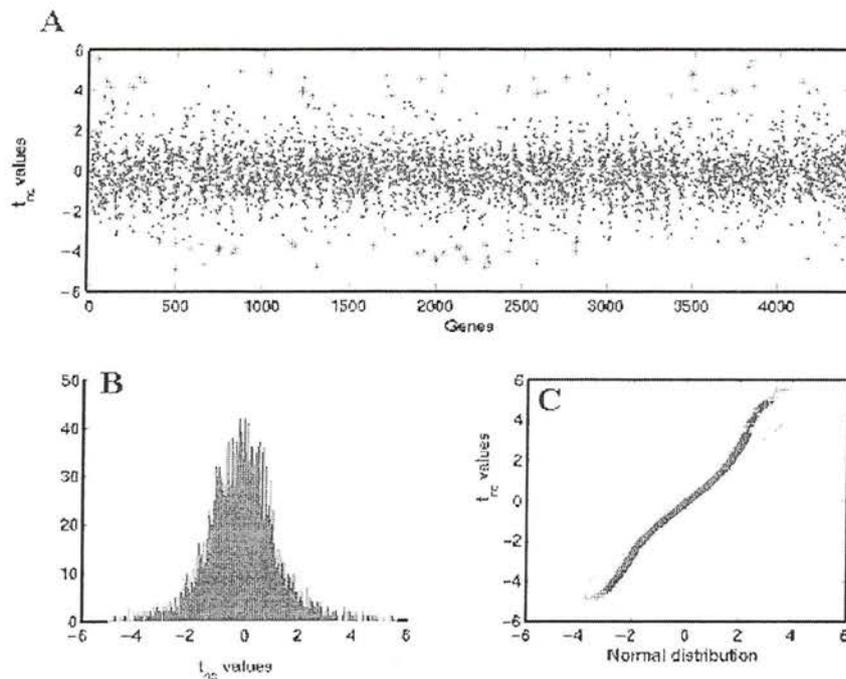
In order to determine the profile of gene expression in gastric tissues, we isolated total RNA from six tumor samples and from six samples of disease free gastric mucosa. For each sample, three identical nylon arrays were simultaneously hybridized, giving 18 membranes corresponding to normal tissue and 18 membranes corresponding to tumor tissues. Fig. 1 represents a scheme of our experimental design.

*3.1. Identification of 80 cDNAs differentially expressed in gastric cancer*

The data obtained from all 36 membranes were normalized by total energy as described in Section 2. Therefore, after normalization, all our 36 arrays have the same total expression values and one can meaningfully compare gene expressions from different arrays [27,28].

With normalized data, we computed the  $t$ -statistic,  $t_{nc}$ , for each single cDNA. In Fig. 2A, we plotted data from all 4388 cDNA clones based on their  $t_{nc}$  value. Fig. 2B represents the histogram with the  $t_{nc}$  values and in Fig. 2C we represent a quantile–quantile plot of this data versus theoretical quantiles from a normal distribution. The heavy tails of the empirical distribution of  $t_{nc}$  indicate the presence of several genes whose expression levels differ between normal and tumor samples.

Before the application of more elaborated, but also more computer-intensive, exploratory methods, it is quite natural to first select a smaller subset of genes to



Distribution of  $t_{nc}$  values for 4388 cDNAs tested in gastric tumors: Normalized data from 36 arrays hybridized with complex cDNA derived from normal or tumor samples were used to compute the  $t_{nc}$  value for each of the 4388 cDNAs. (A) Representation of the  $t_{nc}$  for each single cDNA. In red, we represent 80 cDNAs with  $t_{nc}$  greater than 3.5 in absolute values. (B) Histogram representing data from (A). (C) Quantile–quantile plot of data represented in (A) against the expected value from a normal distribution.

with. This important step, sometimes called *de* selection [29,30], was done here with the help of a computer program. Genes with larger  $t_{nc}$  values, in absolute value, are candidates for playing a role in carcinogenesis as well as in the discrimination among normal and tumor samples. We arbitrarily choose a threshold of 3.5 for  $t_{nc}$  and a set of 80 cDNAs, 43 with  $t_{nc}$  larger than 3.5 and 37 with  $t_{nc}$  smaller than  $-3.5$  (indicated in red in Fig. 3). All 80 cDNAs were sequence verified.

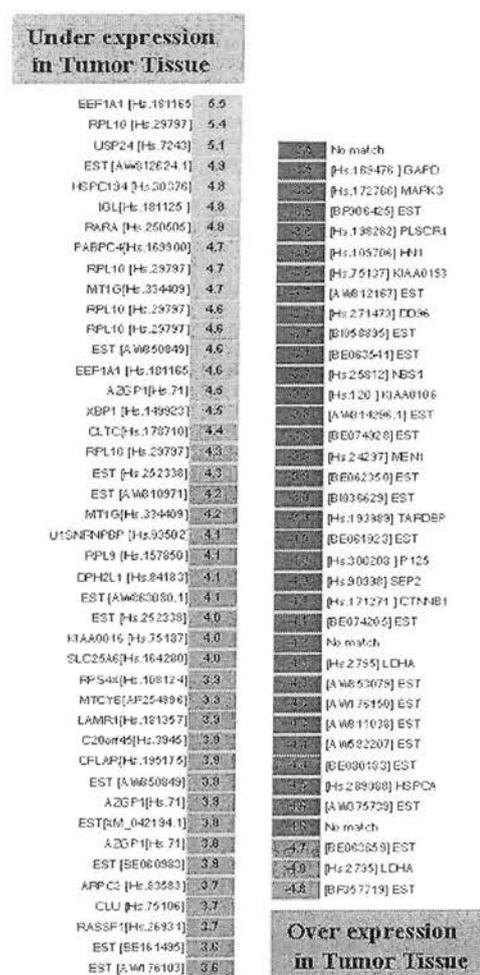
In Fig. 3, we have a graphic representation of all 80 differentially expressed cDNAs with their respective  $t_{nc}$  value. As can be observed, five genes are represented by two or more distinct cDNA fragments. For example, ribosomal protein L 10 (RPL10) is represented by two cDNA clones,  $\alpha$ 2-glycoprotein 1 is represented by three clones, and metallothionein IG, Elongation factor 1- $\alpha$ 1, and lactate dehydrogenase A are

represented by two clones. Clones representing the same gene showed very similar  $t_{nc}$  values and appeared together in the same side of Fig. 3, confirming the reproducibility of our experimental conditions and the consistence of our statistical analysis. From these 80 cDNAs, we identified 35 known genes, 31 ESTs with no functional annotation and three ORESTES sequences not yet submitted to GenBank. If a more relaxed threshold for  $t_{nc}$  is used, namely 3 instead of 3.5, 61 extra cDNAs are identified and a list with these 141 cDNAs can be visualized in our web page (<http://www.array.ludwig.org.br/gastriccancer/canlettersmeireles>). The sequence of all 141 cDNAs was verified experimentally.

We selected ten genes in order to experimentally confirm their differential expression in 26 new RNA samples (13 from normal tissue and 13 from tumor tissue). The levels of mRNA were estimated by RT-

R followed by Southern blot and phosphorimager lysis. For normalization, we used three distinct housekeeping genes ( $\beta$ -actin,  $\alpha$ -tubulin, and TBP), for each gene, we determined its arbitrary expression unit (ratio of signal for gene/normalizing gene). A gene was considered as confirmed when the

ratio of its average expression units (normal/tumor) followed its  $t_{nc}$  value. Seven of the ten genes (RPL10, CLTC, EEF1A1, TARDBP, HSPCA, NBS1, Est AW812624) could be experimentally confirmed. Nevertheless, validation of array data by RT-PCR must take in consideration the tremendous variability of housekeeping genes [31] and, more importantly, that in our case, a gene can have a high  $t_{nc}$  value even if its fold change is rather small. Similar observations were published by [32]. For instance, in our array data,  $\beta$ -Catenin differs only 1.3-fold between normal and tumor samples but its  $t_{nc}$  value is 4.32 due to its small SD.



Genes with differential expression in gastric tumors. Based on a presented in Fig. 2A, we list genes (with respective on numbers indicated within brackets) and indicate their  $t_{nc}$ . In green, genes with lower expression in tumor tissue ( $t_{nc}$  values); in red, genes with higher expression in tumor negative  $t_{nc}$  values).

### 3.2. Clustering algorithms: SOM and hierarchical

After selecting the 80 cDNA clones with absolute  $t_{nc}$  value higher than 3.5, we applied a SOM algorithm [33] to identify clusters of expression profiles according to samples. Two clusters were identified and they represented a precise separation of normal and tumor samples (data not shown). When we applied a hierarchical cluster algorithm, we observed that all replicas from a given patient are grouped together, further confirming reproducibility of our data (data not shown). Next, we applied again the SOM algorithm, now to separate genes according to their expression across all 36 membranes, into six clusters. In Fig. 4, we represent these clusters and, within each cluster, we further ordered genes according to their hierarchical distance, as indicated by each dendrogram.

### 3.3. Genes with coordinated pattern of expression

Next we used a supervised computer learning method called Support Vector Machine (SVM) to search for trios of genes with a coordinated pattern of expression. We searched the dataset corresponding to the 80 cDNAs with  $t_{nc}$ , in absolute value, larger than 3.5 to find trios of genes whose pattern of expression in individual membranes would be such that, when plotted on three dimensional space, a plane could be found separating perfectly the 36 data points into two groups, one with 18 normal samples and another with the remaining 18 tumor samples. We found several interesting trios with this property. One trio is composed of  $\beta$ -Catenin, Clathrin, and Retinoic Acid

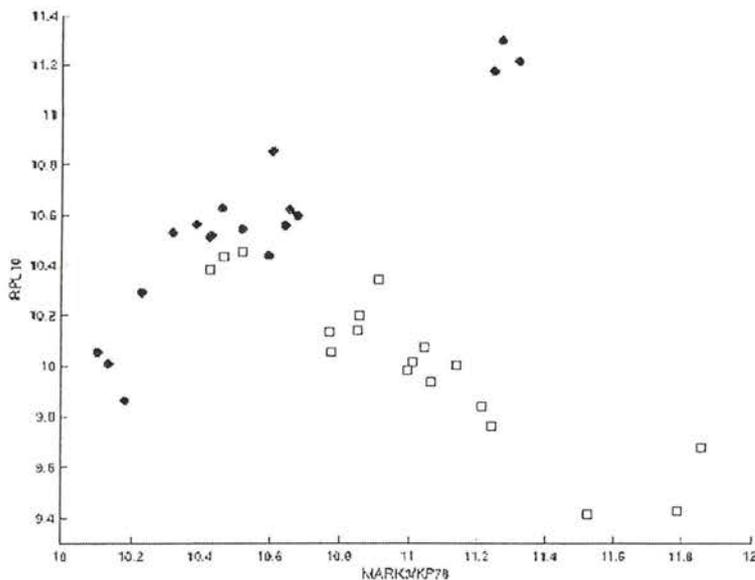


are compared. For this search, we use a list of 432 cDNAs that showed  $t_{nc}$  value greater than 2.0 (in absolute value). We constructed a scatter plot where, for each pair of genes, we associate a point on the plane with coordinates given by their log-transformed normalized signal intensity on normal samples and tumor samples. As one would expect, we found that five clones corresponding to different cDNA segments of Ribosomal Protein L10 had a strong positive correlation among themselves, both in normal and tumor samples. However, all five RPL10 clones showed strong positive linear correlation with MARK3 on normal samples but negative correlation on tumor samples (Fig. 6). Another gene group exhibiting this sort of correlation change is composed of association domain family 1 (RASSF1),  $\alpha$ 2-glycoprotein 1 (AZGP1) and Metallothionein 1G. RASSF1 has strong positive correlation with the expression patterns of two cDNA segments representing Metallothionein 1G in normal samples but small correlation on tumor samples. Moreover, Metallothionein 1G has strong positive correlation

with  $\alpha$ 2-glycoprotein 1 in normal samples but small correlation in tumor samples (data not shown).

#### 4. Discussion

Gastric cancer is the second cause of cancer-related death worldwide. This observation can be explained, at least in part, by the fact that gastric cancer does not respond well to chemotherapy and/or radiotherapy, leaving surgery as the treatment of choice [34,35]. Efforts towards early diagnosis of gastric cancer are regarded as high priority since it would allow more conservative procedures, improving survival and quality of life. And as in the case of many other tumors, the molecular events related to oncogenesis of gastric cancer are not well understood. Thus, identification of genes with differential expression in gastric cancer will certainly have a positive impact in this field [36]. Such genes would be prime suspects in sharing some responsibility on the onset, development, or behavior of gastric cancer and good



Linear Pearson correlation coefficient between RPL10 and MARK3 expressions. The figure represents a scatter plot where, to each array, we associate a point on the plane representing the log-transformed normalized signal intensity for RPL10 and MARK3 on normal samples (dots) and tumor samples (open squares).

indicates as markers for diagnosis [37]. Using cDNA arrays, we searched for genes modulated in gastric tumors and applied several statistical tools to identify alterations in their expression pattern.

We first identify single genes, whose expression could be different in normal and cancer samples. Instead of considering differences in fold expression, usual in the literature, we computed the *t*-statistic for each cDNA. The well-known problem in evaluating differences in expression simply by fold change is one does not know whether a fixed value, for a given gene, is sufficiently large to characterize that gene as differently expressed without taking into account its variation of expression across all samples. Using the *t*-statistic this variation is taken into account and genes that can be considered differentially expressed would be those with larger  $t_{nc}$  in absolute value. Among the genes with differential expression, we identified well-known tumor suppressor genes and proto-oncogenes, known to play a role in gastric cancer. We found that RASSF1, known as a tumor suppressor gene [38], was underexpressed in tumor samples ( $t_{nc} = 3.7$ ). Loss or abnormal downregulation of RASSF1 is observed in a considerable number of lung, breast, ovarian, bladder, nasopharynx [39–44] and, more relevant, in gastric carcinomas [45].

We also detected overexpression of known oncogenes. Of notice,  $\beta$ -Catenin was overexpressed in tumor samples ( $t_{nc} = -4.1$ ). The role of the WNT pathway in development and oncogenesis has been extensively investigated [46–48]. In the case of gastric cancer, E-cadherins and  $\beta$ -Catenin are of particular importance [13,49,50]. Indeed, mutations in E-cadherin gene has been associated with familial cases of gastric cancer [51,52].

Interestingly, two other genes involved in the Wnt pathway were also found as differentially expressed in our samples. Clathrin and Retinoic acid receptor  $\alpha$  were both underexpressed in tumor samples ( $t_{nc} = 4.4$  and 4.8, respectively). Reduced expression of Clathrin leads to reduced recycling of E-cadherin, lowering its level at cell surface and, as a consequence, more  $\beta$ -Catenin would be available in the cytoplasm for signaling via interaction with TCF [53,54]. Recently, it was shown that retinoic acid (RA) decreases the activity of the  $\beta$ -catenin-TCF/IEF signaling pathway by inducing

ubiquitin-dependent degradation of cytoplasmic  $\beta$ -Catenin as well as by competition with TCF for  $\beta$ -Catenin binding [55,56]. Thus reduced levels of Clathrin and RAR might also contribute to increased WNT signaling.

Two other genes identified as overexpressed in tumor samples might have important implications in the oncogenesis of gastric cancer, Nibrin ( $t_{nc} = -3.7$ ) and Humanin mRNA ( $t_{nc} = -3.6$ ). Nibrin is a member of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex, implicated in numerous aspects of double-strand break repair, and considered as a typical tumor suppressor gene (reviewed by Wang [57]). In agreement with our data, Nibrin mRNA was also found to be augmented in GIST [21]. This is also confirmed by SAGE analysis (<http://cgap.nci.nih.gov/Pathways>). It is possible that, based on the findings by Paull and co-workers [58], Nibrin overexpression might favor the nucleolytic activity of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. Humanin was recently described as a small polypeptide that could rescue neuronal cells from specific death signals [59,60]. To the best of our knowledge, this is the first report of augmented expression of Humanin in tumor tissues and its overexpression by cancer cells could represent yet another survival signal, favoring tumor development.

Based on published observations, it is clear that molecular classification of cancer is not only feasible but also, might prove to be the method of choice to identify sub groups of a given tumor [61–65]. Having identified these 80 cDNAs, we applied other statistical tools to classify our normal and tumor samples. It has been suggested that the SOM has some important advantages for interpreting gene expression patterns, when compared to other clustering algorithms [66]. When we applied SOM to group samples, two predominant clusters of expression profile were identified and they could precisely separate normal and tumor samples (Fig. 4). Using a support vector machine algorithm, recently described as a tool to build classifiers for cancer samples [63], we performed an exhaustive search for trios of cDNAs that would allow precise separation between normal and tumor samples. We identified several trios composed by the 80 genes from Fig. 3 that, when plotted on a three-dimensional space, normal and tumor samples could be precisely separated by a plane (Fig. 5). It is possible that combination of various trios with the

properties described here might have an added accuracy for molecular classification when compared to a list of differentially expressed genes as currently tested [62,65,67]

The identification of these trios was based on their simultaneous expression levels on each given array. One could use this information to investigate whether, in such trios, the genes would fall into a common biochemical pathway or whether they belong to distinct pathways that, together, would point to a metabolic advantage for tumor cells. Indeed, the genes from Fig. 5A, Clathrin,  $\beta$ -Catenin, and G-protein Coupled Receptor can all be mapped into a common pathway, as discussed earlier. In other trio (Fig. 5B), the three genes cannot be directly linked to a single pathway. RPL10, might have tumor suppressive activities and negatively regulate c-Jun activity. Thus, reduced RPL10 and augmented  $\beta$ -Catenin in tumor samples would favor mitogenic signals, whereas elevated Humanin could provide a survival advantage for tumor cells, as mentioned above.

We also searched for genes with change in their Spearman correlation. This kind of analysis would allow the identification of genes whose expression occurs in a coordinated fashion in one or more of samples but either are not correlated or, perhaps more interestingly, with inverse correlation in the other group. Importantly, it could be that, genes with this behavior might have low  $t_{nc}$  values in small numbers and thus not identified as differentially expressed. In Fig. 6, we represent the changes in correlation between RPL10 and MARK3. This set of genes has a positive linear correlation in normal samples that changes to a negative linear correlation in tumor samples. As we discussed before RPL10 might function as a negative regulator of the c-Jun-activated mitogenic pathway. In contrast, overexpression of  $\beta$ -Catenin and consequent activation of the Wnt pathway activates c-Jun gene expression [69] and possibly, MARK3 [24,70]. Hence, in tumor cells, a positive linear correlation, would favor a mitogenic signaling pathway.

Finally, it is clear that gastric adenocarcinomas and gastrointestinal stromal tumors are consequences of the transformation of different cell types and hence, we made no efforts neither in distinguishing nor in comparing these two tumor types. Intentionally, we simply looked for genes

with conserved alterations in all tumor samples. It is not surprising that a common set of genes can be identified in two distinct tumor types. As discussed above RASSF1, Clusterin,  $\beta$ -Catenin, and many others genes are commonly altered in a variety of tumors. Specifically, NBS1 that we identified as overexpressed in tumor samples was also found augmented in GIST by Allander and co-workers [21]. As expected, we did identify differences in the expression profile of the two tumor types, especially in genes from cluster 1 (uppermost cluster, second and third last triplicates from the right). However, based on our findings (Figs. 5 and 6) we can suggest that, as for gastric adenocarcinomas, the WNT pathway might also be altered in GIST. We can also conclude that classifiers based on genes commonly altered in adenocarcinomas and GIST can precisely distinguish both tumor types from normal gastric mucosa (Fig. 5) and this would imply that, regardless of differences in oncogenesis, a single classifier could be applied for gastric tumors.

Taken together, the information extracted from our dataset can contribute to the better understanding of oncogenesis of gastric cancer as well as to the development of molecular-based diagnostic tools.

#### Acknowledgements

We would like to thank all members of the Department of Abdominal Surgery, Hospital do Câncer for tissue collection, Anna Christina de Mattos Salim and Elizangela Monteiro, Laboratory of Genetics from LICR, for helping with sequence verification, and Carlos Ferreira and Miyuki F. da Silva for technical assistance in tissue sections. We also thank Dr. Junior Barrera for discussions, Marcel Brun for developing some of the software used in this work and Dr. Ricardo Brentani for critically reading the manuscript. This work was supported, in part, by the CEPID/FAPESP (98/1435-2). The Clone Collection is funded by the FAPESP/IICR consortium and, S.I.M., L.T., and B.S.S are supported by a pre-doctoral fellowship from FAPESP. R.L.A.S is supported by a post-doctoral fellowship from FAPESP.

## References

- Chan, A.O., Wong, B.C., Lam, S.K., Gastric cancer: past, present and future, *Can. J. Gastroenterol.* 15 (2001) 469–474.
- Yasui, H., Yokozaki, J., Fujimoto, K., Naka, H., Kuniyasu, E., Tahara, Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach, *J. Gastroenterol.* 35 (Suppl. 2) (2000) 111–115.
- El Rifai, H.F., Frierson Jr., J.C., Harper, S.M., Powell, S., Knuutila, Expression profiling of gastric adenocarcinoma using cDNA array, *Int. J. Cancer* 92 (2001) 832–838.
- Kokkola, O., Monni, P., Puolakkainen, M.L., Larramendy, I., Victorzon, S., Nordling, R., Haapiainen, E., Kivilaakso, S., Knuutila, 17q12–21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a comparative genomic hybridization study, *Genes Chromosomes Cancer* 20 (1997) 38–43.
- Nessling, S., Solinas-Toldo, K.K., Wilgenbus, F., Borchard, C., Lichter, Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes MYCN, ET, WNT2, and ERBB2, *Genes Chromosomes Cancer* 23 (1998) 307–316.
- Vidgren, A., Varis, A., Kokkola, O., Monni, P., Puolakkainen, Nordling, F., Forozan, A., Kallioniemi, M.L., Vakkari, E., Vilaakso, S., Knuutila, Concomitant gastrin and ERBB2 gene amplifications at 17q12-q21 in the intestinal type of gastric cancer, *Genes Chromosomes Cancer* 24 (1999) 24–29.
- Yustein, J.C., Harper, G.R., Petroni, O.W., Cummings, A., Moskaluk, S.M., Powell, Allelotype of gastric adenocarcinoma, *Cancer Res.* 59 (1999) 1437–1441.
- Ranzani, O., Luinetti, L.S., Padovan, D., Calistri, B., Nault, M., Burrel, D., Amadori, R., Fiocca, E., Solcia, p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4 (1995) 223–231.
- Shepherd, D., Tolbert, J., Benedetti, J., Macdonald, G., Zimmermann, J., Wiest, G., De Voe, M.A., Miller, J., Wang, A., Tsinger, C., Fenoglio-Preiser, Alterations in exon 4 of the c-met gene in gastric carcinoma, *Gastroenterology* 118 (2000) 9–1044.
- Fox, X., Li, R.J., Cahill, K., Andrutis, A.K., Rustgi, R., Odze, J., Wang, Hypertrophic gastropathy in *Helicobacter feliscus*-induced wild-type C57BL/6 mice and p53 hemizygous congenic mice, *Gastroenterology* 110 (1996) 155–166.
- Sugawara, Y., Yonemura, Y., Hirono, S., Fushida, M., Kaji, K., Iwa, I., Miyazaki, H., Yamamoto, Amplification of the c-met, erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features, *Oncology* 55 (1998) 475–481.
- Park, S.J., Kim, Y.J., Bang, J.G., Park, N.K., Kim, A.B., Kim, M.B., Sporn, Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 8771–8776.
- Shimoyama, S., Hirohashi, Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas, *Cancer Res.* 51 (1991) 2185–2192.
- [14] K. Matsuura, J. Kawanishi, S. Fujii, M. Imamura, S. Hirano, M. Takeichi, Y. Niitsu, Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid, *Br. J. Cancer* 66 (1992) 1122–1130.
- [15] D.K. Woo, H.S. Kim, H.S. Lee, Y.H. Kang, H.K. Yang, W.H. Kim, Altered expression and mutation of beta-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines, *Int. J. Cancer* 95 (2001) 108–113.
- [16] M. Miettinen, M. Sarlomo-Rikala, J. Lasota, Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology, *Hum. Pathol.* 30 (1999) 1213–1220.
- [17] W. El Rifai, M. Sarlomo-Rikala, L.C. Andersson, M. Miettinen, S. Knuutila, DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors – a distinct genetic entity, *Ann. Chir. Gynaecol.* 87 (1998) 287–290.
- [18] W. El Rifai, M. Sarlomo-Rikala, M. Miettinen, S. Knuutila, L.C. Andersson, DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Res.* 56 (1996) 3230–3233.
- [19] S. Sakurai, T. Fukasawa, J.M. Chong, A. Tanaka, M. Fukayama, C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal), *Jpn. J. Cancer Res.* 90 (1999) 1321–1328.
- [20] R. Fukuda, N. Hamamoto, Y. Uchida, K. Furuta, T. Katsube, H. Kazumori, S. Ishihara, K. Amano, K. Adachi, M. Watanabe, Y. Kinoshita, Gastrointestinal stromal tumor with a novel mutation of KIT proto-oncogene, *Intern. Med.* 40 (2001) 301–303.
- [21] S.V. Allander, N.N. Nupponen, M. Ringner, G. Hostetter, G.W. Maher, N. Goldberger, Y. Chen, J. Carpten, A.G. Elkahlon, P.S. Meltzer, Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile, *Cancer Res.* 61 (2001) 8624–8628.
- [22] M.H. Jung, S.C. Kim, G.A. Jeon, S.H. Kim, Y. Kim, K.S. Choi, S.I. Park, M.K. Joe, K. Kimm, Identification of differentially expressed genes in normal and tumor human gastric tissue, *Genomics* 69 (2000) 281–286.
- [23] Y. Hippo, M. Yashiro, M. Ishii, H. Taniguchi, S. Tsutsumi, K. Hirakawa, T. Kodama, H. Aburatani, Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes, *Cancer Res.* 61 (2001) 889–895.
- [24] Y. Hippo, H. Taniguchi, S. Tsutsumi, N. Machida, J.M. Chong, M. Fukayama, T. Kodama, H. Aburatani, Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays, *Cancer Res.* 62 (2002) 233–240.
- [25] A.A. Camargo, H.P. Samaia, E. Dias-Neto, D.F. Simao, I.A. Migotto, M.R. Briones, F.F. Costa, M.A. Nagai, S. Verjovski-Almeida, M.A. Zago, L.E. Andrade, H. Carrer, H.F. El Dorry, E.M. Espreafico, A. Habr-Gama, D. Giannella-Neto, G.H. Goldman, A. Gruber, C. Hackel, E.T. Kimura, R.M. Maciel, S.K. Marie, E.A. Martins, M.P. Nobrega, M.L. Paco-Larson, M.I. Pardini, G.G. Pereira, J.B. Pesquero, V. Rodrigues, S.R. Rogatto, I.D. da Silva, M.C. Sogayar, M.F. Sonati, E.H. Tajara, S.R. Valentini, F.L. Alberto, M.E. Amaral, I. Aneas, L.A. Arnaldi, A.M. de Assis, M.H. Bengtson, N.A. Bergamo, V. Bombonato, M.E. de Camargo, R.A. Canevari, D.M.

- Carraro, J.M. Cerutti, M.L. Correa, R.F. Correa, M.C. Costa, C. Curcio, P.O. Hokama, A.J. Ferreira, G.K. Furuzawa, T. Gushiken, P.L. Ho, E. Kimura, J.E. Krieger, L.C. Leite, P. Majumder, M. Marins, E.R. Marques, A.S. Melo, M. Melo, C.A. Mestriner, E.C. Miracca, D.C. Miranda, A.L. Nascimento, F.G. Nobrega, E.P. Ojopi, J.R. Pandolfi, L.G. Pessoa, A.C. Prevedel, P. Rahal, C.A. Rainho, E.M. Reis, M.L. Ribeiro, N. da Ros, R.G. deSa, M.M. Sales, S.C. Sant'anna, M.L. dos Santos, A.M. da Silva, N.P. da Silva, W.A. Silva Jr., R.A. da Silveira, J.F. Sousa, D. Steconci, F. Tsukumo, V. Valente, F. Soares, E.S. Moreira, D.N. Nunes, R.G. Correa, H. Zalberg, A.F. Carvalho, L.F. Reis, R.R. Brentani, A.J. Simpson, S.J. deSouza, The contribution of 700 000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 12103–12108.
- [1] G.M. Church, W. Gilbert, Genomic sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1991–1995.
- [2] M.J. Callow, S. Dudoit, E.L. Gong, T.P. Speed, E.M. Rubin, Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in HDL-deficient mice, *Genome Res.* 10 (2000) 2022–2029.
- [3] J. Schuchhardt, D. Beule, A. Malik, E. Wolski, H. Eickhoff, H. Lehrach, H. Herzog, Normalization strategies for cDNA microarrays, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) E47.
- [4] T.M. Mitchell, *Machine Learning*, McGraw-Hill, New York, 1997.
- [5] S. Theodoridis, K. Koutroumbas, *Pattern Recognition*, Academic Press, New York, 1999.
- [6] P.D. Lee, R. Sladek, C.M. Greenwood, T.J. Hudson, Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies, *Genome Res.* 12 (2002) 292–297.
- [7] W. Jin, R.M. Riley, R.D. Wolfinger, K.P. White, G. Passador-Gurgel, G. Gibson, The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Genet.* 29 (2001) 389–395.
- [8] T. Kohonen, *Self-Organizing Maps*, Springer, Berlin, 1997.
- [9] R. De Vivo, S. Pignata, R. Palaia, V. Parisi, B. Daniele, The role of chemotherapy in the management of gastric cancer, *J. Clin. Gastroenterol.* 30 (2000) 364–371.
- [10] H.H. Hartgrink, H.J. Bonenkamp, C.J. van de Velde, Influence of surgery on outcomes in gastric cancer, *Surg. Oncol. Clin. North Am.* 9 (2000) 97–viii.
- [11] A. Boussioutas, D. Taupin, Towards a molecular approach to gastric cancer management, *Intern. Med. J.* 31 (2001) 296–303.
- [12] K.F. Becker, G. Keller, H. Hoefler, The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer, *Surg. Oncol.* 9 (2000) 5–11.
- [13] K. Dreijerink, E. Braga, I. Kuzmin, L. Geil, F.M. Duh, D. Angeloni, B. Zbar, M.I. Lerman, E.J. Stanbridge, J.D. Minna, A. Protopopov, J. Li, V. Kashuba, G. Klein, E.R. Zbarovsky, The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 7504–7509.
- [14] R. Dammann, C. Li, J.H. Yoon, P.L. Chin, S. Bates, G.P. Pfeifer, Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3, *Nat. Genet.* 25 (2000) 315–319.
- [15] R. Dammann, G. Yang, G.P. Pfeifer, Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers, *Cancer Res.* 61 (2001) 3105–3109.
- [16] D.G. Burbee, E. Forgacs, S. Zochbauer-Muller, L. Shivakumar, K. Fong, B. Gao, D. Randle, M. Kondo, A. Virmani, S. Bader, Y. Sekido, F. Latif, S. Milchgrub, S. Toyooka, A.F. Gazdar, M.I. Lerman, E. Zbarovsky, M. White, J.D. Minna, Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression, *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (2001) 691–699.
- [17] A. Agathangelou, S. Honorio, D.P. Macartney, A. Martinez, A. Dallol, J. Rader, P. Fullwood, A. Chauhan, R. Walker, J.A. Shaw, S. Hosoe, M.I. Lerman, J.D. Minna, E.R. Maher, F. Latif, Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours, *Oncogene* 20 (2001) 1509–1518.
- [18] K.W. Lo, J. Kwong, A.B. Hui, S.Y. Chan, K.F. To, A.S. Chan, L.S. Chow, P.M. Teo, P.J. Johnson, D.P. Huang, High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma, *Cancer Res.* 61 (2001) 3877–3881.
- [19] M.G. Lee, H.Y. Kim, D.S. Byun, S.J. Lee, C.H. Lee, J.I. Kim, S.G. Chang, S.G. Chi, Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma, *Cancer Res.* 61 (2001) 6688–6692.
- [20] D.S. Byun, M.G. Lee, K.S. Chae, B.G. Ryu, S.G. Chi, Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma, *Cancer Res.* 61 (2001) 7034–7038.
- [21] R. Cavallo, D. Rubenstein, M. Peifer, Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7 (1997) 459–466.
- [22] M.J. Smalley, T.C. Dale, Wnt signalling in mammalian development and cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 18 (1999) 215–230.
- [23] M. Peifer, P. Polakis, Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus, *Science* 287 (2000) 1606–1609.
- [24] T. Oda, Y. Kanai, T. Oyama, K. Yoshiura, Y. Shimoyama, W. Birchmeier, T. Sugimura, S. Hirohashi, E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1858–1862.
- [25] K.F. Becker, H. Hoefler, Frequent somatic allelic inactivation of the E-cadherin gene in gastric carcinomas, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 1082–1084.
- [26] G. Keller, H. Vogelsang, I. Becker, J. Hutter, K. Ott, S. Candidus, T. Grundei, K.F. Becker, J. Mueller, J.R. Siewert, H. Hoefler, Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 337–342.
- [27] S.A. Gayther, K.L. Gorringe, S.J. Ramus, D. Huntsman, F. Roviello, N. Grehan, J.C. Machado, E. Pinto, R. Seruca, K. Halling, P. MacLeod, S.M. Powell, C.E. Jackson, B.A. Ponder,

- C. Caldas, Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin, *Cancer Res.* 58 (1998) 4086–4089.
- J. Behrens, J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, W. Birchmeier, Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature* 382 (1996) 638–642.
- T.L. Le, A.S. Yap, J.L. Stow, Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 219–232.
- S. Byers, M. Pishvaian, C. Crockett, C. Peer, A. Tozeren, M. Sporn, M. Anzano, R. Lechleider, Retinoids increase cell-cell adhesion strength, beta-catenin protein stability, and localization to the cell membrane in a breast cancer cell line: a role for serine kinase activity, *Endocrinology* 137 (1996) 3265–3273.
- V. Easwaran, M. Pishvaian, Salimuddin, S. Byers, Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways, *Curr. Biol.* 9 (1999) 1415–1418.
- J.Y. Wang, Cancer. New link in a web of human genes, *Nature* 405 (2000) 404–405.
- T.T. Paull, D. Cortez, B. Bowers, S.J. Elledge, M. Gellert, From the Cover: Direct DNA binding by Brca1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6086–6091.
- Y. Hashimoto, T. Niikura, H. Tajima, T. Yasukawa, H. Sudo, Y. Ito, Y. Kita, M. Kawasumi, K. Kouyama, M. Doyu, G. Sobue, T. Koide, S. Tsuji, J. Lang, K. Kurokawa, I. Nishimoto, A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6336–6341.
- Y. Hashimoto, T. Niikura, Y. Ito, H. Sudo, M. Hata, E. Arakawa, Y. Abe, Y. Kita, I. Nishimoto, Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults, *J. Neurosci.* 21 (2001) 9235–9245.
- A. Bhattacharjee, W.G. Richards, J. Staunton, C. Li, S. Monti, P. Vasa, C. Ladd, J. Beheshti, R. Bueno, M. Gillette, M. Loda, G. Weber, E.J. Mark, E.S. Lander, W. Wong, B.E. Johnson, T.R. Golub, D.J. Sugarbaker, M. Meyerson, Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 13790–13795.
- T.R. Golub, D.K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J.P. Mesirov, H. Coller, M.L. Loh, J.R. Downing, M.A. Caligiuri, C.D. Bloomfield, E.S. Lander, Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, *Science* 286 (1999) 531–537.
- [63] S. Ramaswamy, P. Tamayo, R. Rifkin, S. Mukherjee, C.H. Yeang, M. Angelo, C. Ladd, M. Reich, E. Latulippe, J.P. Mesirov, T. Poggio, W. Gerald, M. Loda, E.S. Lander, T.R. Golub, Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 15149–15154.
- [64] C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406 (2000) 747–752.
- [65] A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J. Hudson Jr., L. Lu, D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, L.M. Staudt, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature* 403 (2000) 503–511.
- [66] P. Tamayo, D. Slonim, J. Mesirov, Q. Zhu, S. Kitarawan, E. Dmitrovsky, E.S. Lander, T.R. Golub, Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 2907–2912.
- [67] L.J. 't Veer, H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A. Hart, M. Mao, H.L. Peterse, K. van der Kooij, M.J. Marton, A.T. Witteveen, G.J. Schreiber, R.M. Kerkhoven, C. Roberts, P.S. Linsley, R. Bernards, S.H. Friend, Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature* 415 (2002) 530–536.
- [68] F.S. Monteclaro, P.K. Vogt, A Jun-binding protein related to a putative tumor suppressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6726–6730.
- [69] B. Mann, M. Gelas, A. Siedow, M.L. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W.F. Bodmer, M.P. Moyer, E.O. Riecken, H.J. Buhr, C. Hanski, Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 1603–1608.
- [70] T. Kato, S. Satoh, H. Okabe, O. Kitahara, K. Ono, C. Kihara, T. Tanaka, T. Tsunoda, Y. Yamaoka, Y. Nakamura, Y. Furukawa, Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis, *Neoplasia* 3 (2001) 4–9.