

NELSON RANNIERI TIRONE

Expressão local de interferon alfa, dos receptores de interferon alfa (IFNAR) e da enzima 2'5'Oligoadenilato sintetase em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração Patologia Clínica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Uberaba/MG

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

**À minha família, que me
dedica apoio durante
todos os passos de minha
vida.**

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Agradecimentos

À Professora Dra. Márcia Antoniazi Michelin, obrigado pelo exemplo de professor, profissional e ser humano.

Ao Professor Dr. Eddie Fernando Cândido Murta minha gratidão pelo incentivo, amizade, ensinamentos e exemplo de professor pesquisador.

Ao Professor Dr. André Luiz Pedrosa pela ajuda na área de biologia molecular.

Ao Professor Dr. Virmondes Rodrigues Junior por ter cedido o laboratório de Imunologia para desenvolvimento de parte do meu trabalho.

À Dra. Ana Cristina Macedo Barcelos por sua grande colaboração na coleta das amostras imprescindíveis para realização deste trabalho.

As amigas Betânea Crema Peghini e Cláudia Mendonça Rodrigues pela enorme ajuda dispensada em todos os momentos da realização do trabalho.

Ao estimado Celso Tadeu Barbosa dos Santos pelo auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Imunologia, Betania Maria Ribeiro, Mônica Miguel Sawan, Carlos Alberto Mota pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos Pós-graduandos, Cristina Wide, Lúcio Castellano, Bruna França, Karine Resende pela boa convivência e amizade.

A Nelma e Denise pela atenção dispensada na pós-graduação.

À Minha família que sempre me dedicou apoio e amor.

Ao apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

RESUMO

O interferon - alfa (IFN- α) é uma glicoproteína pertencente à família das citocinas que participa no controle e na replicação celular, na defesa do hospedeiro contra organismos estranhos, como vírus ou bactérias. Embora o IFN- α tenha sido inicialmente conhecido pela propriedade antiviral, numerosas investigações posteriores mostraram que o IFN está envolvido na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório. O IFN- α interage com os receptores de interferon alfa (IFNAR 1 e 2) que são expressos em vários tipos de células do organismo incluindo células tumorais e do sistema imune. A síntese de proteínas envolvidas na resistência intracelular contra vírus inclui a produção de 2'5'OAS. Esta enzima se liga com alta afinidade a uma RNase L e endoribonuclease que catalisa a clivagem das fitas simples de RNA levando a inibição das proteínas virais.

Na literatura não existem relatos de avaliação da expressão dos genes do receptor de interferon alfa e da enzima 2'5'OAS em células de neoplasia intraepitelial cervical, despertando-nos a intenção de estudar e correlacionar se a expressão dos receptores, ou uma possível disfunção na transdução do sinal intracelular, que por consequência levaria a uma diminuição da ativação da enzima, seriam fatores que contribuem para dificultar a eliminação do HPV ou atuariam como facilitador na evolução das células epiteliais para lesões neoplásicas.

O presente trabalho avaliou por RT-PCR a expressão do RNAm do IFN- α , dos receptores de Interferon alfa (IFNAR1 e IFNAR2) e a expressão de um dos elementos responsivos pelo estímulo de interferon (ISRE) presente nas regiões dos genes induzidos pelo IFN- α ; através da expressão do RNAm da enzima 2'5' Oligoadenilato sintetase (2'5'OAS) em biopsias de pacientes em diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, II e III).

Biopsia do colo uterino era coletada em mulheres com NIC I, II E III (n=28) e controles (n=17) sem lesão ou infecção por HPV. A presença do DNA do HPV de alto e baixo risco foi determinada por Captura híbrida. Níveis de mRNA do IFNAR1, IFNAR2, IFN- α e 2'5'OAS eram determinados por RT-PCR. Após a transcrição o cDNA foi submetido à amplificação com *primers* específicos.

Na pesquisa da expressão do receptor de interferon alfa 1 (IFNAR1) as amostras controles apresentaram uma maior expressão do receptor 58,3%(10/17), enquanto nas amostras NIC 14,2% (4/28) expressavam o RNAm do receptor; p=0.0018. A expressão do IFNAR2 foi maior também nas amostras controles 64,7% (11/17) que nos pacientes com lesões 7,1% (2/28), p=0.0018. A expressão simultânea dos dois receptores foi observada apenas no grupo controle 47,0% (8/17), p=0.0001. Os resultados para o IFN- α mostram a presença do fragmento em 14,2% (4/28) das amostras de NIC, sem expressão no grupo controle e a expressão dos níveis da enzima 2'5'OAS foi de 28,5% (8/28) nas amostras de NIC e de 11,7% (2/17) nas amostras do grupo controle, p=n.s.

Com o presente estudo podemos concluir que as amostras de NIC apresentavam o DNA do HPV em 50% (14/28), as amostras obtidas de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical apresentam uma baixa expressão do RNA mensageiro do receptor de interferon subunidade 1 e 2. A expressão simultânea das duas subunidades dos receptores foi encontrada apenas no grupo controle. Não houve diferença significativa da expressão do RNA mensageiro do IFN- α e da enzima 2'5'OAS entre os grupos controle e NIC.

Palavras-Chave: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Interferon alfa. Receptores de interferon, 2'5'Oligoadenilato sintetase.

ABSTRACT

Interferon- α (IFN- α) is a glycoprotein belonged to a family of cytokines which participate in the control and cell replication in the defence of hostess against strange organisms, as virus or bacteria. Although the IFN- α has been known by antiviral property, numerous investigations afterward showed that the IFN is involved on regulation cell growth and on immunomodulatory effect. The IFN- α engage with the receptors of interferon alpha (IFNAR 1 and 2) with are expresses many types of cells of organism including growth cells and immune system. The synthesis of protein involved in intracellular resistance against virus includes the production of 2'5' OAS. This enzyme binds with high affinity to RNase L and endoribonuclease that bunch the signs of single stranded of RNA taking the inhibition of viral proteins.

In the literature there aren't reports about evaluation of expression of genes receptors of interferon alpha and enzyme 2',5' OAS in cells of cervical intraepithelial neoplasia wake up us to the intention of study and corelation themselves to expression of receivers, or a possible disfunction in translate of sign intracell, that consequence will take a minus ativation of enzyme, factors would be contribute to difficult the extinction of HPV or will act as a facilitator in evolution of epithelials cells to neoplasics injuries.

The present work evaluated for RT-PCR the expression of mRNA of IFN- α , the receptors of Interferon alpha (IFNAR 1 and IFNAR 2) and the expression of one of responsible elements encouragement of interferon (ISRE) to be present in regions of genes induced by IFN- α ; through of the expression of mRNA of enzyme 2' 5' oligoadenilato synthetase (2',5' OAS) in biopsies of patients in different levels of cervical intraepithelial neoplasia (CIN I, II and III).

Biopsies of uterine cervix was collected in women with CIN I, II and III (n=28) and controls (n= 17) without injury or infection by HPV. The presence of DNA of HPV with high and low risk was determined by hybrid capture. Levels of mRNA of IFNAR 1, IFNAR 2, IFN- α and 2'5'OAS were determined by RT-PCR. After the transcription the cDNA was submitted to amplification with specifics primers.

In the research of expression of the interferon receptor alpha 1 (IFNAR 1) the sample controls showed greater expression of the receptor 58,3% (10/17), while in the sample CIN 14,2% (4/28) expressed the mRNA of the receptor; p=0.0018. The expression of IFNAR2 was bigger also in the sample controls 64,7% (11/17) than in the patients with injuries 7,1% (2/28), p=0.0018. The simultaneous expression of two receptor was observed only in the control group 47,0% (8/17), p=0.0001. The results for the IFN- α show the presence of the fragment in 14,2% (4/28) of sample of CIN, without expression in the control group and the expression of levels of enzyme 2'5'OAS was 28,5% (8/28) in the samples of CIN and 11,7% (2/17) in the samples of control group, p=n.s.

With the present study we can conclude that the samples of CIN showed the DNA of HPV in 50% (14/28), the samples have gotten of patients with cervical intraepithelial neoplasia showed one low expression of RNA messenger of the receptor of interferon subunit 1 and 2. The simultaneous expression of two subunits of receptors were found only in control group. There wasn't significant difference of expression of RNA messenger of IFN- α and of enzyme 2'5'OAS between the control groups and CIN.

Key-Words: Cervical Intraepithelial Neoplasia. Interferon alpha. Interferon alpha receptor. 2'5'Oligoadenylate Synthetase

Lista de Ilustrações

Figura 1. Produção e Ação do Interferon tipo I humano.....	20
Figura 2. Via de transdução do sinal intracelular após ligação do interferon- α no receptor.....	24
Figura 3. Esquema ilustrativo da função de algumas proteínas induzidas pelo IFN para atividade antiviral.....	26
Figura 4. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. 2'5'OAS, amostras grupo controle.....	46
Figura 5. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. 2'5'OAS, amostras de NIC.....	47
Figura 6. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. IFNAR 1, amostras grupo controle.....	48
Figura 7. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. IFNAR 1, amostras de NIC.....	48
Figura 8. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. IFNAR 2, amostras do grupo controle.....	49
Figura 9. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. IFNAR 2, amostras de NIC.....	50
Figura 10. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. IFN- α , amostras grupo NIC e controle.....	52
Figura 11. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato	

de prata para análise dos produtos da PCR. beta Actina, amostras NIC e grupo controle.....	53
--	----

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1. Membros da família de Interferon humano.....	19
Tabela 2. Efeitos do Interferon alfa no sistema imune.....	21
Tabela 3. Indivíduos utilizados no estudo e respectivos resultados de exame anatomopatológico.....	34
Tabela 4. Expressão do receptor de interferon alfa e enzima 2'5'OAS nas amostras do grupo controle.....	51
Tabela 5. Resultados obtidos no estudo.....	54
Tabela 6. Pacientes com diagnóstico anatomopatológico de NIC e respectivos resultados de Receptor de Interferon 1 e 2, enzima 2'5'OAS, Interferon alfa, caputro híbrida para HPV e beta actina.....	55
Quadro 1. Grupo de Pacientes envolvidas no estudo com os respectivos exames e Materiais á serem coletados.....	33
Quadro 2. Características dos iniciadores sintetizados para a amplificação dos fragmentos específicos de cDNA.....	41

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A – Adenina

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

α - Alfa

C – Citosina

CD – *Cluster Differentiation*

cDNA – Ácido desoxiribonucleico complementar

CTL – Linfócito T Citotóxico

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxiribonucleico

dNTP - desoxinucleotídeo trifosfatado

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

ϵ - Epsilon

et al – e colaboradores

γ - Gama

g - Grama

G – Guanina

HE – Hospital Escola

HCV – vírus da hepatite C

HPV – Papiloma Vírus Humano

IFN – Interferon

IFNAR – Receptor de Interferon Alfa

IL – Interleucina

IPON – Instituto de Pesquisa em Oncologia

IRF – *Interferon Regulatory Factor*

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

ISG – *Interferon Stimulated Gene*

ISGF – *Interferon Stimulated Gene Factor*

ISRE – *Interferon Stimulated Response Element*

JAK – Janus Kinase

Kb - Kilobases

KCl- cloreto de potássio

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

mg – micrograma (s)

MgCl – Cloreto de Magnésio

mL – mililitro (s)

mM – milimolar

M – Molar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

Mx – *Mixovirus-Resistance Proteins*

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

ng – nanograma

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

NK – Natural Killer

nm – nanômetros

Pb – par de base

PAMAP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH - potencial de hidrogênio iônico

PKR – Proteína Kinase R

pmol – picomol

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

RAG – Gene Ativador Recombinante

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

SOCS - Proteínas supressoras de sinalização de citocinas

STAT – *Signal Transduction and Activation of Transcription*

T – Timina

TBE – solução de tris, EDTA e ácido bórico

TCR – Receptor de Células T

TE – solução de Tris, EDTA

TNF – Fator de Necrose Tumoral

Tris – hidroximetil amino metano

TYK – Tirosina Kinase

U – unidade

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

β - beta

μ L – microlitro (s)

2'5'OAS – 2'5'Oligoadenilato Sintetase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Sistema Imunológico e Câncer.....	13
1.2 Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	14
1.3 Papiloma Vírus Humano – HPV.....	15
1.4 Resposta Imune ao Papiloma Vírus Humano.....	17
1.5 Citocinas.....	17
1.6 Interferons – IFNs.....	18
1.7 Receptores de Interferon – IFN AR.....	22
1.8 O sistema 2',5' Oligoadelinalto sitetase (2',5'OAS).....	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivos Gerais.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Indivíduos da Pesquisa.....	32
4.2 Colposcopia.....	34
4.3 Extração de RNA e DNA dos fragmentos armazenados.....	35
4.3.1 Obtenção do RNA.....	35
4.3.2 Obtenção do DNA.....	36
4.4 Transcrição Reversa de RNA para DNA complementar.....	36
4.5 Protocolo de PCR.....	37
4.5.1. Avaliação da expressão gênica da 2'5'-OAS	37
4.5.2. Avaliação da expressão gênica do IFNAR 2.....	38
4.5.3. Avaliação da expressão gênica do IFNAR 1.....	39
4.5.4. Avaliação da expressão gênica do Interferon alfa.....	40
4.6 Detecção dos Produtos Amplificados.....	41
4.7. Pesquisa do DNA do HPV por captura híbrida (CH).....	42
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6.0 RESULTADOS.....	46

6.1. Expressão da enzima 2'5'Oligoadenilato sintetase.....	46
6.2. Expressão dos receptores de interferon.....	47
6.2.1. Expressão do receptor de Interferon alfa subunidade 1.....	47
6.2.2. Expressão do receptor de Interferon alfa subunidade 2.....	49
6.3 Expressão do Interferon alfa (IFN- α).....	51
6.4 beta Actina.....	52
6.5 Pesquisa do DNA do HPV por captura híbrida.....	54
 7.0 DISCUSSÃO.....	 57
 8.0 CONCLUSÕES.....	 63
 REFERÊNCIAS.....	 64

Introdução

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Imunológico e Câncer

A imunidade inata (natural) é a ação do sistema imune à infecção que ocorre quando os patógenos entram em contato pela primeira vez com o organismo. O sistema imune inato possui uma pequena quantidade de receptores, mas estes reconhecem uma grande variedade de patógenos, sendo isto possível porque estes receptores reconhecem padrões moleculares comuns associados a patógenos (PAMPs), que não são apresentados pelas células do hospedeiro, o que torna impróprio denominar a resposta imune inata de inespecífica. A resposta imune adquirida é altamente específica aos patógenos e com capacidade especializada de tornar-se mais eficiente a cada contato subsequente. Muitas infecções são detectadas pelo sistema imune inato e controladas rapidamente, sendo importante inclusive na indução da resposta imune adquirida por meio da expressão de citocinas e moléculas de adesão.

De forma semelhante à utilizada pelo sistema imunológico nas ações contra agentes infecciosos, é bastante discutido e estudado que ocorra um sistemático controle contra o aparecimento e progressão dos tumores, os dados levantados na literatura têm demonstrado uma constante pesquisa em determinar o papel do sistema imunológico e os mecanismos que o regulam na luta contra os tumores. É bem estabelecido e aceito que os fenômenos celulares intrínsecos que determinam o início do aparecimento de células tumorais provêm do crescimento do próprio tecido, ignorando sinais inibitórios de crescimento, assim evitando a morte das células cancerígenas que se reproduzem sem limites, sustentadas pela angiogênese e invadindo os tecidos (HANAHAHAN et al., 2000).

Numerosas células efectoras da resposta imune inata e adaptativa participam no reconhecimento e destruição das células neoplásicas. Camundongos faltando os seguintes

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

componentes: o gene ativador-recombinante 2 (RAG2), a falta do mesmo resulta na diminuição de células T, B e *natural killer*; a falta da cadeia - γ do receptor de células T (TCR γ) e falta do receptor de interferon do tipo I, esse exemplos e outros descritos na revisão de Zitvogel e colaboradores (2006) demonstram que esses modelos experimentais são mais susceptíveis ao aparecimento de tumores.

Os tumores ao se iniciarem no organismo são reconhecidos pelo sistema imune, porém muitos tumores não são completamente rejeitados pelo nosso organismo e o câncer progride, há uma crescente idéia de que muitas repostas imunológicas definidas como mecanismo efector anti-tumor haja como uma “faca de dois cortes” onde frente a diferentes condições orgânicas podem se tornar ineficaz ou até mesmo a favor do tumor (PAWELEC, 2004). Dessa forma pode-se fazer uma analogia com as lesões pré-neoplásicas que precedem o câncer invasivo do colo uterino, onde algumas evoluem para o câncer e outras regredem espontaneamente despertando a pesquisa sobre atuação do sistema imunológico e os mecanismos que o regulam.

1.2. Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)

As neoplasias invasivas do colo do útero normalmente são precedidas por um período longo de tempo pela lesão pré-invasiva. Estas lesões se caracterizam por uma gama de eventos que progridem de atipias celulares de graus variados a displasia ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC). O termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido em 1968 para indicar atipia celular limitada ao epitélio.

A NIC foi dividida em graus 1, 2 e 3. A NIC 1 corresponde à displasia leve, a NIC 2 à displasia moderada e a NIC 3 à displasia grave (RICHART, 1968). O sistema Bethesda foi introduzido para diagnóstico citológico cérvico-vaginal em 1988 e tem como objetivo fornecer uma uniformização da terminologia, atualmente segue-se o consenso publicado em

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

“Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's” A.Sarras - USA

2001 que classifica lesão intraepitelial cervical de baixo grau (LSIL) que inclui alterações leves associadas ao HPV, displasia moderada e NIC 1. E lesão intraepitelial cervical de alto grau (HSIL) que inclui displasia severa e moderada, carcinoma “*in situ*”, NIC 2 e 3 (SOLOMON et al., 2001).

A NIC é identificada mediante o exame microscópico das células cervicais em um esfregaço citológico corado pela técnica de Papanicolaou ou em preparados citológicos do tecido que permite o exame de várias outras características para o diagnóstico da NIC e sua classificação com sendo confirmação realizada pelo estudo anatomopatológico.

O aumento de volume nuclear com variação no tamanho e forma é uma característica regular de todas as células consideradas atípicas, a hipercromasia é outra característica marcante e distribuição irregular de cromatina com grumos pode estar presente em células displásicas. Núcleos anormais em células superficiais ou intermediárias indicam uma NIC de baixo grau, enquanto que a anomalia em núcleos de células basais e parabasais indicam NIC de alto grau. A quantidade de citoplasma com relação ao tamanho do núcleo (razão núcleo-citoplasma) é uma das características mais importantes para avaliar o grau da NIC (MITCHELL et al., 1998).

Estudos epidemiológicos identificaram vários fatores de risco que contribuem ao desenvolvimento de lesões precursoras da neoplasia do colo uterino e a própria neoplasia do colo uterino. Estas incluem infecção por certos tipos oncogênicos de papilomavírus humano (HPV), relação sexual precoce, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo, baixo nível socioeconômico, infecção por *Chlamydia trachomatis*, deficiência de micronutrientes e uma dieta deficiente em vegetais e frutas. O HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são significativamente associados com NIC e neoplasia invasiva (WALBOOMERS et al., 1999).

1.3. Papiloma Vírus Humano - HPV

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

O HPV pertence à família *Papovaviridae*, é um DNA vírus, epiteliotrófico, transmitido sexualmente (ZUR HAUSEN; DeVILLIERS, 1994), que causa aproximadamente 400 mil novos casos de câncer cervical no mundo a cada ano (PISANI et al., 1999). Esta família de vírus infecta uma grande variedade de organismo de uma forma espécie-específica, sendo que em humanos existem mais de 100 subtipos descritos. Apesar de a maioria induzir papilomas benignos, existe alguns classificados como de alto risco que contribuem para o desenvolvimento de câncer anogenital, como o HPV 16, 18, 45, e 56, que ao infectarem as células epiteliais podem dar origem à transformação maligna (SCHIFFMAN et al., 1995).

Os vírus desta família possuem como material genético uma dupla fita de DNA de aproximadamente 8kB, sendo sua organização genômica similar nos diferentes tipos de HPV. Basicamente são três regiões principais, a primeira contendo genes LCR que regulam a expressão dos genes virais; a segunda região dos genes E (E1-E7) que controlam o ciclo de vida do vírus, e a terceira cujos genes (L1 e L2) codificam proteínas do capsídio. Dentre estes genes tem sido de particular interesse o E6 e o E7 presente no subtipo 16, que é o mais prevalente (DeVILLIERS et al., 2004).

Ao infectar a célula o DNA viral pode assumir duas formas: a episomal e a integrada. Na forma episomal, o DNA viral permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, não integrado a seu DNA. Essa forma é encontrada nas verrugas genitais e lesões de menor gravidade. Para a integração do genoma circular ao DNA da célula hospedeira, esse deve ser linearizado, pela quebra do DNA viral entre a região E1 e L1 (DeVILLIERS et al., 2004). A integração do DNA viral pode se dar em sítios “frágeis” do DNA da célula hospedeira (POPESCU et al, 1990), mas pode ocorrer randomicamente com a sequência viral. Contudo, aqueles eventos de integração que promovem o início da expressão dos genes da região E1/E2 são selecionados, pois eles promovem o crescimento celular. Assim sendo, ocorre a transcrição dos genes E6 e E7 para RNA e um aumento destas proteínas no interior celular,

que por sua vez, são capazes de induzir instabilidade genética e contribuem para a evolução clonal do câncer (JEON; LAMBERT, 1995).

1.4. Resposta Imune ao Papiloma Vírus Humano

Vários componentes da resposta imune inata e adaptativa são mobilizados para o reconhecimento das infecções por HPV e para eliminar as células infectadas pelo vírus. A primeira linha de defesa consiste na resposta imune inata que ocorre na epiderme e no epitélio das mucosas (UTHAISANGSOOK et al., 2002; JANEWAY et al., 2002).

A imunidade inata ao HPV é mediada por vários mecanismos, incluindo indução de interferon (IFN) e ativação de macrófagos e células NK (natural killer), uma das funções mais importante do interferon é exercer ação antiviral, e das células NK é a de matar células infectadas por vírus, logo no início do curso da infecção, antes de se iniciar a resposta imune específica. Contudo, algumas infecções por HPV não são rapidamente eliminadas pela imunidade da mucosa. De fato, a expressão crônica de HPV á baixos níveis pode induzir tolerância ao epitélio infectado (DOAN et al., 1999). Estudos recentes descrevem como o HPV interage com o sistema imune e como o vírus pode evadir ou inativar a resposta imune adquirida (TINDLE, 2002; FRAZER et al., 1999). Existem várias razões para isto, que estão diretamente ligadas ao ciclo de vida do vírus, primeiro, o vírus não tem uma fase de disseminação sanguínea; segundo, não causa lise dos queratinócitos, e, portanto não induz uma resposta inflamatória; e terceiro, a produção e liberação do vírus se dá nas células escamosas diferenciadas que são distantes das citocinas e células imunocompetentes na submucosa (STANLEY, 2001; STERN et al., 2000; KONYA; DILLNER, 2001).

1.5. Citocinas

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

As citocinas são hormônios protéicos produzidos durante a fase de ativação e efetora da imunidade inata e específica. As respostas imunes são mediadas pela liberação de diferentes citocinas que podem influenciar na síntese e ação umas das outras formando um sistema de inter-relação das citocinas imunorreguladoras.

As citocinas produzidas após uma infecção são classificadas como imuno-estimulante do tipo Th1 que são os interferons (IFNs), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-2 (IL-2) e interleucina-12 (IL-12) que induzem principalmente imunidade celular, e citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10) que são inibidoras da resposta imune mediada por células e predominantemente induzem resposta humoral (CLERICI et al., 1994; MOSMANN et al., 1996; SPELLBERG et al., 2001).

Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam as moléculas CD4 e CD25 e produzem IL-10 e/ou TGF- β , chamado de resposta Th3, estão envolvidas em modular a resposta imune, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e de doenças auto-imunes (MILLS; McGUIRK, 2004; WEINER, 2001).

1.6. Interferons – IFN

Os interferons são glicoproteínas com peso molecular entre 15 e 21 KD pertencente à família das citocinas que participam no controle e na replicação celular e na defesa do hospedeiro contra organismos estranhos, como vírus ou bactérias. Embora o IFN tenha sido inicialmente conhecido pela propriedade antiviral, numerosas investigações posteriores mostraram que o IFN está envolvido na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório (GOODBURN et al., 2000; STARK et al, 1998).

Os interferons são divididos em dois grupos: tipo I que inclui o IFN- α e β e são produzidos pelos leucócitos, células epiteliais e fibroblastos e contribuem para a primeira

por vírus (De MARCO et al., 1999; SAMUEL, 2001). O IFN tipo II também é denominado de IFN- γ ou IFN imune. Ele é induzido por linfócitos T auxiliar Th1 CD4⁺, sendo produzido principalmente por quase todas as células T CD8⁺ estimuladas por antígenos estranhos e células NK (TAKAOKA et al., 2006). A tabela 1 resume as informações básicas do IFN humano:

Tabela 1. Membros da família de Interferon humano.

Tipo	Subtipos de IFNs	Receptores	Lócus Gênico	Peso Molecular (kDa)
I	IFN- α	IFNAR-1/IFNAR-2	9p21	15 - 23
	IFN- β	IFNAR-1/IFNAR-2	9p21	15 – 23
	IFN- ε	IFNAR-1/IFNAR-2	9P21	24.4
II	IFN- γ	IFNGR-1/IFNGR-2	12q24.1	34

Adaptado de TAKAOKA, 2006.

A ação antiviral do interferon é primariamente parácrina, pois uma célula secreta interferon para proteger as células vizinhas não infectadas. É descrito na literatura que uma célula que tenha respondido ao IFN e seja resistente à infecção viral, esteja em um estado considerado antiviral (SAMUEL, 2001; STARK et al., 1998). A produção inicial ou a administração do IFN exógeno age via receptores específicos das células, ativando determinados sistemas que propagam sinais ao núcleo e induzem a expressão dos genes que codificam várias proteínas que promovem as ações defensivas.

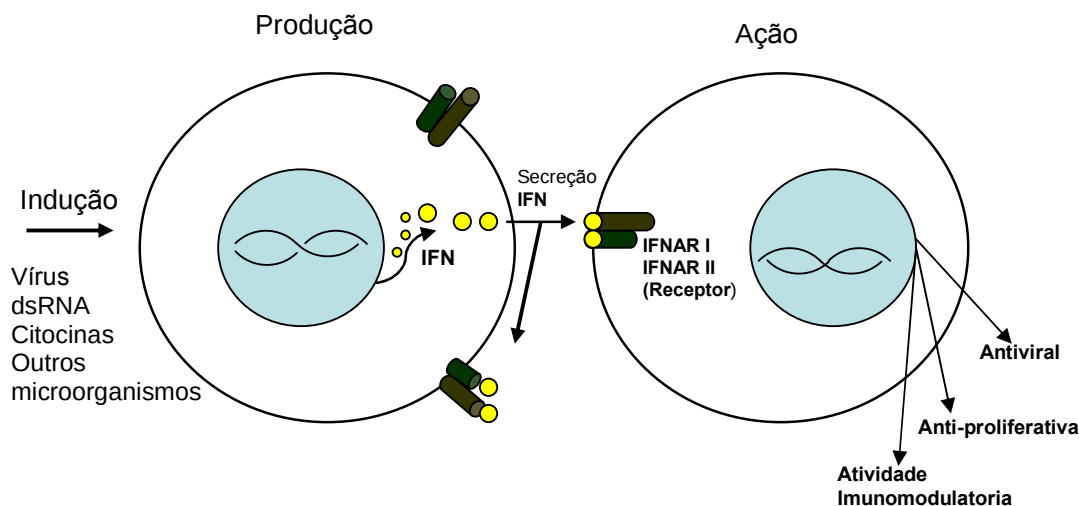


Figura 1. Produção e Ação do Interferon tipo I humano.

Os interferons podem influenciar na diferenciação, proliferação e função de vários tipos de células do sistema imune (TOUGH et al., 1999). Interferons α/β tem demonstrado um aumento da atividade lítica das células NK e linfócitos T citotóxicos, as células NK podem ser ativadas pelo reconhecimento direto dos tumores, ou como consequência da ação de IFN e outras citocinas produzidas pelos linfócitos T (BLACKMAN et al., 1985). As células NK não lisam células não infectadas porque percebe um sinal inibitório pelo reconhecimento de peptídeos próprios em complexo com moléculas do MHC classe I na superfície da célula alvo. Ao contrário as células infectadas por vírus podem se lisadas porque o sinal inibitório está ausente, seja porque os peptídeos próprios foram substituídos pelos peptídeos derivados das proteínas virais (REITER, 1993).

Contribuindo com a resposta imune celular os Interferons α/β modulam a expressão das moléculas de classe I do MHC. Como a maioria dos linfócitos T citolíticos (CTLs) reconhece antígenos estranhos ligados a moléculas de MHC classe I, os Interferons α/β impulsionam a fase efetora das respostas imunes celulares (YORK; ROCK, 1996).

Os interferons foram descobertos há aproximadamente 50 anos atrás em estudos do fenômeno de interferência viral, nesse estudo observou-se que a membrana de embrião de

galinha incubada com vírus influenza inativado pelo calor, produzia à nova membrana uma resistência à infecção por vírus (ISAACS; LINDENMANN, 1957), desde então vêm sendo desenvolvidos estudos *in vitro* e em animais onde o tratamento com interferons se demonstrara eficientes contra tumor, logo estudos clínicos evoluíram e utilizaram interferons no tratamento de pacientes com câncer (EINHORN, 1993).

Tabela 2. Efeitos do Interferon- α no sistema imune.

Aumento de antígenos de membrana, especialmente MHC classe I e molécula de adesão nas células tumorais e células efectoras

Promoção de diferenciação de linfócitos

Ativação de células efectoras

Aumento da atividade de células NK

Ativação de macrófagos

Estímulo para geração de célula T

Efeito na função múltipla de linfócitos

Citotoxicidade

Produção de citocinas

Efeito na proliferação de linfócitos

Inibição de proliferação de linfócitos ativados *in vitro*

Aumento em número de célula NK *in vivo*

Efeito em células endoteliais

Antiangiogênese

Aumento de molécula de adesão celular

Adaptado de Herberman (1997)

O tratamento com IFN tem demonstrado resultados satisfatórios em pacientes com carcinoma epidermoide de vagina (MURTA E.F.; TAVARES-MURTA, 2004), câncer colo

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

retal (GREENBLAT et al., 1995) e pancreático, onde os efeitos antiproliferativo e apoptótico foram demonstrados em todas as células que expressavam os receptores de IFNs em linhagem de células de câncer pancreático (SAIDI et al., 2006).

As proteínas E6 e E7 produzida pelo HPV também podem influenciar na progressão de lesões para a neoplasia atuando no controle do ciclo celular, a proteína E6 do HPV-16 é direcionada contra a proteína supressora de tumor (p53) formando um complexo e causando sua degradação (WERNESSE et al., 1990) a habilidade da E6 mediar essa degradação é muito importante, considerando que a p53 é responsável pela apoptose e prevenção da proliferação de células anormais (ASHCROFT et al., 1997) e sua falta assegura a sobrevivência de células anormais e infectadas, permitindo que o vírus escape da resposta antiviral normal (RONCO et al., 1998; HISCOTT et al., 1999). A partir dos dados levantados acima nos despertou a intenção de pesquisar algumas possibilidades pela qual poderia ocorrer uma diminuição na atividade biológica do IFN e se esta diminuição poderia estar envolvida também com os receptores celulares para IFN.

1.7. Receptores de Interferon - α (IFNAR)

Os receptores para interferon - alfa são elementos de extrema importância para o bom desenvolvimento das ações biológicas promovidas pelo IFN, modificações na ligação do IFN ao receptor podem ser limitantes no processo de ativação das ações antivirais. Os receptores de interferons tipo I (α / β) são membros da família classe II dos receptores de citocinas, são formados de duas subunidades compostos por cadeias polipeptídicas denominados IFNAR-1 uma glicoproteína de 557 aminoácidos com 21 aminoácidos no seguimento transmembrana e 100 aminoácidos no domínio citoplasmático, e IFNAR-2 que existe em três formas distintas, IFNAR-2a (forma curta), IFNAR-2b (forma solúvel) e IFNAR-2c (forma longa) contendo 515

aminoácidos e age como o principal receptor funcional para IFN (CHIEUX, 1999; NOVICK et al., 1994).

Os receptores de IFN são expressos amplamente na maioria das células do organismo (KIM et al., 1997). Os domínios transmembrânicos dos receptores de interferon não exibem atividade enzimática intrínseca, porém os domínios citoplasmáticos do IFNAR-1 se associa de forma não covalente com a enzima tirosina Quinase (TYK), e o IFNAR-2 com Janus Quinase (JAK) (UZE et. al., 1992, STARK et al., 1998), essa interação do IFN em seus receptores ativando as proteínas JAK / TYK causam a fosforilação da subunidade intracelular do receptor em resíduos de tirosina. Além de tirosina quinase, tirosinas fosfatases se associam com o complexo funcional na região citoplasmática dos receptores de IFN tipo I para regular a associação de (TYK) e (JAK) na sinalização do IFN (PLATANIAS, 2003; PLATANIAS, 2005). Os resíduos de fosfotirosina recrutam as proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STAT) que consiste das proteínas: STAT1- α (91 kD) uma isoforma STAT1- β (89 kD), STAT2 (113 kD) e p48 (48kD) conhecida como fator regulador de interferon (IRF), esse conjunto de proteínas é chamado fator 3 estimulador do gene de interferon (ISGF-3), que está presente no núcleo das células ativadas por IFN (MALMGAARD, 2004; AARONSON, 2002).

Alguns resíduos de tirosinas provenientes da subunidade intracelular do receptor ligam-se as proteínas STAT, posteriormente o domínio SH2 da STAT1 liga-se ao resíduo da tirosina na STAT2, a proteína p48 liga-se ao heterodímero STAT1/STAT2 que migram para o núcleo agindo como um fator de transcrição dos genes que contém a sequência de consenso (GAAAN(N) GAAA) chamado elemento responsável pelo interferon (ISRE) (HORVARTH et al., 1994, GOODBOURN, 2000; GRANDVAUX, 2002).

A importância dos receptores na sinalização mediada por interferon é bem destacada pela observação que na ausência de qualquer cadeia do receptor, não há afinidade para ligação do IFN, conseqüentemente ativação das proteínas quinases (IAK/TYK) e STATs requeridas

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

está diminuída, com isso não há o desenvolvimento de nenhuma ação biológica do interferon (UZE et al., 1992).

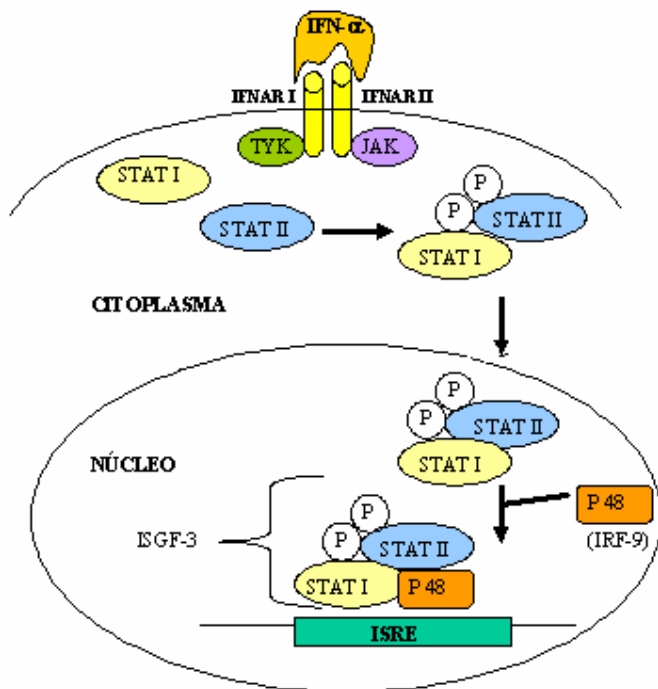


Figura 2. Via de transdução do sinal intracelular após ligação do interferon- α no receptor.

1.8. – O sistema 2'5' Oligoadenilato sintetase (2'5'OAS)

A indução da expressão dos elementos responsivos pelo estímulo de interferon (ISRE) presente nas regiões regulatórias de genes induzidos pelo IFN- α faz com que esses genes sejam transcritos e a seguir esses genes são traduzidos para proteínas efetoras como o sistema 2',5'OAS, proteína quinase R (PKR) e a proteína GTPase MX (PLATANIAS et al 1994, SAMUEL 2001).

A exposição de células humanas ao IFN- α induz a transcrição de três genes da enzima 2', 5'- oligadenilato sintetase resultando em oito a dez isoformas da enzima 2',5'OAS. A ação anti-viral dessa enzima é se ligar com alta afinidade a uma Ribonuclease Latente (RNase L) e induzir sua ativação por dimerização. A ativação da RNase L catalisa a clivagem do RNA ou

DNA viral interferindo na sua replicação (HASSEL et al., 1993; PLAYER et al. 1998; MALATHI et al., 2005).

Em um trabalho utilizando camundongos que não expressam os genes da enzima RNase L (RNase L^{-/-}) infectados com picornavirus, vírus causador da encéfalo-miocardite e Coxsakievirus, foi observado a sobrevivência viral (ZHOU et al., 1997; FLODSTROM-TULLBERG et al., 2005).

A atividade da RNase L tem demonstrado relação com o câncer. Um estudo demonstrou que ativação da Enzima RNase L pode contribuir com a indução da apoptose em linhagens de células de câncer de próstata (MALATHI et al., 2004), outro trabalho demonstrou que havia alta atividade enzimática e elevados níveis do mRNA da RNase L em pacientes com câncer colorretal comparado com células do mesmo tecido normal (WANG et al., 1995).

Na literatura pesquisada não existem relatos de avaliação da expressão dos genes do receptor de interferon alfa e da enzima 2',5'OAS em células de neoplasia intraepitelial cervical, despertando-nos a intenção de estudar e correlacionar se a expressão dos receptores, ou uma possível disfunção na transdução do sinal intracelular, que por consequência levaria a uma diminuição da ativação da enzima, seriam fatores que contribuem para dificultar a eliminação do HPV ou atuariam como facilitador na evolução das lesões neoplásicas.

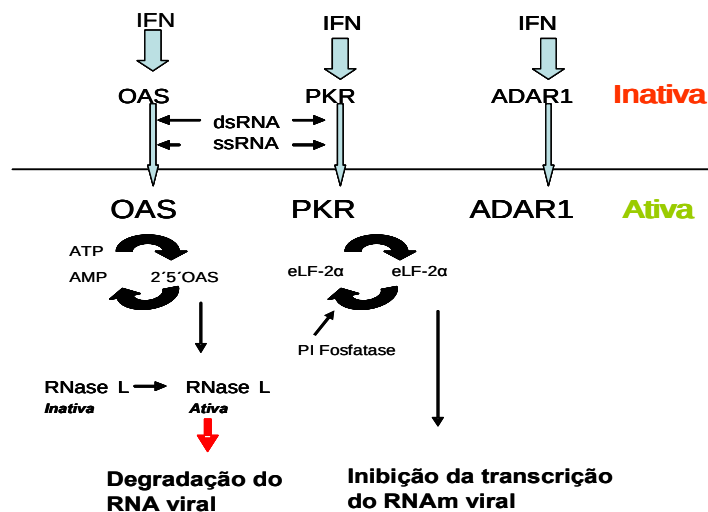


Figura 3. Esquema ilustrativo da função de proteínas induzidas pelo IFN para atividade antiviral.

Objetivos

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O objetivo do presente trabalho é avaliar a expressão do RNA mensageiro do Interferon alfa; dos receptores de Interferon alfa (IFNAR1 e IFNAR2) e avaliar a expressão de um dos elementos responsivos pelo estímulo de interferon (ISRE) presente nas regiões dos genes induzidos pelo IFN- α ; através da expressão do RNAm da enzima 2',5' Oligoadenilato sintetase (2',5'OAS) em biopsias de pacientes em diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, II e III).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar a presença do DNA do Papilomavírus humano (HPV) de alto ou baixo risco por captura híbrida.

Para avaliarmos a expressão do interferon, de seus receptores e um dos elementos responsivos pelo estímulo do interferon em células de neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, NIC II e NIC III), iremos investigar por RT-PCR:

- A expressão do RNAm dos receptores de interferon (IFNAR-1 e IFNAR-2c).
- A expressão do RNAm do sistema enzimático 2'-5'Oligoadenilato sintetase.
- A expressão do RNAm do Interferon alfa

Justificativa

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

3. JUSTIFICATIVA

O HPV, principalmente aqueles subtipos considerados de alto risco (16 e 18) estão intimamente associado com lesões pré-neoplásicas que evoluem para câncer cervical, que é a segunda causa mais freqüente de morte em mulheres no mundo todo (MONIZ et al., 2003). A sua interação com o sistema imune tem sido estudada, contudo os resultados são inconclusivos, por vários motivos, mas principalmente, pela falta de dados sobre a resposta imune e sua regulação no aparelho reprodutor feminino e pelas características da infecção pelo HPV, pois em alguns casos este não desencadeia resposta inflamatória, e por conseqüência uma resposta específica e eficaz contra o vírus. Os interferons - α / β representam elementos essenciais de defesa contra vírus e outros patógenos no hospedeiro, ambos interferons estimulam a imunidade inata contra os vírus e alerta o organismo para montar uma resposta imune adaptativa adequada. Os IFNs agem via ligação em receptores específicos expressos nas células, desencadeando uma série de reações intracelulares que vão codificar várias proteínas para exercer suas funções. Paralelamente, sabe-se que as proteínas resultantes dos genes E6 e E7 do HPV podem inibir a função do interferon em exercer seus efeitos imunomodulatórios, antiproliferativo e antiviral nas células infectadas (GOODBURN et al., 2000). Assim sendo, pretendemos investigar os receptores do interferon e as suas vias de sinalização intracelular em células de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e correlacionar uma possível falha nos mecanismo de ação do interferon na predisposição e evolução das lesões intraepiteliais cervical. Esperamos a partir dos nosso estudos que os resultados possam facilitar o entendimento das causas que levam determinados organismos a não eliminarem as infecções por HPV e evoluírem para lesões pré-neoplásicas e posteriormente para o câncer.

MATERIAIS E MÉTODOS

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho obteve aprovação comitê de ética em pesquisa da UFTM. Para atingir os Objetivos propostos foi realizado um estudo pelo Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Ambulatório Maria da Glória. Neste estudo foram utilizados fragmentos coletados por biópsias do colo uterino de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical.

4.1 Indivíduos da Pesquisa

Os grupos de estudo foram compostos por pacientes com idade entre 18 e 50 anos com diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical graus I, II e III e um grupo de mulheres normais (sem infecções ou neoplasias) que foram utilizadas como controle e para avaliação dos aspectos imunológicos do aparelho reprodutor feminino, deve-se aqui ressaltar que o tecido colhido destas mulheres do grupo controle foi proveniente de cirurgias de histerectomia por outras causas, como por exemplo, miomas e sem alterações do colo uterino. De cada paciente foram obtidas informações sobre idade, hábitos e condições de vida (tabagismo, uso de drogas terapêuticas, número de parceiros), métodos contraceptivos usados, história de doenças sexualmente transmissíveis e uso de terapia de reposição hormonal. Todos os procedimentos realizados obedeceram aos critérios propostos pelo Comitê de Ética e com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de todas as pacientes.

Grupo	Anatomopatológico	Exames á serem realizados e Material á ser coletado
1 (n=17)	Normal, sem infecção ou neoplasia	Biópsia do tecido da endocérvice e ectocérvice para captura híbrida para HPV e realização de PCR e RT-PCR.
2 (n=28)	Neoplasia intraepitelial cervical I, II e III.	Biópsia do tecido da endocérvice e ectocérvice para captura híbrida para HPV e realização de PCR e RT-PCR.

Quadro 1. Grupo de Pacientes envolvidas no estudo com os respectivos exames e Materiais á serem coletados.

Os critérios para inclusão nos grupos foram: ausência de sangramento durante o exame, não utilização de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais durante os 30 dias anteriores; nenhuma atividade sexual por pelo menos dois dias antes do dia da coleta das amostras; e nenhuma história prévia de tratamento para HPV. Nas biópsias coletadas, também foram realizadas PCR para tipagem de HPV, e RT-PCR para avaliação da resposta imune. Para o grupo 1 (controle) o critério básico de inclusão é ausência de infecção por HPV e de co-infecções.

Tabela 3. Indivíduos utilizados no estudo e respectivos resultados de exame anatomopatológico.

	Anatomopatológico
1	HPV / NIC I
2	HPV / NIC I
3	NIC I
4	HPV / NIC I
5	NIC I
6	HPV / NIC I
7	HPV / NIC I
8	HPV / NIC II
9	HPV / NIC II
10	NIC II
11	NIC II
12	HPV / NIC II
13	HPV / NIC III
14	HPV / NIC III
15	HPV / NIC III
16	NIC III
17	HPV / NIC III
18	HPV / NIC III
19	HPV / NIC III
20	HPV / NIC III
21	HPV / NIC III
22	HPV / NIC III
23	HPV / NIC III
24	HPV / NIC III
25	NIC III
26	HPV / NIC III
27	HPV / NIC III
28	HPV / NIC III

4.2. Colposcopia

As pacientes selecionadas de acordo com os critérios descritos acima foram encaminhadas ao setor de Colposcopia do HE-UFTM para realização deste exame. Aquelas pacientes que apresentaram alterações no exame colposcópico foram submetida, mediante consentimento livre e esclarecido, a coleta de biópsia do colo uterino para realização do PCR e do RT-PCR. Os fragmentos coletados foram incluídos em 1,0 ml de TRIZOL® (Invitrogen™, life technologies, Carlsbad, Califórnia, USA), para extração do DNA e RNA

4.3. Extração de RNA e DNA dos fragmentos armazenados em TRIZOL[®] utilizando o protocolo da Invitrogen[™] life technologies

As amostras inclusas em TRIZOL[®] foram submetidas à sonicação por aproximadamente 30 minutos por 50 Watts em temperatura ambiente para a decomposição da arquitetura da peça. Após este processo foi aspirado todo o TRIZOL[®] sonicado transferindo-o para um novo tubo plástico estéril, ficando somente a parte da peça que não se decompôs no tubo anterior.

Neste novo tubo foi realizada a separação das fases adicionando 200µL de clorofórmio para cada 1,0 ml de TRIZOL[®] coletado na amostra, com posterior agitação em vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a mistura se separou em uma fase vermelho-fenol-clorofórmio e em outra incolor aquosa onde se encontra o RNA. A fase aquosa foi então transferida para outro tubo e a outra fase (vermelho-fenol-cloroformio) armazenada para posterior extração de DNA e proteína.

4.3.1. Obtenção do RNA

No tubo com fase aquosa foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida pela centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Pode então observar o RNA precipitado no fundo do tubo.

A fase aquosa foi desprezada e o RNA lavado adicionando 1,0 ml de Etanol 75%, com posterior homogeneização em vórtex e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado deixando secar o RNA do tubo em geladeira por aproximadamente 12 horas.

4.3.2. Obtenção do DNA

No tubo armazenado para extração de DNA, foi adicionado 300 μL de etanol 100% com posterior agitação em vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por cerca de 2 - 3 minutos e centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C.

Após a centrifugação houve a separação da amostra em duas fases, sendo que o DNA encontrava-se na fase sólida do tubo, o sobrenadante foi removido e armazenado para posterior extração de proteínas, em seguida foi realizada a lavagem do DNA este procedimento foi realizado duas vezes de acordo com protocolo do fabricante, adicionando 1,0 mL de Citrato de Sódio 0,1M a 10% de etanol, com posterior homogeneização em vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C. Após as duas lavagens, adicionou-se 1,5mL de etanol 75% e incubou por 20 minutos a temperatura ambiente e centrifugar a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C.

A seguir, o material foi guardado em geladeira por 12 horas para secagem e posterior amplificação das amostras.

4.4 Transcrição Reversa de RNA para DNA complementar (RT-PCR).

O RNA extraído das amostras foi submetido à síntese de DNA complementar (c-DNA), que consiste na transformação da fita de RNA para c-DNA, utilizando reagentes da Invitrogen™ conforme protocolo do fabricante.

O RNA seco era então homogeneizado novamente em 15,0 μL de H₂O tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

Posteriormente, foi realizada uma solução mix inicial para transcrição reversa com

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Oligo dt	0,5 μL
RNA	10,0 μL
Dntp	1,0 μL
H ₂ O DEPC	13,0 μL

Inicialmente a solução para transcrição reversa contendo o RNA foi desnaturada a 65°C por 5 minutos, seguida de incubação em gelo por 1 minuto. Após este procedimento foi adicionado no tubo 6,0 μL de uma solução contendo a enzima (Superscrip IIIrt® First-Standard System Synthesis for RT-PCR) responsável pela transformação do RNA em c-DNA (transcrição reversa).

Componentes para a solução mix de Superscrip IIIrt, com volume final de 6,0 μL :

Tampão Kit 5x	4,0 μL
DTT 0,1 mol	1,0 μL
Enzima Superscrip IIIrt	1,0 μL

A amostra foi incubada por 5 minutos a 25°C, seguida de nova incubação por 60 minutos a 50°C. A reação foi inativada a 70°C por 15 minutos.

4.5. Protocolo de PCR

4.5.1. Avaliação da expressão gênica da 2'5'-OAS

Para as reações de PCR, a sequência dos iniciadores da 2'5'-OAS (69 kDa) foram baseadas na descrição de Dondi e colaboradores (2002) (Quadro 1). A reação de amplificação do cDNA foi realizada utilizando kit Invitrogen®, a solução mix com volume final de 25 μL , foi composta de:

Tampão 10x	2,5 μ L
dntp 10mM	0,1 μ L
MgCl ₂ 50mM	0,37 μ L
Taq DNA polimerase	0,25 μ L
<i>primer 1</i>	1,0 μ L
<i>primer 2</i>	1,0 μ L
cDNA 500 ng	2,5 μ L
H2O Milli Q	19,78 μ L

Os tubos com a solução mix foram homogeneizados e colocados no termociclador. O equipamento foi programado da seguinte forma; desnaturação inicial: 94 °C por 3 min.; amplificação 40 ciclos de 94 °C por 1 min. (desnaturação), 55 °C por 1 min. (hibridação) e de 72 °C por 1 min. (polimerização); polimerização final: 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos de amplificação a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C.

4.5.2. Avaliação da expressão gênica do IFNAR 2

A seqüência dos iniciadores do IFNAR 2c foi selecionada de acordo com o trabalho de Matsumoto e colaboradores (2005) (Quadro 2). A reação de amplificação do cDNA foi realizada utilizando kit Invitrogen[®], a solução mix com volume final de 25 μ L, foi composta de:

Tampão 10x	2,5 μ L
dntp 10mM	0,1 μ L
MgCl ₂ 50mM	0,37 μ L
Taq DNA polimerase	0,25 μ L
<i>primer 1</i>	1,0 μ L
<i>primer 2</i>	1,0 μ L
cDNA 500 ng/ μ L	2,5 μ L
H2O Milli Q	17,2 μ L

Os tubos com a solução mix foram homogeneizados e colocados no termociclador. O equipamento foi programado da seguinte forma; 40 ciclos de 94 °C por 1 min. (desnaturação), 54 °C por 30 seg. (hibridação) e de 72 °C por 1,5 min. (polimerização); polimerização final: 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos de amplificação a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C.

4.5.3. Avaliação da expressão gênica do IFNAR 1

A sequência dos iniciadores do IFNAR 1 foi selecionada de acordo com o trabalho de Matsumoto e colaboradores (2005) (Quadro 2). A reação de amplificação do cDNA foi realizada utilizando kit Invitrogen[®], a solução mix com volume final de 25 µL, foi composta de:

Tampão 10x	2,5 µL
dntp 10mM	0,1 µL
MgCl ₂ 50mM	0,37µL
Taq DNA polimerase	0,25µL
<i>primer 1</i>	0,75µL
<i>primer 2</i>	0,75µL
cDNA 500 ng	2,5 µL
H2O Milli Q	17,7 µL

Os tubos com a solução mix foram homogeneizados e colocados no termociclador. O equipamento foi programado da seguinte forma; 40 ciclos de 94 °C por 1 min. (desnaturação), 58 °C por 30 seg. (hibridação) e de 72 °C por 1,5 min. (polimerização); polimerização final: 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos de amplificação a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C.

4.5.4. Avaliação da expressão gênica do Interferon alfa.

A sequência dos iniciadores do IFN- α foi selecionada de acordo com o trabalho de PANNETIER e Colaboradores (2004) (quadro 2). A reação de amplificação do cDNA foi realizada utilizando kit Invitrogen[®], a solução mix com volume final de 25 μ L, foi composta de:

Tampão 10x	2,5 μ L
Dntp 10mM	0,1 μ L
MgCl ₂ 50mM	0,37 μ L
Taq DNA polimerase	0,25 μ L
<i>primer 1</i>	1,50 μ L
<i>primer 2</i>	1,50 μ L
cDNA 500 ng/ μ L	2,5 μ L
H2O Milli Q	16,2 μ L

Os tubos com a solução mix foram homogeneizados e colocados no termociclador. O equipamento foi programado da seguinte forma; 40 ciclos de 94 °C por 45 seg. (desnaturação), 59 °C por 45 seg. (hibridação) e de 72 °C por 45 seg. (polimerização); polimerização final: 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos de amplificação a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C.

As reações foram amplificadas utilizando um termociclador – eppendorff[®] com 64 orifícios.

<i>Primers</i>	Seqüência	Tamanho do Produto Amplificado	Temperatura de Anelamento	Referência
IFN-α	<i>sense</i> 5'-ACTTTGGATTTCCTCCAGGA-3' <i>antisense</i> 5'-CAGGCACAAGGGCTGTATT-3'	316 bp	59°C	Pannetier D., et al., 2004
IFNAR-1	<i>sense</i> 5'-CTTTCAAGTTCAGTGGCTCCACGC-3' <i>antisense</i> 5'-TCACAGGCGTGTTCCTCAGACTG-3'	500 bp	58°C	Matsumoto K. et al., 2005
IFNAR-2	<i>sense</i> 5'-GAAGGTGGTTAAGAACTGTGC-3' <i>antisense</i> 5'-CCCGCTGAATCCTTCTAGGACGG-3'	109 bp	54°C	Matsumoto K. et al., 2005
2'-5'OAS	<i>sense</i> 5'-AACTGCTTCCGACAATCAAC-3', <i>antisense</i> 5'-CCTCCTTCTCCCTCCAAAA-3'	69 bp	55°C	Dondi E. et al., 2001
β-actina	<i>sense</i> 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' <i>antisense</i> 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	295bp	56°C	Tamim H. et al., 2002

Quadro 2. Características dos iniciadores sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de c-DNA.

4.6. Detecção dos Produtos Amplificados

Após a reação de PCR, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e corados com prata. Foi utilizado um padrão como controle positivo 50 bp DNA ladder da Invitrogen®.

Para preparo da amostra a ser aplicada no gel, foi homogeneizado e adicionado 10,0 μ L de amostra amplificada em 5,0 μ L de tampão e adicionado em cada orifício do gel de poliacrilamida 10%. A corrida foi realizada com corrente de 100 volts por aproximadamente 1,5 horas.

Posteriormente a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora por 15 minutos, posteriormente esta solução foi desprezada e adicionada solução de nitrato de prata por 15 minutos, seguido de uma lavagem em H₂O MILLI-Q e incubação em solução reveladora por aproximadamente 15 minutos, retornando o gel para a solução fixadora. Os géis foram colocados em placa de vidro e fotografados após secagem.

4.7. Pesquisa do DNA do HPV por captura híbrida (CH)

Utilizou-se aparelho marca Captura Híbrida ® II *System* DML 2000 sistema de microplaca com amplificação de sinal por quimiluminescência. As informações e a metodologia abaixo descrita constam do manual de instrução fornecido pela Digene ® do Brasil, empresa que comercializa o equipamento e os *kits* utilizados.

Para a detecção de HPV, o *kit* possui 18 tipos virais agrupados em dois *pools* de sondas. As sondas para os vírus de baixo risco incluem os tipos 6, 11, 42, 43 e 44, representando aproximadamente 70% desse grupo de vírus; em relação aos vírus de alto risco, o sistema contém as sondas com os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, representando aproximadamente 99% desse grupo de vírus. Para o HPV, a sensibilidade em microplaca é de 1 pg/ml, equivalente a 0,1 cópia de vírus.

A primeira etapa do teste consiste na realização de digestão e desnaturação que são feitas ao mesmo tempo no próprio tubo de coleta. Adiciona-se, nessa etapa, uma solução contendo hidróxido de sódio à amostra, que além de digerir qualquer outra estrutura, irá desnaturar o DNA, separando as pontes de hidrogênio que unem as bases nitrogenadas para facilitar a hibridização.

Na etapa de desnaturação, o DNA é submetido a altas temperaturas e a pH alcalino, deixando as bases nitrogenadas livres para a hibridização. Este procedimento necessita de banho-maria à 65° C durante uma hora. Após a digestão e a desnaturação, 75 µl da amostra são transferidos para os microtubos, a fim de que se processe a hibridização. Nesta etapa, as sondas de RNA são diluídas em diluente próprio e aliquotadas na quantidade de 25 µl nos microtubos. A hibridização requer banho-maria à 65° C durante uma hora.

Depois de hibridizado, o material é transferido para uma microplaca que tem suas paredes recobertas por anticorpos monoclonais, a fim de eliminar possibilidade de reação cruzada anti-RNA-DNA que irão reagir com os híbridos formados anteriormente. Essa etapa

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

é denominada captura híbrida e se faz com um *rotary-shaker* à temperatura de 20-25°C durante uma hora.

A partir da captura, quando já se formou um complexo anti-RNA:DNA-híbrido, passa-se para a fase de detecção. Toda a solução contida na microplaca é desprezada, adicionando-se anti-anti-RNA:DNA conjugado a fosfatase alcalina, que irá reagir com o complexo ligado à parede da microplaca. Esta fase dura 30 minutos à temperatura de 20-25°C. Após este período, novamente despreza-se o material líquido da microplaca e faz-se uma única lavagem do ensaio, que pode ser manual ou automatizada. Por ela, retira-se o excesso de fosfatase alcalina que não formou complexo anticorpo-híbrido-anticorpo. Adiciona-se o substrato Emerald, que será degradado pela fosfatase alcalina durante 15 minutos.

O grau de degradação do substrato depende da quantidade de enzima ligada ao complexo, o qual produzirá diferentes intensidades de cor, lidas por quimioluminescência, em equipamento apropriado. Todo o teste de captura híbrida conta com controles negativos e positivos, que são testados em triplicata. O ensaio usa as leituras dos controles para validação e cálculo do *cut off*.

A validação do teste e o cálculo de *cut off* são feitas baseadas em alguns critérios:

- a) O coeficiente de variação das leituras entre os *microwells* dos controles negativos ou positivos não deve ultrapassar 25%;
- b) A divisão da média das leituras de RLU (unidade relativa de luz) dos controles positivos pelos negativos deve ser superior à 2;
- c) Os controles negativos devem respeitar o limite máximo de *background* de 250 RLU;
- d) O valor do *cut off* da reação é expresso pela média dos controles positivos.

Há ainda dois outros controles intra-testes. O primeiro é quando se faz a adição do reagente de

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

desnaturação. Todas as amostras devem tornar-se de cor roxa, isso dá a certeza de que todas as amostras serão desnaturadas. O segundo, quando da adição das sondas, a coloração deve mudar de roxo para amarelo, assegurando que todas as amostras receberam a quantidade ideal de sonda. A leitura é totalmente automatizada, o quimioluminômetro é comandado por um *software* que analisa os números recebidos da leitura e faz todos os cálculos de validação do ensaio. O relatório final do teste é feito pelo *software*, não havendo margem de erro nos cálculos. As etapas de digestão e desnaturação são realizadas uma única vez. A partir daí, a detecção de HPV é feita individualmente através de *kits* próprios. O *kit* do HPV permite a realização de 96 testes, sendo 42 testes para vírus de alto grau, 42 testes para vírus de baixo grau, 3 controles negativos e 3 controles positivos para vírus de baixo grau e 3 controles negativos e 3 controles positivos para vírus de alto grau

5. Análise Estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo aplicativo Prism®. As variáveis normais, homocedástica, foram analisadas utilizando-se testes paramétricos, na comparação entre dois grupos, o teste “t” de student. Quando a distribuição não foi normal, utilizamos testes não paramétricos, para comparação entre dois grupos, o teste de Man-Whitney. As proporções foram comparadas pelo teste do χ^2 , acompanhado do teste exato de Fisher. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que p foi menor que 5% ($p < 0.05$).

Resultados

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

6. RESULTADOS

6.1. Expressão de um dos elementos responsivos pelo estímulo de interferon

6.1.1. Expressão da enzima 2'5'Oligoadenilato sintetase

A figura 4 mostra a expressão da enzima 2'5'OAS realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (69 pb) (DONDI et al., 2001) em 2 de 17 amostras controles, em células obtidas em tecido do colo uterino de mulheres sem infecção por HPV ou neoplasia (grupo controle).

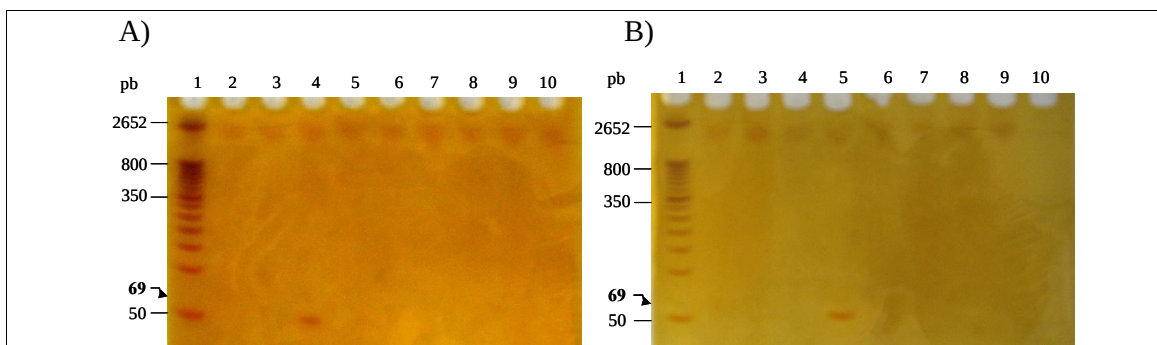


Figura 4. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a) Coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras controles; **b)** Coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 9 amostras controles; coluna 10 controle negativo da reação sem DNA.

A figura 5 mostra a expressão da enzima 2'5'OAS realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (69 pb) (DONDI et al., 2001) em 8 de 28 amostras de células obtidas em tecido do colo uterino de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical.

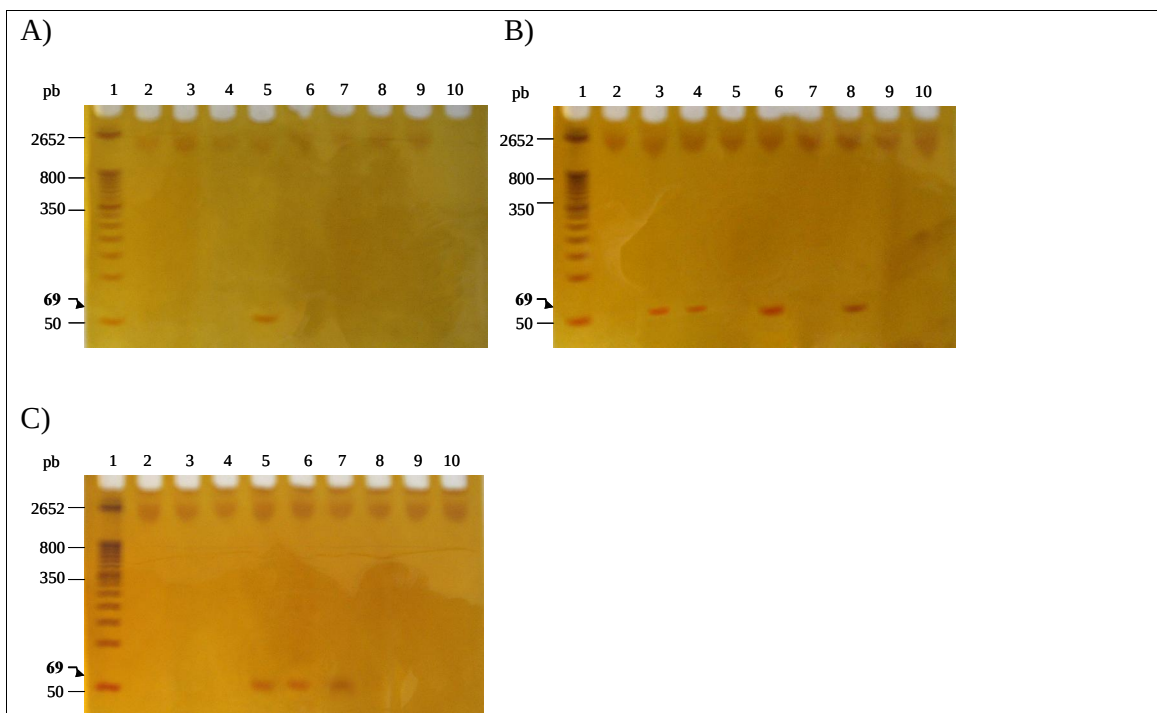


Figura 5. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras de NIC; **b)** Coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras de NIC; **c)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 9 amostras de NIC; coluna 10 controle negativo da reação sem cDNA.

As amostras de NIC apresentaram em maior numero com expressão da enzima 2'5 OAS, 8 de 28 amostras de NIC enquanto nas amostras controles 2 de 17, porém essa diferença numérica não apresentou significância estatística.

6.2 Expressão dos receptores de Interferon alfa

6.2.1. Expressão do receptor de Interferon alfa subunidade 1 (IFNAR1)

A figura 6 mostra a expressão do receptor de interferon alfa subunidade 1 realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (500 pb) (MATSUMOTO et al., 2005) em 10 de 17 amostras controles, em células obtidas em tecido do colo uterino de mulheres sem infecção por HPV ou neoplasia (grupo controle).

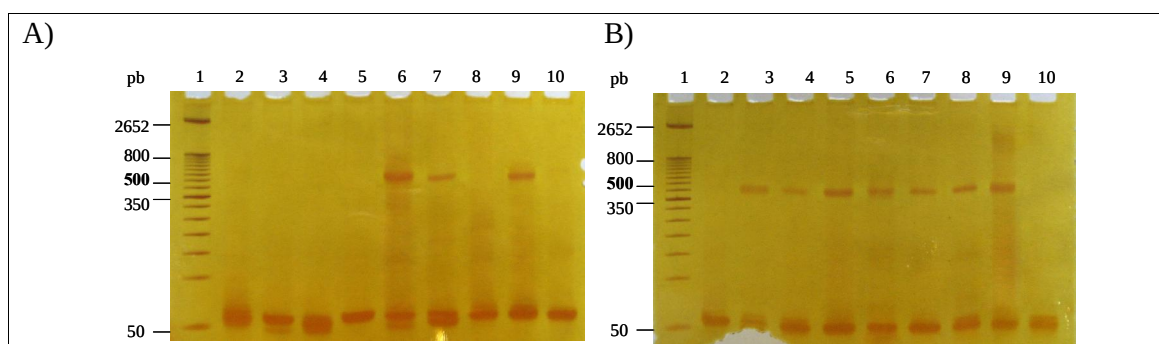


Figura 6. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras controle; b) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 9 amostras controle; coluna 10 controle negativo da reação sem cDNA.

A figura 7 mostra a expressão do receptor de interferon alfa subunidade 1 realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (500 pb) (MATSUMOTO et al., 2005) em 4 de 28 amostras de células obtidas em tecido do colo uterino de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical.

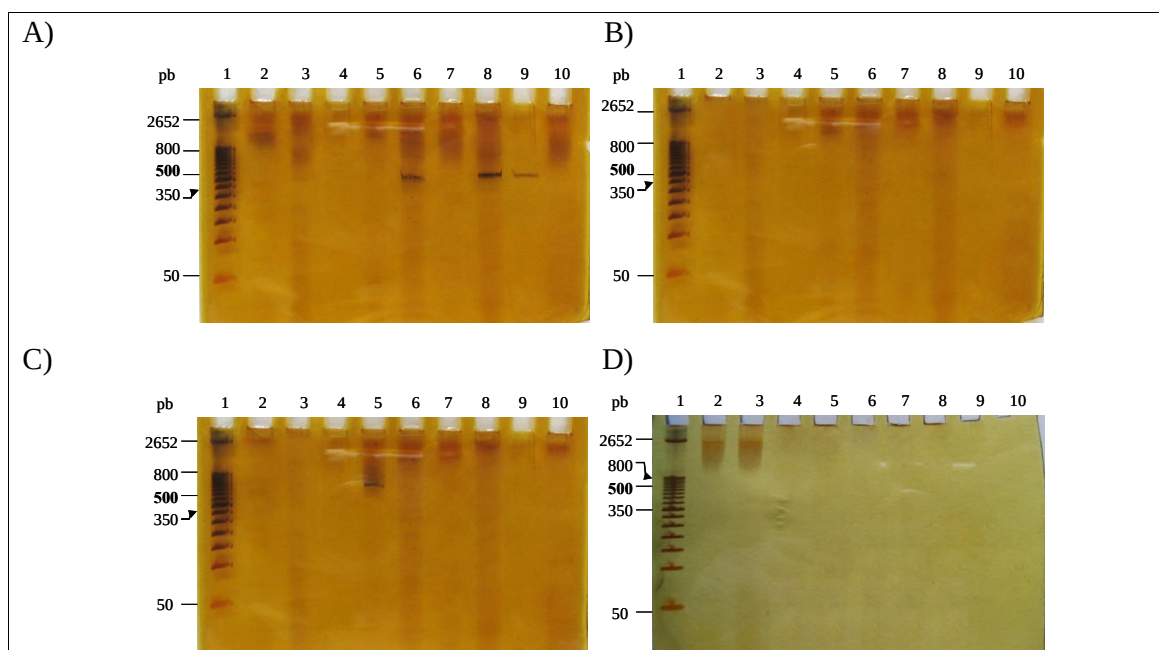


Figura 7. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a,b,c) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras NIC; d) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 amostra NIC; coluna 3 controle negativo da reação sem cDNA.

Na pesquisa de expressão do receptor de interferon alfa 1 as amostras controles apresentaram uma maior expressão do receptor, 10 de 17 amostras controle, enquanto nas amostras NIC apenas 4 de 28 amostras apresentaram o fragmento de 500 bp; $p=0.0018$.

6.2.2. Expressão do receptor de Interferon alfa subunidade 2 (IFNAR2)

A figura 8 mostra a expressão do receptor de interferon alfa subunidade 2 realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (105 pb) (MATSUMOTO et al., 2005) em 11 de 17 amostras controles, em células obtidas em tecido do colo uterino de mulheres sem infecção por HPV ou neoplasia (grupo controle).

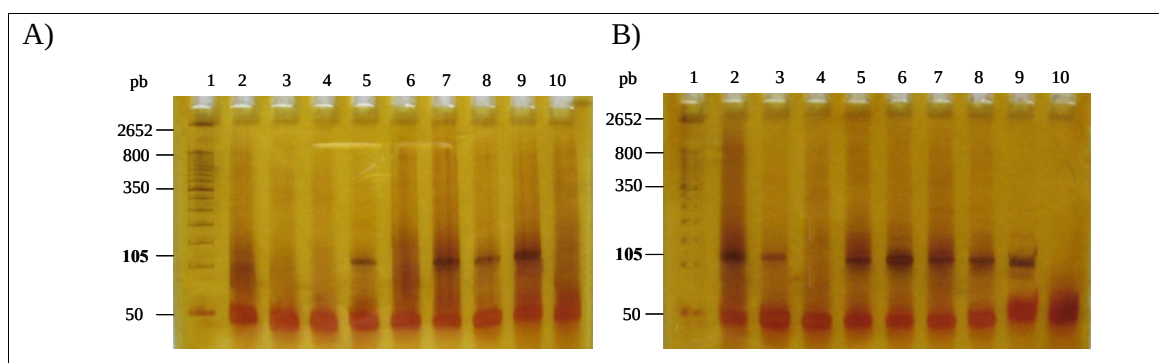


Figura 8. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras Controle; **b)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 9 amostras Controle; coluna 10 controle negativo da reação sem cDNA.

A figura 9 mostra a expressão do receptor de interferon alfa subunidade 2 realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (500 pb) (MATSUMOTO et al., 2005) em 2 de 28 amostras de células obtidas em tecido do colo uterino de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical.

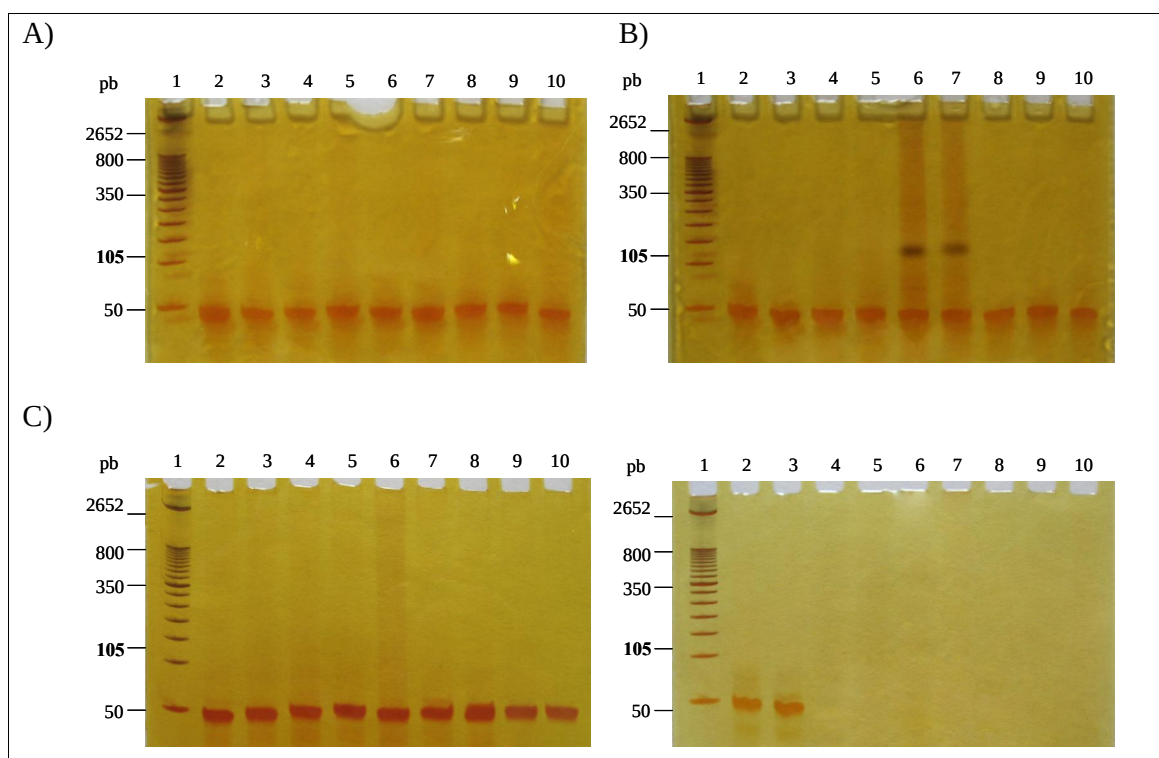


Figura 9. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a,b,c) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras NIC; d) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 amostra NIC; coluna 3 controle negativo da reação sem cDNA.

Na pesquisa de expressão do receptor de interferon alfa 2 as amostras controles apresentaram um perfil semelhante a dos receptores do tipo 1, 11 de 17 amostras controle expressavam o receptor, enquanto nas amostras NIC apenas 2 de 28 amostras apresentaram o fragmento de 500 bp; $p=0.0018$.

As amostras controle apresentaram uma maior expressão do receptor de interferon alfa subunidade 1 e 2 que as amostras do grupo NIC. Quando foram avaliadas as pacientes que apresentavam simultaneamente as duas subunidades do receptor observamos que nas amostras controle 47% (8/17) das amostras do grupo expressavam o IFNAR1 e IFNAR2 enquanto nas amostras do grupo NIC não houve pacientes que expressavam os dois receptores $p=0.0001$.

Tabela 4.

Tabela 4. Expressão do receptor de interferon alfa e enzima 2'5'OAS nas amostras do grupo controle.

	IFNAR 1	IFNAR 2	2'5'OAS
1			
2			
3			positivo
4		positivo	
5	positivo		
6	positivo	positivo	
7		positivo	
8	positivo	positivo	
9			
10		positivo	
11	positivo	positivo	
12	positivo		
13	positivo	positivo	positivo
14	positivo	positivo	
15	positivo	positivo	
16	positivo	positivo	
17	positivo	positivo	

6.3 Expressão do Interferon alfa (IFN- α)

A figura 10 mostra a expressão do RNA mensageiro do interferon alfa realizado por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado (316pb) (PANNETIER et al., 2004). Os resultados mostram a presença do fragmento em 4 de 28 amostras de células obtidas em tecido do colo uterino de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical. As amostras controles obtidas em tecido do colo uterino de mulheres sem infecção por HPV ou neoplasia não expressavam o mRNA do IFN- α .

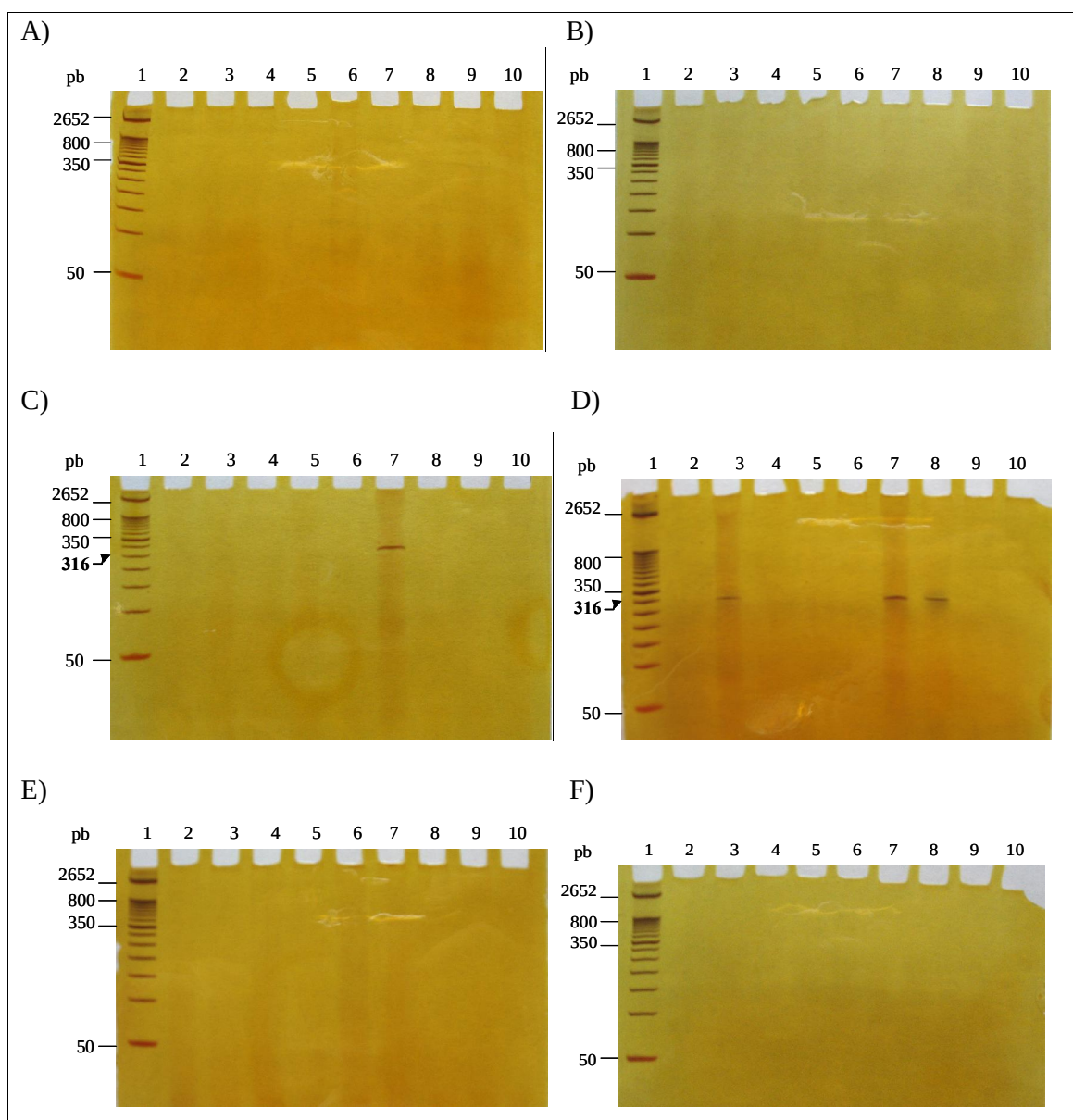


Figura 10. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras Controle; **b)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 9 amostras Controle; **c,d,e)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras NIC; **f)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; coluna 3 controle negativo da reação sem cDNA.

6.4 beta Actina

Para verificar qualidade do c-DNA utilizado como amostra foi avaliada a expressão do gene da proteína beta actina. A Figura 11 mostra os produtos amplificados do gene da beta

actina realizada por RT-PCR, confirmado a presença do fragmento esperado em todas as amostras utilizadas na pesquisa (295 pb).

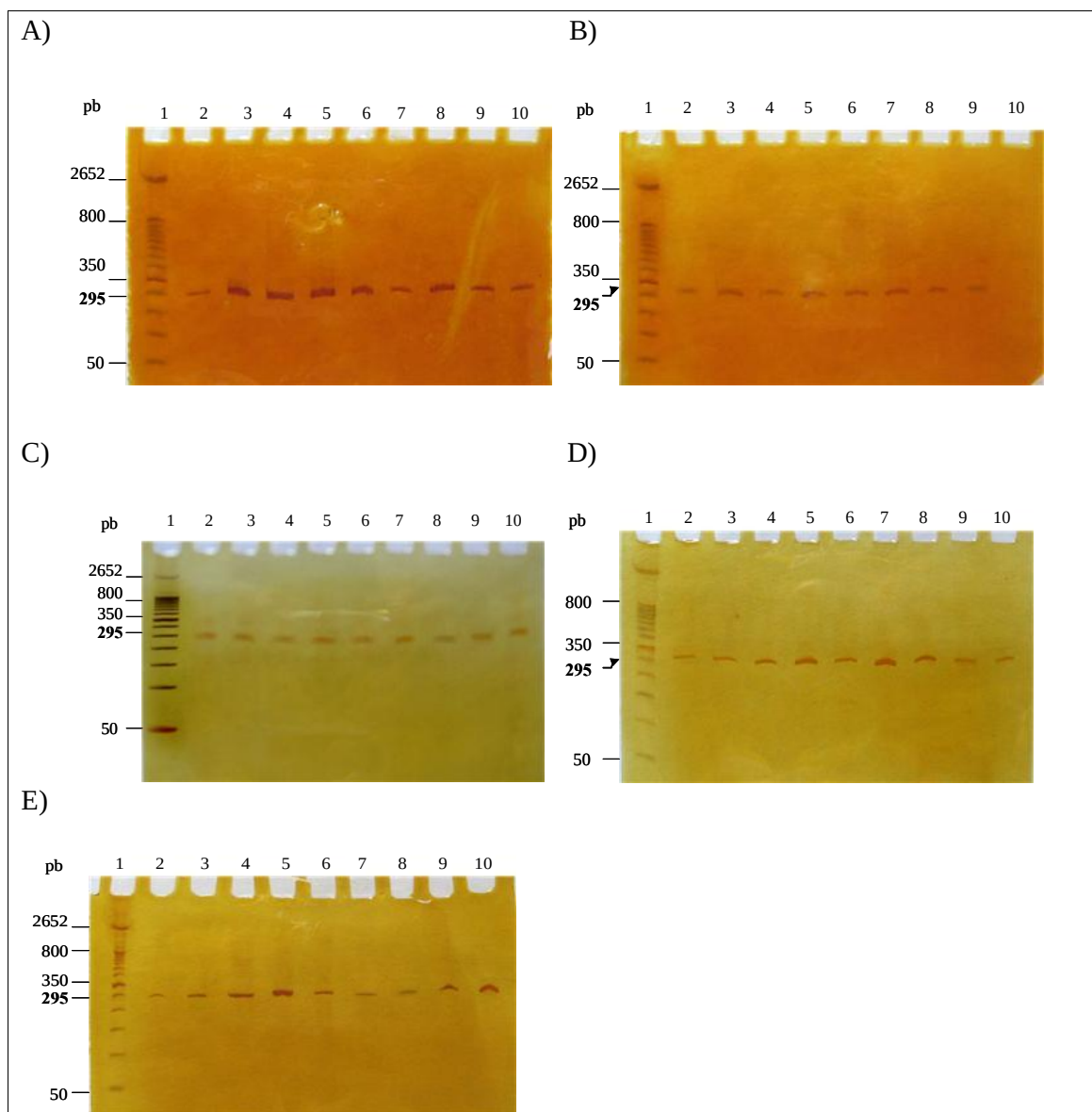


Figura 11. Fotografia de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. a) coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras controle; **b)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 9 amostras controle, coluna 10 controle negativo; **c,d,e)** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras de NIC.

6.5 Pesquisa do DNA do HPV por captura híbrida

Os resultados obtidos da pesquisa do DNA do HPV por captura híbrida demonstraram foi de 50% das amostras (14/28) de células de NIC positivo para DNA do HPV.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Tabela 5. Resultados obtidos no estudo.

	Controle (<i>n</i> =17)	NIC (<i>n</i> =28)
IFNAR 1	(10) 58,3%*	(04) 14,2%
IFNAR 2	(11) 64,7%**	(02) 7,1%
IFNAR 1 e 2	(08) 47,0%**	(00) 0%
2'5'OAS	(02) 11,7%	(08) 28,5%
IFN-alfa	(00) 0,0%	(04) 14,2%
Beta Actina	(17) 100 %	(28) 100 %

* $p=0.0018$; ** $p<0.0001$

A tabela 5 descreve os resultados obtidos no estudo mostrando uma baixa expressão do RNA mensageiro do receptor de Interferon, onde apenas 14,2% expressavam a subunidade um e 7,1% a subunidade dois do receptor em amostras de NIC. A enzima 2'5'OAS foi expressa em 28,5% das amostras NIC e a citocina interferon alfa em 14,2% das amostras de NIC. Todas as amostras expressavam o RNA mensageiro da beta Actina.

A tabela 6 descreve os pacientes com diagnóstico anatomopatológico de NIC I, II e III e os respectivos resultados de avaliação do RNA mensageiro do receptor de interferon, 2'5'OAS, Interferon alfa, captura híbrida para HPV e beta actina.

Tabela 6. Pacientes com diagnóstico anatomopatológico de NIC e respectivos resultados de Receptor de Interferon 1 e 2, enzima 2'5'OAS, Interferon alfa, captura híbrida para HPV e beta actina.

Paciente nº	Anatomopatológico	IFNAR 1	IFNAR 2	2'5'OAS	IFN-α	HPV	β Actina
1	HPV / NIC I					positivo	positivo
2	HPV / NIC I			positivo		positivo	positivo
3	NIC I			positivo	positivo		positivo
4	HPV / NIC I			positivo		positivo	positivo
5	NIC I		positivo	positivo		positivo	positivo
6	HPV / NIC I	positivo					positivo
7	HPV / NIC I					positivo	positivo
8	HPV / NIC II						positivo
9	HPV / NIC II				positivo	positivo	positivo
10	NICII	positivo					positivo
11	NIC II						positivo
12	HPV / NIC II			positivo	positivo	positivo	positivo
13	HPV / NIC III					positivo	positivo
14	HPV / NIC III	positivo					positivo
15	HPV / NIC III						positivo
16	NIC III			positivo			positivo
17	HPV / NIC III						positivo
18	HPV / NIC III		positivo		positivo		positivo
19	HPV / NIC III						positivo
20	HPV / NIC III						positivo
21	HPV / NIC III					positivo	positivo
22	HPV / NIC III					positivo	positivo
23	HPV / NIC III						positivo
24	HPV / NIC III	positivo		positivo			positivo
25	NIC III			positivo		positivo	positivo
26	HPV / NIC III					positivo	positivo
27	HPV / NIC III					positivo	positivo
28	HPV / NIC III					positivo	positivo

Discussão

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

7. DISCUSSÃO

Sabe-se do enorme progresso das pesquisas em entender as bases moleculares das ações anti-virais do interferon e recentes estudos tem demonstrado que os interferons do tipo I são importantes componentes da resposta imunológica contra a progressão de células neoplásicas (DUNN et al., 2005; SAMUEL, 2001; TAKAOKA et., 2003; TAKAOKA et al., 2006). Para que os interferons exerçam suas funções é preciso que haja uma harmonia funcional entre a ativação de seus receptores e posteriormente a transdução do sinal intracelular para a ativação dos elementos responsivos pelo estímulo do Interferon.

Considerando estes aspectos o presente projeto procurou avaliar a presença do receptor de IFN- α , a produção desta citocina e um dos elementos responsivos pelo estímulo do interferon (ISRE) a enzima 2'5'Oligoadenilato sintetase. A avaliação da presença do receptor e da ativação da 2'5' OAS através da avaliação da expressão do RNAm, pode ser útil em dois aspectos: primeiro, verificar se há uma correlação entre os motivos que levam algumas lesões de pacientes com NIC a regredirem espontaneamente e outras progredirem para o câncer possa ter relação com a presença do receptor ou segundo, se a falta do receptor poderia ter relação com a taxa de insucesso com o tratamento com IFN. E dessa forma servir de subsídios para futuras pesquisas de nosso grupo para propor novos protocolos visando o aumento da taxa de sucesso de pacientes em tratamento de lesões pré invasivas tratadas com IFN- α .

Dos 28 casos de NIC, 14 (50 %) foram positivos para HPV de alto risco pela captura híbrida. A literatura mostra a detecção do HPV por PCR em aproximadamente 90 a 98% dos casos de NIC (MUÑOZ et al., 2003). Os casos negativos podem ser decorrentes da presença de lesões com poucas cópias de vírus, por novos tipos de vírus não incluídos nos testes, ainda não detectadas por método de captura híbrida ou por não ser o vírus o agente etiológico.

A avaliação da expressão dos receptores de IFN- α realizada por RT-PCR demonstrou uma menor expressão, com diferença significativa em células de NIC e as amostras controle

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

apresentaram uma maior expressão simultânea das duas subunidades do receptor demonstrando uma ampla expressão em células de pacientes sem infecção. Na literatura encontra-se que o polimorfismo nos genes que codificam os receptores de IFN tipo I tem sido proposto para conferir susceptibilidade ou proteção em várias doenças.

Em trabalho realizando varredura no genoma de uma população foi observado polimorfismo nos genes dos receptores de citocina do tipo I onde a expressão fenotípica ocorre no IFNAR2 e estas pessoas estão associadas a uma maior persistência ao vírus da hepatite B (FRODSHAM et al., 2006). Pesquisando portadores do vírus HIV separados em grupos com perfil de rápida ou lenta progressão para AIDS foi observado um polimorfismo de 19 nucleotídeos no gene que codifica o receptor do tipo I (IFNAR1) e essa alteração demonstrava relação com grupo de rápida progressão para AIDS (DIOP et al., 2006).

Outro estudo de base populacional envolvendo 238 indivíduos com sorologia positiva para o vírus da hepatite C (HCV) foram genotipados para polimorfismo de um único nucleotídeo em vários genes que possam estar relacionados ao curso da infecção, uma das alterações encontradas foi no gene do IFNAR 2, esse polimorfismo foi associado com viremia persistente (SAITO et al., 2004). Embora as evidências ainda sejam poucas, sem dados disponíveis na literatura que trate diretamente sobre polimorfismo do IFNAR e infecção por HPV, e mesmo considerando que não foi objeto deste estudo, podemos supor que possa existir uma relação à persistência da infecção pelo HPV com o polimorfismo genético com baixa expressão nos receptores de IFN.

A presença do receptor demonstra ter relação com o sucesso no tratamento de pacientes com IFN, em trabalho utilizando células de carcinoma hepatocelular foi observado que as células que expressavam maior quantidade do IFNAR2 eram as que mais respondiam ao tratamento (OTA et al., 2005). Recentemente Damdinsuren e colaboradores (2007) descreveram após estudo utilizando células de carcinoma hepatocelular que a expressão do IFNAR1 também era importante para as ações antiproliferativas no tratamento com IFN- α .

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

A exposição de células humanas ao IFN- α induz a transcrição de vários genes entre eles o da enzima 2'5'OAS que se liga com alta afinidade a RNase Latente que posteriormente catalisa a clivagem do RNA ou DNA viral interferindo na sua replicação (Figura 3). Aqui foi pesquisada a expressão do RNAm da enzima na tentativa de obter-se uma correlação entre a expressão dos receptores e a ativação dos elementos que respondem pelo estímulo do interferon.

Para avaliação de um dos elementos responsivos pelo estímulo do IFN- α foi realizada por RT-PCR a avaliação da expressão da enzima 2'5'OAS. Os resultados obtidos demonstram que ocorre a síntese desta enzima em oito amostras de células de NIC e duas amostras controle.

Contudo, pacientes que não expressavam os receptores para esta citocina possuíam a expressão da enzima. Este fato nos leva a entender que a expressão da 2'5'OAS observada nas pacientes que apresentavam NIC possa ser induzida por outras vias. Corroborando com esta possibilidade, trabalhos demonstram que ambos IFNs (α, β, γ) estimulam a produção da 2'5'OAS, porém em células diferentes poderia ocorrer respostas diferentes sugerindo a existência de fatores celulares específicos que poderiam regular a expressão da enzima e que a expressão da 2'5'OAS possa exercer outras funções catalíticas ainda não identificadas e com isso desempenhar um papel importante na homeostasia (HOVANESSIAN ; JUSTESEN, 2007).

Outro ponto a se considerar é que a expressão de interferon e dos genes responsivos pelo interferon podem ser ativados por outras vias além da via receptor de IFN. É conhecido que ácidos nucleicos, lipídeos, polissacarídeo além de vírus DNA e RNA dupla fita (dsDNA, dsRNA) também podem induzir a produção de IFN via receptor Toll-Like (TLRs) (AKIRA, UEMATSU ; TAKEUCHI, 2006). Os vírus (dsRNA) são reconhecidos por TLR3, que está presente principalmente na membrana endossomal, e também por duas RNA helicases

citoplasmáticas, a gene induzida pelo ácido retinóico I (RIG-I) e de proteínas associadas com diferenciação de melanoma 5 (MDA5)(YONEYAMA et al., 2004).

A produção endógena de interferon é transitória, inicialmente foi demonstrada sua estimulação por vírus RNA ou DNA e posteriormente descobriram outros elementos como microorganismos, bactérias e protozoários também podem estimular sua produção.

Os resultados obtidos no trabalho apresentaram uma baixa expressão do RNAm do IFN nas amostras coletadas de pacientes com NIC essas pacientes também apresentavam infecção por HPV, confirmando que a presença do vírus possa exercer um efeito inibidor na síntese de IFN.

Os IFNs inibem a expressão de RNAm das proteínas E6 e E7 em células de HPV imortalizadas (FONTAINE et al., 2001; WOODWORTH et al., 1999; JOHNSON et al., 1999; KHAN et al., 1993; PEREA et al., 1995; NAWA et al., 1990). IFNs tem sido utilizado para tratar infecção por HPV, contudo a eficácia da terapia não tem sido consistente, trabalhos em nosso grupo têm demonstrado que alguns pacientes tratados com IFNs respondem eficazmente e outros parcialmente (MICHELIN; MURTA, 2007).

Outros trabalhos descrevem que as proteínas E6 e E7 do HPV-16 e 18 inibem especificamente a expressão e sinalização do IFN, por exemplo, foi demonstrado que a proteína E6 do HPV 16 liga-se a região carboxi-terminal do fator de transcrição regulador de interferon (IRF) causando inativação de sua função (RONCO et al., 1998), outro mecanismo em que o HPV prejudica sua produção, ação anti-viral e antiproliferativa do interferon é a interação da E6 com as proteínas tirosina quinase causando um bloqueio na ativação do sinal intracelular após a ligação do interferon no receptor (LI et al., 1999). Koromilas e Colaboradores (2001) descrevem que a proteína E7 do HPV 16 pode ligar-se a um dos fatores reguladores de interferon (IRF-9) assim inibe sua migração para o núcleo diminuindo a ativação dos genes responsivos para IFN. Com isso papilomas ou NICs que expressam altos níveis de E6 e E7 podem ser mais resistentes ao IFN.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

As proteínas E6 e E7 do HPV-16 são reguladas positivamente durante a progressão do NIC (STOLER et al., 1992) e estas lesões podem ser mais resistentes ao IFN. Redução dos níveis de IFN- β e γ pode ser observada em NIC (EL-SHERIF et al., 2001; CINTORINO et al., 2002; PAO et al., 1995). Juntos estes resultados obtidos corroboram com outras pesquisas demonstrando através da presença do vírus, por consequência, a expressão em altos níveis das proteínas E6 e E7 regulam negativamente a expressão, sinalização e produção do IFN.

A diversidade de sinais gerados através dos receptores de interferon pode proteger o hospedeiro contra infecções, câncer e montar uma resposta imune controlada. Excessivas ou inadequadas estimulações nas vias de sinalização podem levar à toxicidade, leucopenia, autoimunidade, e até mesmo a morte. Assim, os receptores de interferon também interagem com um número de moléculas de regulação negativa durante a sinalização e transdução do sinal celular, dentre alguns mecanismos destaca-se as proteínas pertencentes à família das supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) (FENNER et al., 2006).

As SOCS foram demonstradas em vários tipos de células com a função de regular o sinal de transdução de citocinas, porém seu papel na modulação da resposta ao IFN nas células não está bem claro, no entanto foi demonstrado que tratamento com IFN eliminou 70% dos tumores de animais com melanoma deficientes de SOCS (SOCS ^{-/-}) enquanto animais competentes para SOCS tratados com IFN morriam (ZIMMERER et al., 2007).

Em células de lesão intraepitelial anal de alto grau foi demonstrado altos níveis de RNAm da supressora de citocina (SOCS2) que poderia ser um fator a contribuir com a alteração nas vias de sinalização de IFN (ARANY et al., 2001) o que nos leva acreditar que esses fatores intrínsecos às vias intracelulares, associado a uma diminuição no número de receptores para IFN observado nas células de NIC, possam estar envolvidos com a baixa expressão do IFN- α nas células de NIC.

Conclusões

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

CONCLUSÕES

- As amostras de NIC apresentavam o DNA do HPV em 50% das amostras utilizadas.
- As amostras obtidas de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical apresentam uma baixa expressão do RNA mensageiro do receptor de interferon subunidade I (IFNAR1).
- As amostras obtidas de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical apresentam uma baixa expressão do RNA mensageiro do receptor de interferon subunidade II (IFNAR2).
- A expressão simultânea das duas subunidades dos receptores foi maior no grupo controle.
- Não houve diferença significativa da expressão do RNA mensageiro do IFN- α entre os grupos controle e NIC.
- Não houve diferença significativa da expressão do RNA mensageiro da enzima 2'5'OAS entre os grupos controle e NIC.

REFERÊNCIAS

AARONSO, D. S., HORVATH C. M: A road map for those who don't know JAK-STAT. **Science**, Nova York, v. 296, p.1653-1655. 2002.

ABBAS A. K., LITCHTMAN A. H., POBER J. S.: **Cellular and Molecular Immunology**. 5° ed. Philadelphia, Pennsylvania, 2000.

AKIRA S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. Cambridge, v.124, p.783-801, feb. 2006

ARANY I., A. GOEL A. TYRING S. K. Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions. **Anticancer Res**. Athenas, v. 15, p.2865-2869. Nov-Dez.1995.

ARANY I., MULDROW M., TYRING S.K. The endogenous interferon system in anal squamous epithelial lesions with different grades from HIV-positive individuals. **Int J STD AIDS**. Londres, v.12, p.229-233. Apr. 2001.

ASHCROFT M., VOUSDEN K. H.: Regulation of p53 stability. **Oncogene**, Basingstoke, v.18, p. 79-82. Dez. 1999.

BLACKMAN M. J., MORRIS A. G. The effect of interferon treatment of targets on susceptibility to cytotoxic T-lymphocyte killing: augmentation of allogenic killing: augmentation of allogenic killing and virus specific killing relative to viral antigen expression. **Immunology**, Oxford, v. 56, p. 451-457. Nov. 1985.

BURGHARDT, E., OSTOR A. G. Site and origin of squamous cervical cancer: a histomorphologic study. **Obstet Gynecol.**, Nova York, v. 62, p.117-127. Jul.1983.

CARAGLIA M., MARRA M., PELAIA G., MASELLI R., CAPUTI M., MARSICO S.A., ABBRUZZESE A. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. **J Cell Physiol**. Philadelphia v. 202(2), p.323-335. feb. 2005.

CHIEUX V., HOBER D., CHEHADEH W., WATTR P. Anti-viral proteins: from interferon alpha to its receptor. **Ann. Biol. Clin.**, Paris, v. 57 n. 3, p. 283-290. Maio. 1999.

CINTORINO, M., TRIPODI, S. A., ROMAGNOLI, R. IETTA, F. RICCI, M. G. PAULESU, L. Interferons and their receptors in human papillomavirus lesions of the uterine cervix. **Eur J Gynaecol Oncol.**, Pádua, v. 23, p. 145-150. Jun. 2002.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

CLERICI, M., MEROLA, M. E., FERRARIO, D., TRABATTONI, M. L., VILLA, B., STEFANON, D. J., VENZON, G. M., SHEARER, G., DE PALO. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst.**, Bethesda, v. 89, p. 245-250. Feb. 1997.

CLERICI, M. SHEARER, G. M. The Th1–Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. **Immunol Today**, Amsterdam, v. 15, p. 575–581. Dez. 1994.

DAMDINSUREN B., NAGANO H., WADA H., NODA T., NATSAG J., MARUBASHI S., MIYAMOTO A., TAKEDA Y., UMESHITA K., DOKI Y., DONO K., MONDEN M. Interferon alpha receptors are important for antiproliferative effect of interferon-alpha against human hepatocellular carcinoma cells. **Hepatol Res.**, Amsterdam, v.37, p. 77-83, Jan. 2007.

DE MARCO, F., MANNI, V., GUARICCI, N., MULLER, A., MARCANTE M. L. Induction of apoptotic cell death by IFNbeta on HPV-16 transformed human keratinocytes. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v. 42, p.109-120. Jun. 1999.

DE VILLIERS E. M., FAUQUET C., BROKER T. R., BERNARD H. U., ZUR HAUSEN H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, Nova York, v. 324, p.17-27, Jun. 2004.

DIOP, G., HIRTZIG, T., DO, H., COULONGES, C., VASILESCU, A., LABIB, T., SPADONI, J. L., THERWATH, A., LATHROP, M., MATSUDA, F., AND ZAGURY, J. F. Exhaustive genotyping of the interferon alpha receptor 1 (IFNAR1) gene and association of an IFNAR1 protein variant with AIDS progression or susceptibility to HIV-1 infection in a French AIDS cohort. **Biomed. Pharmacother.**, Nova York, v.60, p.569–577, Nov. 2006.

DOAN T., HERD K., STREET, M., BRYSON G., FERNANDO G., LAMBERT P., & TINDLE R. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein expressed in peripheral epithelium tolerizes E7-directed cytotoxic T-lymphocyte precursors restricted through human (and mouse) major histocompatibility complex class I alleles. **J. Virol.**, Baltimore, v. 73, p. 6166-6170. Jul. 1999.

DONDI E., PATTYN E., LUTFALLA G., OSTADE X.V., UZÉ G., PELLEGRINI, S. & TAVERNIER J. Down-modulation of Type I Interferon Responses by Receptor Cross-competition for a Shared Jak Kinase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.276, p.47004-47012, Dez. 2001.

DUNN, G. P., BRUCE, A.T., SHEEHAN, K. C., SHANKARAN, V. UPPALURI, R., BUI, J. D., *et al.* A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. **Nat Immunol.** New York, v.6, p.722–729, Jul. 2005.

EINHORN S., STRANDER H. Interferon treatment of human malignancies - a short review. **Med. Oncol. Tumor Pharmacother.**, Oxford, v.10, p. 25–29.1993.

EL-SHERIF A. M., R. SETH, TIGHE, P. J. & JENKINS D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. **J. Pathol.**, Londres, v.195, p.179-185. Set. 2001.

FENNER, J. E., STARR, R., CORNISH, A. L., ZHANG, J. G., METCALF, D., SCHREIBER, R. D., SHEEHAN, K., HILTON, D. J., ALEXANDER, W. S., HERTZOG, P. J. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. **Nat Immunol.**, Nova York, v.7, p.33–39, Jan. 2006.

FLODSTROM-TULLBERG M., HULTCRANTZ M., STOTLAND A., MADAY A., TSAI D., FINE C., WILLIAMS B., SILVERMAN R.H., SARVETNICK N. RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase exert complementary roles in islet cell defense during coxsackievirus infection. **J Immunol.** Baltimore, v. 174, n. 3, p. 1171-1177, Fev. 2005.

FONTAINE, V., VAN DER MEIJDEN E., & TER SCHEGGET J. Inhibition of human papillomavirus-16 long control region activity by interferon-gamma overcome by p300 overexpression. **Mol. Carcinog.**, Nova York, v. 31, p. 27-36. Maio. 2001.

FRAZER, I. H., THOMAS R., ZHOU J., LEGGATT G. R., DUNN L., MCMILLAN N., TINDLE, R. W., FILGUEIRA L., MANDERS P., BARNARD P., SHARKEY M. Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 168, p. 131-142. Abr. 1999.

FRODSHAM, A. J., ZHANG, L., DUMPIS, U., TAIB, N. A., BEST, S., DURHAM, A., HENNIG, B. J., HELLIER, S., KNAPP, S., WRIGHT, M., CHIARAMONTE, M., BELL, J. I., GRAVES, M., WHITTLE, H. C., THOMAS, H. C., THURSZ, M. R., AND HILL, A. V. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.103, p.9148–9153, Jun. 2006.

GHOSH P., KOMSCHLIES K. L., CIPPITELLI M., et al. Gradual loss of T-helper 1 population in spleen of mice during progressive tumor growth. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 87, p. 1478-1483. Out. 1995.

GOODBOURN, S., DIDCOCK L., RANDALL R. E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 81, p. 2341–2364. Out. 2000.

GRANDVAUX, N., TENOEVER B. R., SERVANT M. J., HISCOTT J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, Londres, v. 15, p. 259–267. Jun. 2002.

GREENBLATT M. S., MANGALIK A., FEGUSSON J. ELIAS L. Phase I evaluation of therapy with four schedules of 5-fluorouracil By continuous infusion combined with recombinant interferon. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 1, p. 615 – 620. Jun. 1995.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57–70. Jan. 2000.

HASSEL B.A., ZHOU A., SOTOMAYOR C., et al. A dominant negative mutant of 2–5 A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. **EMBO J.**, Oxford, v. 12, p. 3297-304. Ago. 1993.

HERBERMAN R. B. Effect of alpha-interferons on immune function. **Semin Oncol.** Philadelphia, v. 24, n. 3, Suppl 9, p.78-80. Jun. 1997.

HISCOTT, J., PITHA P., GENIN P., NGUYEN H., HEYLBROECK C., MAMANE Y., ALGARTE M., LIN R. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. **J. Interferon Cytokine Res.**, Nova York, v. 19, p. 1-13. Jan. 1999.

HORVARTH T. H., STARK G. R., KEER I. M., DARNEL jr. J. E. Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. **Mol. Cell. Biol.** Washington, v. 16, n. 12, p. 6957–6964. Dez. 1996.

HOVANESEAN A.G.; JUSTESEN J. The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. **Biochimie.** Paris, v.89 p. 779-788, Jun-jul. 2007.

ISAACS A., LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, Londres, v.147, p. 258–267. Set. 1957.

JACOBS N., GIANNINI S. L., DOYEN J. et al. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 111, p. 219-224. Jan. 1998.

JANEWAY, C. A. Jr., MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 20, p. 197-216. Out. 2002.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

JEON S., LAMBERT P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, Washington, v. 92, p. 1654-1658. Feb. 1995.

JOHNSON J. A., HOCHKEPPEL H. K., GANGEMI J. D. IFN-tau exhibits potent suppression of human papillomavirus E6/E7 oncoprotein expression. **J. Interferon Cytokine Res.**, Nova York, v. 19, p. 1107-1116. Out. 1999.

KHAN, M. A., TOLLESON W. H., GANGEMI J. D., PIRISI L. Inhibition of growth, transformation, and expression of human papillomavirus type 16 E7 in human keratinocytes by alpha interferons. **J. Virol.**, Baltimore, v. 67, p. 3396-3403. Jun. 1993.

KIM S.H., COHEN B., NOVICK D., RUBINSTEIN M. Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFN α 1 and IFN α 2. **Gene**, Amsterdam, v. 196, p. 279-286. Set. 1997.

KONYA, J., DILLNER J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. **Adv. Cancer Res.**, Nova York, v. 82, p. 205-238. Jan. 2001.

KOROMILAS, A. E., LI S., MATLASHEWSKI G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 12, p. 157-170. Jun-Set. 2001.

LI S., LABRECQUE S., GAUZZI M. C., CUDDIHY A. R., WONG A. H., PELLEGRINI S., MATLASHEWSKI G. J., KOROMILAS A. E. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. **Oncogene**, 18, 5727-5737. 1999.

MALATHI K., PARANJAPPE J., GANAPATHI R., SILVERMAN R. H. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Cancer Res.** Dec 15;64(24):9144-51, 2004.

MALATHI K., PARANJAPPE J. M., BULANOVA E., SHIM M., GUENTHER-JOHNSON J. M., FABER P. W., ELING T. E., WILLIAMS B. R. G., SILVERMAN R. H. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-Oligoadenylate activation of RNase L. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Oct 11;102 – 141, 2005.

MALMGAARD, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. **J. Interferon Cytokine Res.**, 24, 439-454. 2004.

MATSUMOTO K., OKANO J., MURAWAKI Y. Differential Effects of interferon alpha-2b and beta on the signaling on pathways in human liver cancer cells. **J. Gastroenterol.**, v.40, p. 722 – 732, 2005.

MICHELIN M. A., MURTA E. F. C. Potential therapeutic vaccine strategies and relevance of immune system in uterine cervical cancer. **Eur J. Gynaec. Oncol.** Pádua. V. 29, p10 – 18, mai. 2007.

MILLS K.H., MCGUIRK P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol** 16:107-17, 2004.

MITCHELL M.F., SCHOTTENFELD D., TORTOLERO-LUNA G., CANTOR, S.B., & RICHARDS-KORTUM R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: Meta-analysis. **Obstet. Gynaecol.**, 91, 626-31, 1998.

MONIZ M., LING M., HUNG C. F., WU T. C. HPV DNA vaccines. **Front Biosci**, 1,(8) d55-68, 2003.

MOSMANN T. R., SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol today**, 17, 138-146. 1996.

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

MURTA E. F., TAVARES MURTA B. M. Successful pregnancy after vaginal cancer treated with interferon. **Tumori**, 90, (2) 247-248. 2004.

NAWA, A., NISHIYAMA Y., YAMAMOTO N., MAENO K., GOTO S., TOMODA Y. Selective suppression of human papilloma virus type 18 mRNA level in HeLa cells by interferon. **Biochem Biophys Res Commun**, 170, 793-799. 1990.

NOVICK D., COHEN B., Rubinstein M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. **Cell**, 77, 391–400. 1994.

OTA H., NAGANO H., SAKON M., EGUCHI H., KONDO M., YAMAMOTO T., NAKAMURA M., DAMDINSUREN B., WADA H., MARUBASHI S., MIYAMOTO A., DONO K., UMESHITA K., NAKAMORI S., WAKASA K., MONDEN M. Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon-alpha and intra-arterial 5-fluorouracil; role of type 1 interferon receptor expression. **Br J Cancer**, Londres, v. 93, p. 557-564, Set. 2005.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

PAO, C. C., LIN C. Y., YAO D. S., TSENG C. J. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, 214, 1146-1151. 1995.

PAWELEC, G. Tumor escape: antitumor effectors too much of a good thing? **Cancer Immunol Immunother**, 53: 262-274. 2004.

PEREA, S. E., LOPEZ-OCEJO O., GARCIA-MILIAN R., ARANA M. J. Interferon-alpha elicits downregulation of human papillomavirus 18 mRNA in HeLa cells by selective repression of endogenous viral transcription. **J Interferon Cytokine Res**, 15, 495-501. 1995.

PISANI P., PARKIN D. M., BRAY F., FERLAY J., Estimates of the worldwide mortality for 25 cancers. **Int J Cancer**, 83, 18-29. 1990, 1999.

PLATANIAS, L.C. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. **Pharm. Ther.** 98, 129-142. 2003.

PLATANIAS, L. C., UDDIN, S., COLAMONICI, O. R. Tyrosine phosphorylation of the D and E subunits of the type I Interferon receptor. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.17761-17764, 1994.

PLATANIAS L.C. Mechanisms of type-I and type-II interferon-mediated signaling. **Nat Rev immunol**. London. V.5, p.375-386, may. 2005.

PLAYER M. R., TORRENCE P. F. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. **Pharmacol Ther**, 78, 55-113. 1998.

POPESCU, N. C., Di PAOLO J. A. Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. **Cancer Res**, 50, 1316-1323. 1990.

REITER, Z. Interferon - major regulator of natural killer cell mediated cytotoxicity. **Journal of Interferon Research**, 13, 247-257.1993.

RICHART R. M., SHINGLETON H. M., WIENER J., SPIRO D. Human cervical intraepithelial neoplasia: fine structure of dysplasia and carcinoma in situ. **Cancer Res**. 28(4):695-706. 1968.

RONCO, L. V., KARPOVA A. Y., VIDAL M., HOWLEY P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev**, 12, 2061-2072. 1998.

SAIDI, R. F., WILLIAMS, F., N.G. J., DANQUAH G., MITTAL V. K., REMINE S. G., JACOBS M. J. Interferon receptors and the caspase cascade regulate the antitumor effects of interferons on human pancreatic cancer cell lines. **Am J Surg**, 191, (3) 358-63. 2006.

SAITO, T., JI, G., SHINZAWA, H., OKUMOTO, K., HATTORI, E., ADACHI, T., TAKEDA, T., SUGAHARA, K., ITO, J. I., WATANABE, H., SAITO, K., TOGASHI, H., ISHII, K., MATSUURA, T., INAGEDA, K., MURAMATSU, M., AND KAWATA, S. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. **Biochem Biophys Res Commun.**, Nova York, v. 30; p. 335-341, Apr. 2004.

SAMUEL C. E. Antiviral Actions of Interferons. **Clin Microbiol. Rev.**, v.14, p.778-809, 2000

SCHIFFMAN, M. H., BRINTON L. A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer**, 76, 1888-1901. 1995.

SOLOMON D., DAVEY D., KURMAN R., MORIARTY A., O'CONNOR D., PREY M., et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002 Apr 24; 287(16): 2114-9.

SPELLBERG B., EDWARDS J.E. Type1/type 2 immunity in infectious diseases. **Clin Infect Dis**, 32, 76–102. 2001.

STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. **J Reprod Immunol**, 52, 45-59. 2001.

STARK G. R., KERR I. M., WILLIAMS B. R., SILVERMAN R. H., Schreiber R. D. How cells respond to interferons. **Annu Rev Biochem**, 67, 227-264. 1998.

TAKAOKA A., YANAI H. Interferon signaling network in innate defence. **Cellular Microbiology** :8(6) 907-922. 2006.

TAMIM H., FINAN R.R., SHARIDA, H.E., RASHID, M., ALMAWI Y. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and chlamydia trachomatis. **Diag Microb Inf Disease**, 43, 277-281. 2002.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Rev Cancer**, 2, 59-65. 2002.

TOUGH D.F., SUN S., ZHANG X., SPRENT J. Stimulation of naive and memory T cells by cytokines. **Immunol Rev**, 170, 39-47. 1999.

UTHAISANGSOOK S., DAY N. K., BAHNA S. L., GOOD R. A., HARAGUCHI S. Innate immunity and its role against infections. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 88, 253-264; quiz 265-256, 318. 2002.

UZE G., LUTFALLA G., BANDU, M. T., PROUDHON D., MOGENSEN, K.E. Behaviour of a cloned murine interferon α/β receptor expressed in homospecific or heterospecific background. **Proc Natl Acad. Sci. USA**, 89, 4774-4778. 1992.

WALBOOMERS J. M., JACOBS M. V., MANOS M.M., BOSCH F.X., KUMMER J. A., SHAH K.V., SNIJDERS P.J., PETO J., MEIJER C. J., MUNOZ N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**. 189(1):12-9.1999.

WANG L., ZHOU A., VASAVADA S., DONG B., NIE H., CHURCH J.M., WILLIAMS B.R., BANERJEE S., SILVERMAN R.H. Elevated levels of 2',5'-linked oligoadenylate-dependent ribonuclease L occur as an early event in colorectal tumorigenesis. **Clin Cancer Res**. (11):1421-8, 1995.

WEI, L. H., KUO M. L., CHEN C. A., CHENG W. F., CHENG V. S. P., HSIEH F. J., HSIEH C. Y. Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor. **Gynecol Oncol**, 82, 49-56. 2001.

WEINER H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- β -secreting regulatory cells. **Microbes Infect**. 11:947-54, 2001.

WERNES, B. A., LEVINI A. J., HOWLEY P. M. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, 248, 76-79. 1990.

WOODWORTH, C. D., SIMPSON S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. **Am J Pathol**, 142, 1544-1555. 1993.

WOODWORTH, C. D., LICHTI U., SIMPSON S., EVANS C. H., DIPAOLO J. A. Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. **Cancer Res**, 52, 456-463. 1992.

YONEYAMA M.; KIKUCHI M.; NATSUKAWA T.; SHINOBU N.; IMAIZUMI T.; MIYAGISHI M.; TAIRA K.; AKIRA S.; FUJITA T. The RNA helicase RIG- I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nature Immunol.** New York, v.5, p.730–737. jul. 2004.

YORK, I. A., ROCK, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. **Annual Review of Immunology**, 14, 369-396.1996.

ZHOU A., PARANJAPPE J., BROWN T. L., NIE H., NAIK S., DONG B., CHANG A., TRAPP B., FAIRCHILD R., COLMENARES C., SILVERMAN R.H. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. **EMBO J.** v.16, p.6355-63, 1997.

ZIMMERER J.M., LESINSKI G.B., KONDADASULA S.V., KARPA V.I., LEHMAN A., RAYCHAUDHURY A., BECKNELL B., CARSON W.E. IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins. **J Immunol.** Baltimore, v.178, p.4832-4845, Apr. 2007.

ZUR HAUSEN H., De VILLIERS E. M. Human papillomaviruses. **Annu Rev Microbiol.** v.48, p.427-47. 1994.

ZUR HAUSEN H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. **Lancet**, v.2, p.489-491. 1986.