

ESTADO DO GENE PARA P53 E INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS EM PACIENTES COM NEOPLASIA CERVICAL

P53 STATUS AND PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN PATIENTS PRESENTING CERVICAL NEOPLASIA

Ledy HS Oliveira¹, André P Fernandez², Brunno LS Xavier³, Eliane VM Rodrigues⁴, José AS Pantaleão⁴, Silvia MB Cavalcanti¹

RESUMO

O gene supressor de tumor p53 expressa uma proteína que atua como regulador negativo do ciclo celular quando ocorre uma lesão no DNA. Alterações nesta proteína por mutação do gene ou por inativação por proteínas virais podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias malignas. A proteína viral E6 dos papilomavírus humanos de alto risco para câncer cervical se liga à proteína p53, promovendo a desregulação do ciclo celular. Analisamos cinco casos de lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II e III) para detecção de HPV e para alterações no gene para p53. As lesões NIC III foram positivas para HPV e uma delas apresentava alterações no exon 7 da p53. Considerando que mutações no gene para a p3 são um evento tardio no desenvolvimento do câncer, a mutação encontrada em uma lesão pré-maligna poderia contribuir para o prognóstico do câncer cervical. Esta paciente estava também infectada por HPV 16 e 18. Em uma paciente com NIC III infectada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), somente o HPV tipo 6 foi encontrado, embora tenhamos testado as amostras com cinco tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33 e 35). As lesões NICII foram negativas para HPV e para p53 mutante.

Palavras-chave: HPV, HIV, neoplasia cervical intra-epitelial

ABSTRACT

The P53 tumor suppressor gene encodes a protein which functions as a negative regulator by controlling cell cycle when the DNA is damaged. P53 gene mutations or p53 inactivation by viral proteins may contribute to the development of malignant neoplasias. The E6 viral protein of oncogenic human papillomavirus binds p53 and promotes the deregulation of the cell cycle. Five cases of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN II and CIN III) were analysed in order to detect HPV infection and p53 gene changes. All CIN III lesions were positive for HPV DNA and one of them presented mutation in the exon 7 of the p53 gene. Considering that changes in the p53 gene are a late event in the cancer development, the mutation found in a pre-malignant lesion may help in the prognosis of the cervical cancer. This patient was also infected with HPV 16 and 18. Benign HPV 6 was the exclusive type found in a CIN III of an HIV positive patient although we tested the samples with five high risk HPV types (16, 18, 31, 33 e 35). The CIN II lesions had neither HPV nor p53 mutation.

Keywords: HPV, HIV, cervical intraepithelial neoplasia

ISSN: 0103-0465

DST - J bras Doenças Sex Transm 13(2):40-43, 2001

INTRODUÇÃO

Certos genes celulares desempenham um papel importante na causa de alguns tipos de tumores humanos. São os denominados genes supressores de tumores e operam de forma dife-

rente dos oncogenes, pois a perda ou alteração dos mesmos altera os mecanismos de controle do crescimento celular¹.

A proteína p53 é um produto de um gene supressor de tumor. Na divisão normal da célula, a p53 não é necessária, porém quando o DNA é de alguma forma lesado, sua função reparadora é induzida. Nas células em que a p53 é inativada total ou parcialmente por mutação ou por oncoproteínas virais, ocorre replicação de DNA lesado, resultando em mutação, aneuploidia, falha mitótica, ou morte celular². Alterações no gene que expressa a p53 podem ser detectadas por PCR seguido de seqüenciamento ou eletroforese com temperaturas determinadas^{3, 4} ou pela análise de polimorfismo conformacional

¹Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Doutora em Microbiologia

²Graduando em Medicina - Universidade Federal Fluminense, bolsista do CNPq

³Graduando em Enfermagem e Obstetrícia - UFF, bolsista do CNPq

⁴Prof. Adjunto-Ginecologia, Faculdade de Medicina, UFF

Apoio CNPq

de fita única (SSCP), baseado na propriedade das moléculas de fita simples de DNA formarem estruturas secundárias dependendo de sua seqüência primária de nucleotídeos sob condições não desnaturantes. Consequentemente, a mobilidade eletroforética da fita simples torna-se relacionada a sua conformação e indica diferenças na seqüência de DNA⁵. A maioria das mutações encontradas nos tumores está agrupada dentro da porção central do gene que codifica para a proteína p53, nos exons de 5, 6, 7 e 8.

Os papilomavírus humanos (HPV) infectam o tecido epitelial e causam lesões produtivas hiperproliferativas autolimitadas. Certos tipos de HPV têm potencial oncogênico e a infecção por tais tipos contribui para o desenvolvimento de cânceres, principalmente no trato genital feminino. Com base em estudos epidemiológicos verificou-se que existem tipos associados a lesões benignas, chamadas de baixo risco e tipos associados a lesões malignas, os tipos de alto risco. Os tipos 6 e 11 são geralmente encontrados nas verrugas (condiloma acuminado). Os tipos de alto risco (16 e 18) mais freqüentemente são encontrados em displasias de alto grau. HPVs de alto risco expressam altas concentrações da proteína viral E6, que se liga à proteína p53, promovendo a desregulação do ciclo celular⁶.

O objetivo do presente trabalho é verificar a presença de alterações nos exons 5 a 8 do gene supressor de tumor p53 e a presença de HPV em lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II e III) de pacientes atendidas no ambulatório de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense UFF.

METODOLOGIA

Specimens

Foram analisadas cinco lesões cervicais de alto grau de pacientes atendidas na Unidade Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da UFF. Após exame clínico e colpocitológico, as pacientes foram biopsiadas para exame histológico. Para detecção de HPV e mutações na p53, esfregaços cervicais foram coletados em tubos contendo tampão Tris-EDTA, e estocados a -20° C. Dados demográficos (sexo, idade, local de nascimento, origem étnica, estado civil, escolaridade, nível socioeconômico) e fatores de risco (número de partos, abortos, hábito de fumar, uso de drogas, sexarca, número de parceiros sexuais, história de doenças sexualmente transmissíveis, história familiar de neoplasia, colpocitologia, histologia, uso de imunossuppressores, soropositividade para HIV, contraceptivos) foram obtidos das pacientes através de um questionário. Todas as pacientes assinaram consentimento como participantes de uma pesquisa científica.

Extração de DNA

A extração do DNA das amostras foi obtida pelo método de saturação de sal (Howe *et al.* 1997). Os esfregaços cervi-

cais foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos. A seguir foram incubadas durante 4 horas à 37°C em 200 microlitros de tampão de digestão (10 mmol de Tris-pH 8,3; 1 mmol de EDTA pH 8,0; 0,5 % de Tween 20 e proteinase K 400 g de concentração final). A enzima foi inativada por 10 minutos a 94°C. A precipitação das proteínas foi obtida adicionado-se 50 microlitros de NaCl saturado (6M) seguido de centrifugação a 4000rpm à temperatura ambiente durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido para um novo tubo. A precipitação de DNA foi alcançada com adição de 1/10 do volume de acetato de sódio (3M) seguido de 2,5 volumes de etanol 100% *overnight*. Seguiu-se então uma centrifugação à 4°C durante 30 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi então removido, o *pellet* foi lavado ao se adicionar 70% de etanol e centrifugado à 4°C a 14000 rpm durante 15 minutos. O *pellet* foi seco e ressuspenso em 50 microlitros de água esterilizada.

Amplificação do HPV pelo método de PCR

Amplificação com oligonucleotídeos genéricos - Utilizamos os oligonucleotídeos genéricos MY-09/ MY11 relativos à proteína do capsídeo viral L1. A amplificação foi iniciada em 50 microlitros da mistura da reação (1XPCR tampão; 50 M de dNTPs; 1,5 mM MgCL2; 50 pM de cada primer; 0,25 U da Taq polimerase; e 5microlitros da amostra) com 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo incluiu um processo de desnaturação à 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento à 55°C durante 2 minutos, e um etapa de alongamento da cadeia à 72°C durante 2 minutos. Para monitorar a contaminação do DNA na reação de PCR foi utilizado um tubo contendo água. Os primers de genes da actina humana, que amplificam uma região 310 bp do DNA humano, foram usados como controle interno. Os produtos de PCR foram analisados e visualizados em U.V. após eletroforese em gel de agarose 1,3% e corados com brometo de etídeo.

Amplificação com oligonucleotídeos específicos - O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para detecção de HPV tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 com oligonucleotídeos relacionados ao gene E6 (Tabela 1).

Detecção de mutações nos exons 5,6, 7 e 8 do gene para p53 pelo método de PCR-SSCP

A amplificação do DNA das amostras foi processada com oligonucleotídeos dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene para a p53 (Tabela 2). Um l das amostras foi adicionado à mistura de reação e submetidas a 35 ciclos de 30 segundos a 94C; 1 minuto a 60C e 1 minuto a 72C com alongamento final de 10 minutos a 72C . Os

Volumes iguais de produtos de PCR (5 microlitros) e tampão de formamida (95% de formamida; 10mM de EDTA; 0,05 % de bromofenol azul; 0,05% xilenocianol) foram aquecidos à 95° por 10 minutos. A reação foi deixada congelada até ser

Tabela 1 - Oligonucleotídeos do gene E6 dos HPV's tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 usados na reação de amplificação.

DNA HPV	Oligonucleotídeos
6 P1/P2	CAC CAT AAG GTC CTG TTT/ GAA CCG CGC CTT GGT TAG
11P1/P2	CGC AGA GAT ATA TGC ATA TG/ AGT TCT AAG CAA CAG GCA CA
16P1/P2	CC AGA AAG TTA CCA CAG/ TAC TAT GCA TAA ATC CCG
18P1/P2	GAA ACC GTT GAA TCC AGC/ GTT CCT GTC GTC CTC GGT
31P1/P2	GAC CTC GGA AAT TGC ATC/ TGT TTC TGT TAA CTG ACC
33P1/P2	GTA TAT AGA GAG GGA AAT/TAA AGG TTT TTT AAC TGT
35P1/P2	ACA AGA ATT ACA GCG GAG/TAA CTG TTT GTT GCA TTG

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos e produtos de PCR dos exons 5 a 8 do gene supressor de tumor p53

Exons (bp)	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do produto do PCR
5	TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT AGC AAT CAG TGA GGA ATC AG	310
6	TGG TGG CCC AGG GTC CCC AG TGG AGG GCC ACT GAC AAC CA	223
7	CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA AGG GGT CAG VGG CAA GCA GA	248
8	TTG GGA GTA GAT GGA GCC T	313

submetida à eletroforese com gel de poliácridamida (49:1 acrilamida-bisacrilamida). Após a corrida, o gel foi fixado em 7,5% do ácido acético, lavado, e corado com prata. O gel foi mergulhado então em 10% de etanol e 1% de ácido nítrico e imerso em solução de impregnação (0,1 de nitrato de prata e 150m microlitros de formaldeído em 100 microlitros de água),

visualizado em solução reveladora (3 gramas de carbonato de sódio; 150 microlitros de formaldeído; e 100 microlitros de tiossulfato de sódio em 100 microlitros de água), e fixado em 10% de ácido acético por 5 minutos^{7,8}.

RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**. Três das cinco pacientes apresentaram NIC III e duas apresentaram NIC II. As lesões NIC III foram positivas para HPV. Em duas destas lesões detectamos HPV de alto risco, mas na paciente infectada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), somente o HPV tipo 6 foi encontrado (**Figura 1**). Uma paciente apresentou alterações no exon 7 da p53. As lesões NICII foram negativas para HPV.

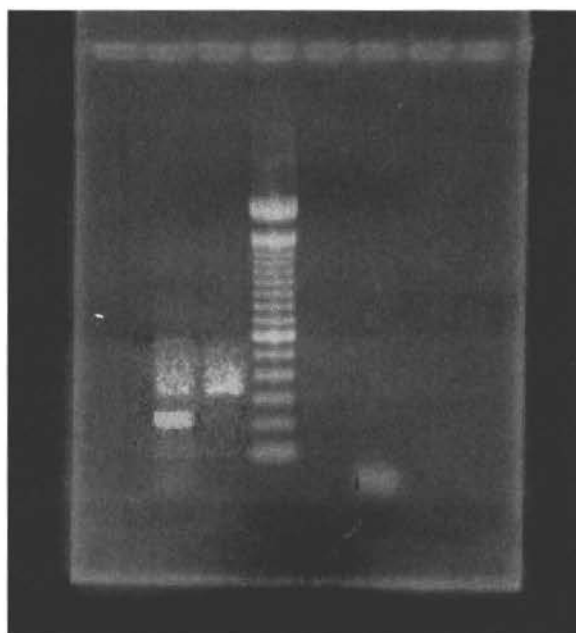


Figura 1 - Detecção de HPV 6 por PCR em NIC III de paciente portadora de HIV. 1 - Amostra positiva para HPV 6 - banda de 230 bp (seta). 2 - Amostra negativa, observando-se a presença de banda para o gene para actina. 3 - Padrão de peso molecular - 100bp

Tabela 3 - Presença de HPV e alterações na p53 em pacientes com lesões epiteliais de alto grau.

Paciente	Dados clínicos	Citologia/ histologia	Detecção de HPV		Resultados/p53	
			L1	tipo/ E6	Estado	exon
1	NIC	NIC II	N	N	Normal	
2	NIC	NIC III	P	16	Normal	
3	NIC II	NIC II/HPV	N	N	Normal	
4	NIC II/HIV	NIC III/HPV	P	6	Normal	
5	Assintomático	NIC III	P	16, 18	Mutante	7

P - Positivo N - Negativo

DISCUSSÃO

Testamos a presença de alterações no gene para p53 e infecção por HPV em cinco casos de lesões de alto grau - neoplasias *intra-epiteliais* cervicais grau 2 e 3, a partir de esfregaços de cinco pacientes rotineiramente atendidas em um ambulatório de Ginecologia. Mutações na p53 geralmente são encontradas em neoplasias malignas mas não são comuns em cânceres cervicais⁹. A detecção de alteração em uma lesão pré-maligna que encontramos é um evento raro e pode ser falso positivo, o que poderia ser comprovado após a realização de seqüenciamento. Entretanto, a técnica de SSCP tem sido documentada como bastante eficaz na detecção de mutações no gene para p53 em vários tipos de câncer¹⁰. O fato desta paciente estar infectada por HPV 16 e 18 sugere que a lesão seja decorrente de infecção viral. Neste caso, o processo de mutação em uma lesão pré-maligna poderia ser de valor prognóstico para o câncer cervical. Esta paciente foi tratada por cirurgia e ainda não retornou ao Serviço para uma nova avaliação.

Infecções virais são comuns em pacientes portadores de HIV e são utilizadas como marcadores para a infecção e progressão da doença. Infecções por HPV no trato genital são frequentes em pacientes com HIV, assintomáticas ou não. Embora tenhamos testado as amostras com cinco tipos de HPV de alto risco (16,18, 31,33 e 35) mais comuns nas lesões cervicais de alto grau, detectamos nesta paciente somente o tipo 6, de baixo risco. A presença deste tipo, considerado benigno, em uma lesão de alto grau sugere que o sistema imune da paciente esteja deprimido, facilitando o processo de transformação maligna no epitélio cervical. De fato, vários autores sugerem que pacientes imunodeficientes desenvolvam lesões malignas com maior frequência, mesmo quando infectados com vírus de baixo potencial oncogênico^{11,12}. Entretanto, devemos considerar também, que esta lesão tenha sido originada por um tipo de HPV de alto risco não testado. Neste caso, HPV 6 seria mais uma infecção oportunista na paciente, que também apresentava sífilis e herpes genital na época da consulta. Estas DST vem sendo associadas à progressão das lesões por HPV ao câncer genital¹³.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Greenblat, M.S.; Bennet, W.P.; Hollstein, M.; Harris, C.C. Mutations in the p53 tumour suppressor gene: clues to cancer

- etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4885-4878,1994
2. Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* (London), 358: 15-16, 1992
3. Kurvinen, K.; Hietanen, S.; Syrjänen, K.; Syrjänen, S. Rapid and effective detection of mutants in the p53 gene using non-radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on PhasSystem™. *J. Virol methods*, 51:43-54, 1995
4. Kim, J.W.; CHO, Y. H.; Chum, G.L.; KIM, J. *et al.* Human papillomavirus infection and TP53 gene mutation in primary cervical carcinoma. *Acta Oncologica*,36:295-300, 1997
5. Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T.; Hayashi, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879, 1989
6. Turek, L.P. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv. Viral Res.*, 44: 305-356, 1994
7. Caetano-Anóles, G.; Gresshoff, P.M. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes*, 45:13, 1994
8. Soon, R.; Iacopeta, B.J. A rapid and nonisotopic method for the screening and sequencing of p53 gene mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tumours. *Methods in Pathology*, 10:252-258, 1997
9. Limpaboon T, Pooart J, Bhattarakosol P, Niruthisard S, Chantratita W, Lulitanond V. P53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma. *Asian J. Trop. Med. Public Health*, 31:66-71, 2000
10. Pinheiro, N.A.; Moura, R.P.; Monteiro, E; Villa, L.L. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 55-58, 1999
11. Ho G.Y.F.; Burk, R.D.; Fleming, I.; Klein, R.S.; Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus - induced immunosuppression *Int. J. Cancer*, 56:788-792, 1994
12. Cavalcanti, S..M.B; Deus, F.C.C.; Oliveira, L.H.S. Unusual HPV types in cutaneous warts in association with immunological deficiency. *Mem. Oswaldo Cruz*, 93 (4):433-434, 1998
13. Cavalcanti, S. M.B.; Zardo, L. Z.; Passos M.R.L.; Oliveira, L.H.S. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection in cervical cancer in Brazil. *J. Infection*, 40:80-97, 2000

Endereço para correspondência:

Ledy HS Oliveira

Laboratório de Virologia - Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFF

Rua Hernani Pires de Melo, 101, Centro

Niterói-RJ-Brasil, 24230-130