

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES E6 E E7 DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Ana Beatriz Camillo Santos (PIC/Uem), Thaise Andreia Ferreira (PIC/Uem),
Tamy T. Suehiro, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Cristiane Suemi Shinobu
Mesquita (Orientador), e-mail: abeatrizsantos99@gmail.com,
thaiseand@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde/Maringá, PR.

**Área: 20600003 - Ciências Biológicas II, Subárea: 20601000 -
Morfologia: Citologia e Biologia Molecular**

Palavras-chave: HPV-AR, oncoproteínas, q-PCR.

Resumo:

A infecção persistente por *Papillomavirus* humano de alto risco (HPV-AR) representa o principal fator na gênese do câncer cervical, evidenciada pela superexpressão dos oncogenes E6 e E7, que inativam as proteínas supressoras de tumor. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar a padronização de metodologia de PCR em tempo real para verificar a expressão de E6 e E7 de HPV 16 e 18, sendo realizadas as etapas de confecção e avaliação dos primers, extração de DNA e obtenção de cDNA e determinação dos níveis de RNAm dos oncogenes E6 e E7 de HPV 16 e 18 através de PCR em tempo real quantitativo (q-PCR). Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que a reação de PCR em tempo real para as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 e 18 foi padronizada, uma vez que foi possível se verificar a amplificação dos genes selecionados.

Introdução

O câncer cervical representa a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil e a estimativa mundial mostra que é o quarto câncer mais frequente no mundo². A taxa bruta de mortalidade no Paraná e Maringá em 2018 foi de 6,69 e 4,90/100.000 mulheres, respectivamente³.

O HPV, possui mais de 200 tipos identificados, sendo que os tipos 16 e 18 podem ser classificados como de alto risco oncogênico e relacionam-se com o carcinoma cervical, anogenital e oral^{4,1}.

O HPV possui proteínas importantes para o ciclo viral e a transformação celular. As proteínas E6 e E7, conhecidas como oncoproteínas, são necessárias para a proliferação e sobrevivência do vírus nas células cervicais, promovendo a degradação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb^{4,5}. Uma vez que a superexpressão de E6 e E7 pode estar relacionada com a progressão da neoplasia intraepitelial cervical de grau 1

para o grau 3, o mRNA dessas proteínas é um biomarcador promissor para a triagem de lesões do colo do útero, trazendo uma vantagem: a detecção precoce de uma infecção, antes das anormalidades citológicas ocorrerem^{5,1}. Neste estudo, utilizamos a tecnologia PCR em tempo real para determinar a expressão das oncoproteínas E6 e E7, que desempenham a função de possíveis biomarcadores, capazes de detectar uma infecção precoce pelos HPV-AR 16 e 18.

Materiais e métodos

Amostras em estudo

As amostras utilizadas para o estudo foram disponibilizadas pelo Laboratório de Citologia Clínica/UEM (Parecer do Comitê de Ética CAAE: 50688815.0.0000.0104 04/11/2015). Foi realizado PCR simples para selecionar as amostras HPV positivas para os tipos 16 e 18, utilizando o Kit Multiplex XGEN MULTI HPV CHIP HS12, seguindo as instruções do fabricante.

Confecção e avaliação dos primers

Após o levantamento bibliográfico no GenBank dos genes E6 e E7 de HPV 16 e 18, e também de genes endógenos GAPDH e PPIA, os primers foram confeccionados, utilizando os softwares IDT e o Primer 3 para a montagem dos primers Forward e Reverse. Análise dos parâmetros de qualidade bem como afinidade dos primers à sequência alvo foram realizados no Clustal Omega, no Oligoanalyzer (IDT) e BLAST (PubMed). Os primers foram adquiridos comercialmente (Thermo Fischer).

Extração do material genético

A extração genômica de DNA-RNA foi realizada utilizando kit de extração PureLink® Viral RNA/DNA (Invitrogen, Ca, EUA) seguindo o manual de instruções do fabricante. A qualidade e quantificação do material genético purificado foi realizado em espectrofotômetro (NanoDrops 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). O DNA complementar (cDNA) do HPV para expressão dos genes E6 e E7 foi obtido por meio da transcriptase reversa pelo KIT Superscript III RT® Supermix kit (Invitrogen), seguindo manual de instruções do fabricante.

Expressão de E6 e E7 do HPV

Os níveis de RNAm dos oncogenes E6 e E7 do HPV foram determinados por PCR em tempo real quantitativo (q-PCR). A padronização da técnica de PCR em tempo real foi realizada com um sistema de PCR em tempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems) juntamente com 0,5 µmol/L de cada primer e 100 ng de cDNA. O volume final da reação foi de 20 µL e continha 5 µL de cDNA e 15 µL da mistura principal PowerUp SYBR Green (Thermo Fisher Scientific Inc.). Uma curva de Melting foi construída para cada par de primers para confirmar a especificidade do produto. Controles positivos HPV

contendo DNA da linha celular e controles negativos, controle endógeno humano GAPDH e PPIA foram usados como normalizadores. Para excluir variações de corrida, todas as reações foram realizadas em triplicata. Também foram realizados testes de eficiência do primer com concentrações variando de 100 a 600 nM com o objetivo de encontrar a concentração ótima de reação, capaz de gerar um baixo valor de Ct, com maior valor de ΔR_n e ausência de dímeros. Após avaliar a concentração ótima dos primers, foram realizadas diluições seriadas do cDNA de diferentes amostras para verificar a eficiência do experimento que é indicado pela inclinação da curva padrão. O ideal de eficiência encontra-se na faixa de 90 a 100% e a inclinação da curva padrão de $-3,32$.

Resultados e Discussão

A padronização da metodologia de PCR em tempo real para as oncoproteínas E6 e E7, determinando suas taxas de expressão foi concluída. Foram desenhados diversos pares de primers possíveis para os genes E6 e E7 de HPV16 e HPV18, bem como para os genes endógenos GAPDH e PPIA, para avaliação dos parâmetros, com o objetivo de selecionar os melhores primers. Após a avaliação dos parâmetros de reação e afinidade ao gene dos primers desenhados, foram selecionados os primers presentes na Tabela 1, que apresentaram melhor desempenho nas análises realizadas.

Tabela 1. Desenho dos Primers selecionados para HPV16 E6 e E7, HPV18 E6 e E7, GAPDH e PPIA.

Gene		Forward Primer	Reverse Primer
HPV 16	E6	AATGTTTCAGGACCCACAGG	CCCGAAAAGCAAAGTCATATACC
	E7	GTGACTCTACGCTTCGGTTG	TGCCATTAACAGGTCTTCC
HPV 18	E6	GCTTTGAGGATCCAACACGG	AAGTGTTTCAGTTCGGTGCA
	E7	GTGTGAAGCCAGAATTGAGC	ACAAAGGACAGGGTGTTCAG
GAPDH		CTCCCACCTTTCTCATCCAAG	ACATCACCCCTCTACCTCC
PPIA		GACTGTGGACAACCTCGAATAA	AGGATACTGCGAGCAAATG

Através dos resultados obtidos, foi possível observar que a reação de PCR em tempo real para as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 e 18 foi padronizada, uma vez que foi possível obter amplificação dos genes selecionados. Além disso, a etapa de confecção dos primers também foi bem sucedida, uma vez que foi possível realizar a amplificação das oncoproteínas. Dessa forma, foi possível observar que a expressão relativa das oncoproteínas E6 e E7 foram maiores nas amostras de HPV 18 quando comparadas as amostras de HPV 16. Entretanto, essa diferença não foi estaticamente significativa.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que a reação de padronização da técnica de PCR em tempo real para as oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16 e 18 foi realizada com sucesso, uma vez que foi possível observar presença de amplificação das amostras avaliadas. Além disso, é importante ressaltar que, para que a reação ocorra adequadamente, é muito importante a etapa de confecção dos primers, uma vez que primers que não sejam capazes de se ligar à sequência alvo, não serão capazes de permitir a ocorrência da reação.

Referências

- 1.Harden M.E., Munger K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutat Res Rev Mutat Res.** 2017; 772: 3-12. doi:10.1016/j.mrrev. 2016.07.002.
- 2.Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde, 2019. Disponível em:<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>> Acesso em: 8 de jul. de 2020.
- 3.Instituto Nacional de Câncer. Atlas on-line de mortalidade. Ministério da Saúde, c 1996-2014. Disponível em:<<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade/>>. Acesso em: 8 de jul. de 2020.
- 4.Magaldi T. G., Almstead L. L., Bellone S., Prevatt E. G., Santin A. D., DiMaio D. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. **Virology.** 2012;422(1):114–124. doi: 10.1016/j.virol.2011.10.012.
- 5.Pan C., et al. Development and validation of a multiplex reverse transcript real-time PCR for E6/E7 mRNA detection of high-risk human papillomavirus. **J Med Microbiol.** 2018;67(10):1509–1514. doi: 10.1099/jmm.0.000824.