

GENOTIPAGEM DA p53 EM LINHAGENS TUMORAIS E SUSCEPTIBILIDADE DOS GENÓTIPOS AO RISCO DE CONTAMINAÇÃO PELO VÍRUS HPV

BASGALUPP, Suélen Porto¹, ENTIAUSPE, Ludmila¹; NEDEL, Fernanda¹, THUROW, Helena¹, COLLARES, Tiago²;

SEIXAS, Fabiana Kömmling¹

Grupo de Oncologia Celular e Molecular

¹*Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas*

²*Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas
suelenbasgalupp@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A linhagem HeLa de células cancerosas, doada pela paciente Henrietta Lacks quando recebia tratamento para um câncer cervical, foi a primeira cultura celular a ser realizada com sucesso, amplamente conhecida por apresentar infecção pelo genótipo oncogênico 18 do papilomavírus humano (HPV-18). Tal linhagem, distribuída internacionalmente, passando de laboratório para laboratório, permitiu que a comunidade científica tivesse acesso direto aos efeitos causados pela infecção viral. Esta linhagem é particularmente resistente e de crescimento agressivo, podendo sobrepor-se rapidamente à células de origens diferentes, contaminando-as. Esse fato acaba por acarretar em uma problemática na identificação dos demais cultivos celulares, causando a contaminação cruzada (ATCC *et al.*, 2010).

Em células infectadas pelo HPV, a oncoproteína E6 do vírus liga-se a um dos principais genes supressores de tumores, o *Tp53*, e promove sua degradação, alterando sua atividade nos processos de tumorigênese, regulação da transcrição, ativação da telomerase e apoptose, acarretando em um consequente descontrole do ciclo celular (Muñoz *et al.*, 2006). O polimorfismo deste gene supressor de tumor, no códon 72, tem sido investigado extensivamente para associação com vários cânceres em todo o mundo, estando presente em 70% dos casos da doença (Arruda *et al.*, 2008). O códon 72 codifica um aminoácido arginina (CGC; Arg72) e um prolina (CCC; Pro72), correspondendo à arginina/prolina (Arg/Pro) (Tada *et al.*, 2001).

Estudos analisaram a relação entre o polimorfismo do códon 72 da p53 e o risco de desenvolvimento de câncer cervical, sugerindo que certos genótipos da p53 são mais susceptíveis à degradação pelo HPV (Muñoz *et al.*, 2006; Arruda *et al.*, 2008). O genótipo Arg/Arg versus Arg/Pro ou Pro/Pro para o códon 72 do gene p53 tem sido considerado um importante fator que aumenta em até sete vezes o risco para as neoplasias cervicais (Storey *et al.*, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo verificar se as linhagens celulares LNCAP e SH-Sy5y foram expostas à contaminação pelo HPV presente na cultura celular HeLa, também manipulada no mesmo laboratório, e a

susceptibilidade dos genótipos da p53 presentes nestas linhagens ao risco de contaminação pelo HPV.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo Celular

Foram utilizadas as linhagens celulares humanas de carcinoma de próstata (LNCAP), carcinoma cervical (HeLa) e neuroblastoma (SH-SY5Y), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e mantidas no Núcleo de Cultivo Celular do Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese do CDTec. As células foram mantidas em RPMI 1640 (LNCaP) ou Meio de Earle Modificado por Dulbecco - DMEM (Hela e SH-SY5Y) e suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100U/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil). Foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% e 5% de CO₂. Para a manutenção da viabilidade celular, realizou-se a troca do meio a cada dois ou três dias. Após atingirem 80% de confluências, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas com tripsina/EDTA em solução (Vitrocell Embriolife). Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas por 10 min a 1.200 rpm e o sobrenadante descartado. As células foram mantidas a -80°C até a extração do DNA genômico.

2.2 Extração do DNA genômico

Os tubos foram submetidos à digestão com 1,5 µL de Proteinase K (10mg/ml) e incubação *overnight* à temperatura ambiente. O material genômico extraído (DNA) foi purificado utilizando o protocolo de extração do Kit PUREGENE™ Genra Systems, conforme especificações do fabricante.

A detecção do HPV foi realizada pela técnica de PCR, utilizando o par de primers MY09/11, os quais amplificam uma sequência correspondente a 450 pb da região L1 do vírus HPV (Manos *et al.*, 1989). A análise do polimorfismo da p53 foi efetuada com o uso de PCR utilizando os *primers* 72A e 72S, que flanqueiam uma região de aproximadamente 200 pb, localizada no códon 72 (Anschau *et al.*, 2005). Ambas as reações foram realizadas em um volume final de 12,0 µL, contendo 6,0 µL da enzima GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega), *primers* na concentração de 10pmol/µL, 1µL de DNA e H₂O Mili-Q QSP.

As condições da PCR para MY09/11 foram constituídas por 40 ciclos subsequentes de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 45°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 30 segundos para extensão. Os amplicons obtidos pela PCR MY09/11 foram visualizados em gel de agarose 1,0% corado com gel red (Uniscience) e visualizados em luz ultravioleta (UV).

Para a PCR 72S/72A (p53), as condições de amplificação foram compostas por uma desnaturação inicial 94°C durante três minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C durante três minutos.

No fragmento resultante da PCR para genotipagem da p53, foi então realizada a análise dos fragmentos de restrição (RFLP), com a enzima de restrição *Bst* UI. O produto de digestão foi analisado com eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE, corado com gel red (Uniscience) e observados em transiluminador UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A RFLP mostrou que as linhagens celulares cultivadas HeLa, LNCAP e SH-Sy5y apresentaram os genótipos de p53 conforme descrito na Tabela 1. Os genótipos foram interpretados de acordo com as bandas verificadas: somente a banda de 199 pb indica genótipo Pro/Pro; bandas de 199, 113 e 86 pb, genótipo Pro/Arg; bandas de 113 e 86 pb, genótipo Arg/Arg (Anschau *et al.*, 2005).

Até o presente momento, já foram relatadas cerca de 6.320 investigações sobre a relação do polimorfismo do códon 72 da p53 com a infecção por HPV. No entanto, os resultados observados são controversos, não existindo um consenso unânime sobre qual genótipo de p53 é o mais susceptível à degradação pelo HPV. Storey *et al.* (1998) sugeriram que o alelo Arg/Arg tem maior susceptibilidade ao câncer mediado por HPV, enquanto outros não observaram nenhuma associação semelhante (Gustafsson *et al.*, 2001). Ye *et al.* (2009) sugerem que a falta de avaliação de interações complexas como gene-ambiente, bem como gene-gene possa ter contribuído para a inconsistência nestes resultados.

Tabela 1. Genótipos de p53 observados nas linhagens celulares

Cultura	Genótipos		
	Pro/Pro	Pro/Arg	Arg/Arg
HeLa	Não	Sim	Não
LNCAP	Não	Não	Sim
SH-Sy5y	Não	Não	Sim

A PCR para o HPV mostrou positividade apenas para a linhagem HeLa, sugerindo que os procedimentos de Biossegurança adotados durante a manipulação são eficazes, evitando que houvesse contaminação das demais linhagens celulares.

O problema de contaminação cruzada por HeLa é discutido em muitos estudos, indicando que muitas vezes a ocorrência de erro na identificação de determinado tipo de linhagem celular é decorrente da sua total substituição pela linhagem contaminante (Nelson-Rees *et al.*, 1981). É relatado que entre 17-36% das culturas celulares em uso foram contaminadas tanto por células de outras espécies (contaminação interespecies) como por células que não apresentavam relação entre espécies (contaminação intraespecies). Tal fato leva à ressalva que muitos laboratórios de pesquisa fazem doações de linhagens celulares a outros grupos, podendo disseminar uma determinada linhagem quando, na verdade, pode ser outra.

Apesar da aparente gravidade do problema, o controle de qualidade regular da contaminação cruzada em laboratórios de pesquisa ainda não é uma prática comum. Sendo assim, é necessário um maior cuidado no cultivo e utilização de linhagens celulares, através da introdução de abordagens de biossegurança.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o procedimento de manipulação de linhagens celulares tem influência no risco de contaminação dessas células. Nesse trabalho, foi observado que não houve contaminação pelo HPV nas linhagens LNCAP e SH-Sy5y. Quanto à susceptibilidade de degradação da p53 HPV-mediada, não foi possível inferir o resultado devido à grande eficácia da prática de biossegurança nas rotinas do núcleo de cultivo celular.

5. REFERÊNCIAS

ANSCHAU, F.; SCHMITT, V.M.; GONÇALVES, M.A.G.; GARICOCHEA, B. Association of codon 72 polymorphism with premalignant and malignant cervical lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 27(10): 607-12, 2005.

ARRUDA, J. T.; BORDIN, B. M.; MIRANDA, L. C. B.; MAIA, D. L. M.; MOURA K.K.V. Proteína P53 e o câncer: Controvérsias e esperanças. **Estudos**. v. 35, p. 123-141, 2008.

ATCC SDO Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. **Nature Reviews Cancer**. 10: 441- 448, 2010.

GUSTAFSSON A, C.; GUO, Z.; HU, X.; AHMADIAN, A.; BRODIN, B.; NILSSON, A.; PONTÉN, J.; PONTÉN, F.; LUNDEBERG, J. HPV-related Cancer Susceptibility and p53 Codon 72 Polymorphism. **Acta Derm Venereol**. 81: 125-129, 2001.

MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.I.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**. 7:209–214, 1989.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZALÉZ, A.B.; GISSMAN, L. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** 24(S3):S3/1-S3/10, 2006.

NELSON-REES, W. A.; DANIELS, D. W.; FLANDERMEYER, R. R. Cross-Contamination of Cells in Culture. **Science, New Series**. V. 212, No. 4493, pp. 446-452, 1981.

STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I.; MATLASHEWSKI, G. & BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus- associated cancer. **Nature Reviews Cancer**. v. 393. p. 229-234, 1998.

TADA, M.; FURUUCHI, K.; KANEDA, M.; MATSUMOTO, J.; TAKAHASHI, M.; HIRAI, A.; MITSUMOTO, Y.; IGGO, R.; MORIUCHI, T. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection on the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. **Carcinogenesis**. 22:515-7, 2001.

YE, F.; ZHANG, J.; CHENG, Q.; SHEN, J.; CHEN, H. P53 Codon 72 polymorphism is associated with occurrence of cervical carcinoma in the Chinese population. **Cancer Letters**. v. 287, p. 117-121, 2010.