CLONAGEM DE POLIMORFISMOS DO ONCOGENE E6 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 31

D. L. SANTOS¹, R. C. P. LIMA¹, R. C. O. SILVA¹, E. TIBÚRCIO Jr¹, M. N. CORDEIRO¹,
T. S. P. C. NEVES¹, B. S. CHAGAS¹, A. C. FREITAS¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental

E-mail para contato: daffanysantos@outlook.com, acf_ufpe@yahoo.com.br

RESUMO – *Infecções pelos Papilomavírus humano (HPV) de alto risco, estão associadas a etiologia do câncer cervical, dentre eles, o HPV-31 apresenta-se bastante frequente na região Nordeste do Brasil. A capacidade de transformação e imortalização celular do vírus HPV, depende dos oncogenes E6 e E7. Variantes nesses genes, podem levar a funções biológicas alteradas. O objetivo desse trabalho é verificar a função de polimorfismos do oncogene E7 do HPV-31. As variantes escolhidas foram submetidas a uma digestão enzimática, subclonadas no vetor pCI neo, sequenciadas e transfectadas em células HEK-293. Todos os polimorfismos foram confirmados através do sequenciamento.*

Palavras chave: HPV -31, Câncer cervical, variantes

ABSTRACT- *High-risk human papillomavirus (HPV) infections are associated with the etiology of cervical cancer, among them, HPV-31 is very common in the northeastern region of Brazil. The ability of cell transformation and immortalization of the HPV virus depends on the E6 and E7 oncogenes. Variants in these genes can lead to altered biological functions. The objective of this study was to verify the role of HPV-31 E7 oncogene polymorphisms. The selected variants were subjected to enzymatic digestion, subcloned into the neo pCI vector, sequenced and transfected into HEK-293 cells. All polymorphisms were confirmed by sequencing.*

Key words: HPV-31, Cervical cancer, variants

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA pertencente à família *Papillomaviridae*, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases (pb). O seu genoma é composto pela região LCR (*Long Control Region* – Região Longa de Controle), onde se encontram as sequências regulatórias da transcrição viral e origem de replicação dos genes *Early* (E1, E2, E5, E6 e E7) e *Late* (L1 e L2) (Favre & Orth, 1997). Os genes E (*early*), são expressos nos estágios iniciais da infecção e estão relacionados a funções regulatórias, os genes L (*late*), são expressos posteriormente, pois estão relacionados a composição do capsídeo viral. Existem mais de 200 tipos de HPV identificados (Bernard *et al.*, 2010), onde 40 tipos acometem o trato genital, e 15 deles são considerados de alto risco oncogênico, dentre eles, temos o HPV 31 (Zur HAUSEN,

2002). Sendo os HPVs 16, 18 e 31 os mais frequentes, respectivamente (Bosch & Sanjose, 2003; Trottier & Franco, 2006).

O câncer cervical é o quarto tipo mais prevalente de câncer, com 530.000 casos dos quais cerca de 275 mil pacientes morrem a cada ano (Jemal *et al.*, 2011). Através de estudos epidemiológicos e funcionais, foi estabelecida a relação entre os tipos de HPV e câncer cervical (Zur Hausen, 1996; Baseman & Koutsky, 2005). As oncoproteínas E6 e E7 são responsáveis pela atividade transformante dos HPVs de alto risco. As proteínas p53 e pRB são alvo desses oncogenes. Este trabalho teve como objetivo, verificar o efeito das variantes no oncogene E6 do HPV-31 presentes na região nordeste, inferindo a importância clínica com relação à oncogenicidade do câncer de colo uterino em mulheres no Brasil e em particular na região Nordeste do Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As variantes de E6 do HPV-31 de maior relevância epidemiológica foram escolhidas a partir daquelas identificadas pelo nosso grupo de pesquisa nos trabalhos já publicados (Chagas *et al* 2011, 2013). Os polimorfismos estudados para E6 HPV-31 já foram identificados pelo nosso grupo de pesquisa (Figura 1).

Figura 1. Esquema mostrando as posições dos polimorfismos, mudanças de aminoácidos e identificação da região de interação encontradas no oncogene E6 do HPV-31.

Tabela 1. *Primers* usados na amplificação do oncogene E6 e variantes do HPV 31.

<i>Primers</i>	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Amplicon	Temperatura de anelamento
E6 HPV31	F: *CTCGAGATGTTCAAAAATCCTGCA	473	58°C
	R: **GCGCCGCATTCTAGATTACACTGGGTTTCA		

*Sítio de restrição para Xho I em verde.

** Sítio de restrição para Xba I em vermelho

As amostras foram amplificadas por PCR com primers específicos (Tabela 1) e clonadas em vetor pGEM-T *easy* (Promega) e sub-clonadas em vetor pCI neo (Promega) para expressão em células de mamíferos) Todos os clones recombinantes obtidos foram submetidos a uma reação de digestão enzimática com as enzimas Xho I e Xba I para liberação do inserto

As amostras clonadas foram sequenciadas através da Plataforma Tecnológica de Sequenciamento do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica – LABCEN/CCB/UFPE. Foram alinhadas com a sequência de referência do HPV-31 (NC_001526) utilizando o *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994). As análises de variabilidade genética foram realizadas a partir do programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Após a confirmação da subclonagem no vetor de expressão, o DNA dos vetores

recombinantes contendo E6 HPV-31 foram isolados por maxi-preparação para transfecção de células eucarióticas HEK-293.

Para investigarmos os efeitos dos polimorfismos presentes em E6 do HPV-31 na via NF- κ B, células HEK-293 foram transfectadas com o vetor de expressão contendo o gene E6 polimórfico, obtido a partir de uma amostra clínica os polimorfismos, circulantes na população do estado de Pernambuco. Para avaliarmos os efeitos obtidos, nossa construção foi comparada com a sequência protótipo (E6 do HPV-31 sem nenhum polimorfismo) e com o vetor vazio que foi usado como controle positivo da ativação da via. Após vinte e quatro horas da transfecção as células foram incubadas com o TNF α para indução da via por seis horas e depois lisadas, os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *firefly* e *renilla* as quais determinaram o fold da via NF- κ B

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os clones no vetor pCI dos polimorfismos 248 (alteração sinônimas), 297 (alteração não sinônima), 320 (alteração sinônima), 475 (alteração não sinônima) e 520 (alteração não sinônima), o protótipo (E6 sem alterações) e o Full (contendo todos os polimorfismos), foram confirmados através de um gel da digestão, conforme aponta a Figura 2.

Figura 2. Figura de Gel de agarose da digestão do inserto (Oncogene E6: protótipo, full, variantes 178, 190, 368, 413 e 537), do vetor pCI, com as indicações de cada variante.

No presente estudo, os polimorfismos, protótipo e o Full (contendo todos os polimorfismos), foram confirmados através da metodologia apropriada e usada na literatura devidamente aplicada. Algumas destas alterações já haviam sido estudadas e descritas por Calleja-Macias et al. (2005), estas alterações já identificadas pelo nosso grupo, neste trabalho foram subclonadas e sequenciadas. Após a confirmação dos clones, foram submetidas a uma avaliação funcional.

Grupo de células HEK-293 foram co-transfectadas com o E6 polimórfico do HPV-31, ou com o E6 protótipo do HPV-31, ou com o vetor vazio, e com os plasmídeos (κ B)3-Luc/pRenilla. Após vinte e quatro horas da transfecção as células foram incubadas com o TNF α para indução da via por seis horas e depois lisadas, os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *firefly* e *renilla* as quais determinaram o fold da via NF- κ B.

Foi encontrada diferença entre E6 polimórfico e o controle (vetor vazio) e não significativo entre o polimórfico e o protótipo, e entre o protótipo e o controle (Figura 3).

Figura 3. Efeito do oncogene E6 na atividade da via NK-KB.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo corrobora com dados já existentes na literatura acerca dos polimorfismos em questão. Além de contribuir para expansão do conhecimento acerca da relevância de alterações nucleotídicas no oncogene E6, tendo em vista seu papel imprescindível na immortalização celular. Pois as proteínas supressoras de tumores presentes na célula como a pRb e a p53 são alvo da ação transformante desses oncogenes.

5. REFERÊNCIAS

- CHAGAS, B. S. et al. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. **Gynecologic Oncology**, v. 123, n. 2, p. 284–288, 2011.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 11;22(22):4673-80.
- BERNARD HU, CALLEJA-MACIAS IE and Dunn ST (2006) Genome Variant of Human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications, **Int. J cancer**.
- BOSCH FX AND DE SANJOSE. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr** 31:3-13
- ZUR HAUSEN H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1288:F55-F78.

6. AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).