

Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio

Primeira submissão em 10/03/10
Última submissão em 19/03/10
Aceito para publicação em 20/03/10
Publicado em 20/04/10

Comparison between two methods for human papillomavirus DNA detection in lip squamous cell carcinoma

Adriana Demathe¹; Daniel Galera Bernabé²; José Fernando Garcia³; Caris Maroni Nunes³; Glauco Issamu Miyahara³

unitermos	resumo
Câncer oral	<p>Introdução: Recentemente o papilomavírus humano (HPV) tem sido associado à carcinogênese oral. A metodologia empregada na detecção do vírus é uma das maiores causas observadas da grande variabilidade nas taxas de detecção do HPV. Objetivo: Este estudo comparou a sensibilidade de detecção do DNA do HPV em casos de carcinoma epidermoide de lábio utilizando a amplificação do DNA viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou nPCR. Material e método: Foram utilizadas 33 amostras provenientes de casos de carcinoma epidermoide de lábio. Para as extrações do DNA utilizou-se o sistema QIAamp DNA Mini Kit. Como controle interno utilizou-se o gene da β-globina. Das 33 amostras iniciais, 30 foram positivas para o gene β-globina, sendo utilizadas para detectar o DNA viral. Comparou-se a amplificação do DNA viral pelos métodos da PCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11 e nPCR, empregando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores MY09/MY11 e, na segunda etapa, o par GP5+/GP6+. O controle positivo para a presença do DNA do HPV utilizado foi a linhagem de células HeLa e, como controle negativo, a mistura de amplificação sem DNA. A análise dos produtos de PCR e nPCR para HPV foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Resultados: Utilizando-se o método da PCR, a amplificação do DNA do HPV foi constatada em dois casos. Com a nPCR foi verificada presença de DNA viral em 13 das 30 amostras. Conclusão: Com a utilização da nPCR, a detecção do HPV nos casos estudados aumentou mais de seis vezes.</p>
Papilomavírus humano	
PCR	
nPCR	
HPV	

abstract key words

Introduction: Human papillomavirus (HPV) has been currently associated with oral carcinogenesis. The methodology applied in virus detection is one of the main reasons for the great variability observed in HPV detection. **Objectives:** This study compared HPV DNA detection efficiency in lip squamous cell carcinoma samples (SCC) using viral DNA amplification by PCR or nPCR. **Methods:** Thirty three samples of lip squamous cell carcinoma were selected. DNA extractions were performed with QIAamp DNA minikit. The internal control was β -globin gene. Thirty out of 33 initial samples were positive for β -globin gene, which were employed to detect viral DNA. The amplification of viral DNA was compared by PCR method through MY09/MY11 oligonucleotides and nPCR through MY09/MY11 oligonucleotides in the first stage and GP5+/GP6+ in the second stage. HeLa cells were used as positive control for HPV DNA presence and the amplification mixture without DNA as negative control. The analysis of PCR and nPCR products for HPV DNA was performed through gel electrophoresis in polyacrylamide at 8%. **Results:** HPV DNA amplification was verified in two cases by the use of PCR method. HPV DNA presence was verified in 13 out of 30 samples by the use of nPCR. **Conclusion:** HPV DNA detection of lip SCC increased sixfold in the studied cases with the employment of nPCR.

Oral cancer
Human papillomavirus
PCR
nPCR
HPV

1. Mestra em Estomatologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP); cirurgião-dentista.
2. Doutor em Estomatologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP; cirurgião-dentista.
3. Doutor; professor adjunto do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da UNESP.
Suporte Financeiro: Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) (processo nº 00149/07).

Introdução

Nos últimos 15 anos, o papilomavírus humano (HPV) tem sido considerado a principal causa do câncer de colo de útero. Analogamente, sua etiopatogenia também tem sido relacionada com carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço⁽¹⁴⁾.

Para o estudo do HPV, grande variedade de técnicas de biologia molecular tem sido empregada, como captura híbrida⁽¹⁰⁾, ensaios de *Southern*^(9, 13), *Northern* e *dot blot*⁽⁵⁾, hibridização *in situ*⁽⁹⁾, além da reação em cadeia da polimerase (PCR)^(17, 18, 20).

Essas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade amplamente variáveis⁽²⁰⁾, sendo atualmente a PCR a mais empregada nas diversas áreas de diagnóstico molecular devido a sua grande capacidade de detectar pequenos fragmentos de DNA⁽³⁾.

A infecção pelo HPV na boca apresenta-se com baixo número de cópias de DNA viral⁽¹²⁾, necessitando-se de sistemas de detecção altamente sensíveis, de forma que se obtenham informações mais seguras sobre a presença do vírus em amostras de carcinoma epidermoide bucal. Para aumentar a especificidade e a eficiência da amplificação do DNA alvo foi desenvolvida a *nested* PCR (nPCR), uma das variações da PCR que consiste na realização da PCR em duas etapas. Neste método o produto da amplificação da primeira PCR é utilizado na segunda etapa. No final das duas etapas obtém-se um DNA em concentrações altíssimas e os oligonucleotídeos utilizados na segunda etapa terão menor chance de anelamento com sequências inespecíficas, devido à redução do tamanho do molde⁽¹¹⁾.

No presente trabalho comparamos a sensibilidade de dois métodos de detecção do DNA do HPV utilizando PCR ou nPCR por meio da análise de 30 amostras de tecido parafinado de casos de carcinoma epidermoide de lábio. Os métodos incluíram a utilização de oligonucleotídeos desenhados a partir da região longa (LCR) do HPV.

Material e método

Utilizaram-se amostras de 33 peças oriundas de blocos parafinados obtidos de pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma epidermoide de lábio, diagnosticados e tratados no período entre 1991 e 2007 no Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Foram coletados oito cortes histológicos de 8 micrômetros das peças parafinizadas, procedendo-se a descontaminação do micrótomo, troca de lâminas entre cada exemplar e acondicionamento em tubos de polipropileno de 1,5 ml esterilizados, mantidos em temperatura ambiente até o momento da extração do DNA.

Purificação do DNA

Para a realização da extração do DNA foram seguidos os três passos descritos por Coombs⁽⁴⁾: desparafinização, digestão e purificação.

A desparafinização foi realizada pela dissolução da parafina em xileno e etanol, revertendo a embebição e desidratação dos tecidos processados. Nos tubos foram adicionados 1200 µl de xilol com posterior agitação por 15 segundos em vórtex. Em seguida os tubos foram centrifugados a 14.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e sobre o sedimento foram adicionados 1.200 µl de etanol. Os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos e centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Este ciclo (xilol-etanol) foi repetido novamente e, ao final do processo, as tampas foram abertas e os tubos colocados em um bloco térmico a 37°C por 15 minutos para evaporação do etanol remanescente.

A digestão dos tecidos foi feita adicionando-se ao tubo 20 µl de solução contendo proteinase K (20 mg/ml) e mantendo-se o material em banho-maria por 3 horas.

Para o isolamento dos ácidos nucleicos foi utilizado o sistema de extração de DNA QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen Ltd, Crawley, UK) segundo as instruções do fabricante. Após esta etapa, a quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas pela espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

PCR para gene da β-globina humana

Para a PCR do gene controle da β-globina (268 pares de base [pb]) utilizamos os oligonucleotídeos GH20 (5'-GAA-GAGCCAAGGACAGGTAC-3) e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3) descritos por Bell *et al.*⁽¹⁾.

A reação foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, EUA) e continha 20 µl de mistura com os seguintes componentes: 10,9 µl de água ultrapura; 2,5 µl de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl) (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 4 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTPs

(desoxirribonucleosida 5'-triofosfatos – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA); 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (GH20 e PCO4 – Invitrogen Life Technologies®, Brasil) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil).

Após a mistura dos componentes, em capela de fluxo-laminar (Heto-Holter HV PCR, Dinamarca), foram adicionados 5 µl do DNA de cada amostra, totalizando um volume final de 25 µl. Como controle positivo para o gene da β-globina utilizamos uma amostra de DNA de sangue humano e, como controle negativo, amostra contendo a mistura de reagentes e água ultrapura sem o DNA.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 8 minutos.

Para verificação da presença do DNA humano foi feita a análise por meio da eletroforese em gel de agarose a 2%, corada com brometo de etídio, em tampão TBE 1X (Tris, ácido bórico, ácido etilenodiaminotetracético [EDTA]) e fonte eletroforética (Amersham Pharmacia Biotech modelo EP3501, Suécia) durante 1 hora a 100 volts. A visualização foi feita sob luz ultravioleta e a documentação, com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Após a confirmação da presença e da integridade do DNA genômico pela PCR do gene da β-globina, as amostras foram submetidas à pesquisa do gene do HPV por dois métodos: PCR e nPCR com oligonucleotídeos iniciadores para o DNA do HPV⁽¹⁹⁾.

PCR para amplificação do HPV

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta técnica foram MY11 (5'-GCMCAGGGWCTATAAYAATGG-3') e MY09 (5'-CTCCMARRGGA WACTGATC-3'), produzidos pela Invitrogen Life Technologies®, Brasil, para amplificar fragmentos de 450 pares de bases da região tardia L1 do genoma viral.

Os componentes da mistura de amplificação para esta PCR foram: 10,9 µl de água ultrapura; 2,5 µl de tampão de PCR 10X; 2 µl de MgCl₂ 50 mM; 1,5 µl de dNTPs; 0,2 µl de Taq polimerase e 1,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador. Em fluxo laminar, foram adicionados 5 µl de DNA genômico de cada amostra. Como controle positivo para infecção por HPV, empregou-se uma amostra de linhagem de células HeLa, DNA de uma linhagem de

células de carcinoma cervical uterino com até quatro cópias de HPV-18 por célula. O controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultrapura sem a presença de DNA.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, durante 3 horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada por coloração com solução de nitrato de prata e a documentação fotográfica, com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

nPCR para amplificação do HPV

Na primeira etapa da nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos MY09 e MY11, com os componentes da mistura e condições dos ciclos de temperatura descritos anteriormente. Após a amplificação foram separados 2 µl do produto obtido nesta primeira PCR para utilização na segunda etapa da nPCR.

Na segunda etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACAC-3') e GP6+ (5'-GAAAAATAAATTGTAAATCATATTC-3'), produzidos pela Invitrogen Life Technologies®, Brasil, que geram fragmentos de 150 pares de bases^(2, 6). A mistura de amplificação, os controles utilizados e as condições de temperatura foram semelhantes aos da primeira etapa, com diferenças na quantidade de água ultrapura (13,9 µl) e na temperatura de anelamento (43°C).

Os produtos da nPCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% sob as mesmas condições da técnica de PCR, sendo que, após evidenciação, foi realizada a documentação fotográfica.

Resultados

Das 33 analisadas, as amostras 7, 25 e 32 não amplificaram o gene controle da β-globina humana. Assim, a análise da presença do DNA do HPV foi efetuada em 30 amostras, que foram submetidas às técnicas de PCR e nPCR.

A análise das imagens da PCR evidenciou o DNA do HPV nas amostras 10 e 19 (**Figura 1**).

A análise das amostras por meio da nPCR permitiu a detecção do DNA do HPV nas amostras 1, 2, 5, 6, 10, 12, 16, 24, 28, 29, 30, 31 e 33, correspondendo a 43,33% (13 de 30 amostras), como se pode-se observar na **Figura 2**.

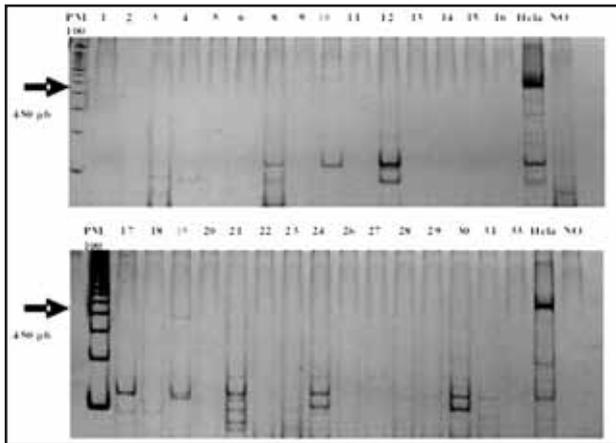


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (450 pb) por PCR nas 30 amostras de carcinoma epidermoide de lábio. PM 100 = padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen); linhagem de células HeLa = controle positivo para DNA do HPV; NO = controle negativo, sem DNA.

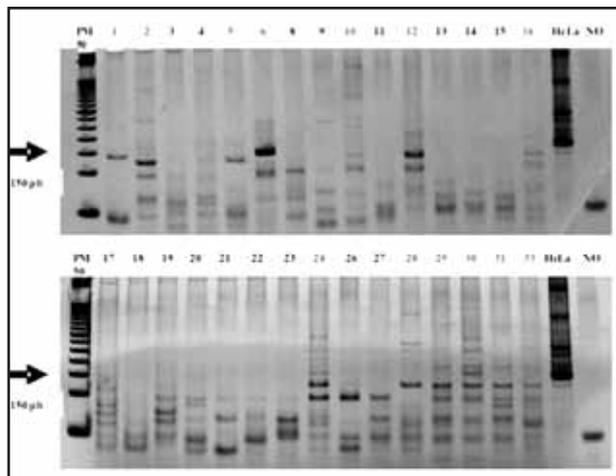


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por PCR nas 30 amostras de carcinoma epidermoide de lábio. PM 50 = peso molecular de 50 pb (50 pb DNA Ladder, Invitrogen); linhagem de células HeLa = controle positivo para DNA do HPV; NO = controle negativo, sem DNA.

Discussão

Os trabalhos encontrados na literatura apontam para taxas de detecção de HPV variáveis. Essas distinções na detecção do DNA do HPV sugerem uma diferença potencial na habilidade para amplificar fragmentos de diferentes tamanhos e tipos específicos de HPV de acordo com os métodos de detecção de DNA utilizados e também podem ser resultado dos tipos de material estudados (esfregaços, material congelado, material parafinado), da localização

anatômica, de questões populacionais e desenho dos oligonucleotídeos.

Evander *et al.*⁽⁸⁾ compararam a PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos MY09/MY11 e GP5/GP6 e a nPCR com MY/GP. Com a utilização dos oligonucleotídeos MY09/MY11 na PCR, o DNA do HPV foi detectado em 26,3% dos casos de citologia exfoliativa com alterações patológicas. Pelo uso da nPCR esta eficiência aumentou para 84,2% nestes espécimes.

Husnjak *et al.*⁽¹¹⁾ também utilizaram amostras de citologia cervical e compararam os métodos da PCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11 e *nested* com MY09/MY11 seguidos por GP5/GP6 e encontraram um aumento de 38,8% na taxa de positividade para o DNA do HPV quando em comparação com PCR e n PCR, valores inferiores aos dos experimentos realizados por Evander *et al.*⁽⁸⁾.

Por outro lado, Elamin *et al.*⁽⁷⁾, avaliando a detecção de DNA do HPV em lesões pré-malignas e carcinoma epidermoide, detectaram 33,34% de DNA do HPV em lábio por meio da nPCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados na nPCR por Husnjak *et al.*⁽¹¹⁾, resultado semelhante ao presente estudo.

Os oligonucleotídeos utilizados em nosso experimento foram inicialmente utilizados por Qu *et al.*⁽¹⁵⁾, que avaliaram as taxas de detecção do DNA do HPV em carcinoma cervical utilizando a PCR e comparando os oligonucleotídeos MY09/MY11 com GP5+/GP6+. Os resultados mostraram detecção de 45,2% com o primeiro par de oligonucleotídeos e 42,8% dos exemplares com o segundo par. Não houve diferença estatística entre os dois oligonucleotídeos utilizados nas PCRs, somente na avaliação dos tipos de HPV detectados por cada par de oligonucleotídeo.

Já Bouda *et al.*⁽²⁾ não encontraram positividade para o DNA do HPV nos três casos de carcinoma epidermoide de lábio estudados utilizando a nPCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11 seguidos pelo par GP5+/GP6+.

Estudo recente de Remmerbach *et al.*⁽¹⁶⁾, com material genético obtido de esfregaços da mucosa oral de pacientes com lesões suspeitas de carcinoma, mostrou que o DNA do HPV foi detectado em 2,8% dos exemplares com a técnica da PCR utilizando os oligonucleotídeos MY09/MY11 e 35,8% com os oligonucleotídeos GP5+/GP6+. Entre os estudos citados, porém, nenhum foi realizado em material obtido de blocos parafinados comparando-se os dois métodos: PCR com MY09/MY11 e nPCR com MY/GP+.

No presente estudo, a PCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11 se mostrou seis vezes menos sensível que a nPCR (MY/GP+) na detecção dos casos de carcinoma epidermoide de lábio estudados, confirmando que a prevalência do DNA do HPV em uma determinada espécie de material clínico é subestimada se somente um método de detecção for utilizado.

Assim, a escolha dos oligonucleotídeos adequados para usos clínicos e epidemiológicos deveria levar em conta a fonte do material clínico, o tamanho do produto da PCR, a amplitude de tipos de DNA do HPV a ser amplificada, a habilidade dos oligonucleotídeos em amplificar múltiplos tipos de HPV e a disponibilidade de sistemas sequenciadores ou sondas específicas para a identificação dos diferentes genótipos de HPV.

Conclusão

Com a utilização da nPCR, a detecção do HPV nos casos estudados aumentou mais de seis vezes, demonstrando ser um método mais adequado quando em comparação com a PCR de um só passo para detecção do papilomavírus humano nos casos de carcinoma epidermoide de lábio estudados com a metodologia empregada.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) pelo apoio financeiro (processo nº 00149/07) e à equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNESP pelo apoio logístico.

Referências

- BELL, D. A. *et al.* Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 85, n. 14, p. 1159-64, 1993.
- BOUDA, M. *et al.* "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol*, v. 13, n. 6, p. 644-53, 2000.
- CAMPISI, G.; GIOVANELLI, L.; AMMATUNA, P. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 34, n. 1, p. 62-4, 2005.
- COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res*, v. 27, n. 16, p. e12(i-iii), 1999.
- CORTEZZI, S. S. *et al.* Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cygenet*, v. 150, n. 1, p. 44-9, 2004.
- DE RODA HUSMAN, A. M. *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 1057-62, 1995.
- ELAMIN, F. *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncol*, v. 34, n. 3, p. 191-7, 1998.
- EVANDER *et al.* Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 987-92, 1992.
- GILLISON, M. L. *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, v. 92, n. 9, p. 709-20, 2000.
- GIOVANELLI, L. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMV-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 8, p. 861-4, 2004.
- HUSNJAK, K. *et al.* Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*, v. 88, n. 2, p. 125-34, 2000.
- KAY, P.; MEEHAN, K.; WILLIANS, A. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods*, v. 105, n. 1, p. 159-70, 2002.
- NAGPAL, J. K.; PATNAIK, S.; DAS, B. R. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with p53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern Indian. *Int J Cancer*, v. 97, n. 5, p.649-53, 2002.
- NEVILLE, B. W. *et al.* *Patologia oral & Maxilofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- QU, W. *et al.* PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP51/GP61 Primer Systems. *J Clin Microbiol*, v. 35, n. 6, p. 1304-10, 1997.
- REMMERBACH, T. W. *et al.* PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol*, v. 30, p. 302-8, 2004.

17. RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res*, v. 20, n. 1, p. 21-4, 2006.
18. TACHEZY, R. *et al.* HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis*, v. 11, n. 3, p. 181-5, 2005.
19. UOBE, K. *et al.* Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncology*, v. 37, p. 146-52, 2001.
20. ZHANG, Z. Y. *et al.* Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 33, n. 1, p. 71-4, 2004.

Endereço para correspondência

Glauco Issamu Miyahara
Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP
Rua José Bonifácio, 1.193
CEP 16015-050 – Araçatuba-SP