

Análisis de la prevalencia de mutaciones puntuales en el codón 12 del oncogen K-ras en muestras no cancerosas de citología exfoliativa cervical positivas para VPH tipo 16 o 18.

Carlos Daniel Golijow, Silvana Andrea Mourón, María Atilia Gómez y Fernando Noel Dulout

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. E-mail cgolijow@fcv.medvet.unlp.edu.ar

Palabras clave: K-ras, VPH, cervix.

Resumen. Se estudiaron 91 muestras no cancerosas de citología exfoliativa cérvico-vaginal positivas para VPH tipo 16 ó 18 y 27 muestras negativas como grupo control. Se analizó la prevalencia de las mutaciones en el codón 12 del gen K-ras utilizando la técnica de PCR con enriquecimiento alélico. Se encontró que el 17,58% de las muestras estudiadas presentaban mutaciones en ese codón. Se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de mutación en la muestras positivas para VPH y el grupo control ($p < 0.01$). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de mutaciones en el gen K-ras entre ambos tipos de VPH. La presencia de mutaciones en el gen K-ras en muestras citológicas no cancerosas abre un nuevo interrogante sobre el papel de las mutaciones en proto-oncogenes y el desarrollo del cáncer cervical.

Prevalence of *K-ras* codon 12 point mutations in non cancerous cervical samples positives for VPH 16 or 18.

Invest Clin 1999; 40(4): 257-266

Key words: *K-ras*, HPV, cervix

Abstract. Ninety-one non cancerous samples from genital specimens positives for VPH 16 or 18 and 27 non-infected samples as controls were studied. Mutations at codon 12 in *K-ras* gene was analyzed using enriched alelic PCR technique. Among the samples studied 17,58% showed mutations in this codon. Significant differences were observed between the control group (negative DNA-HPV) and positives DNA-HPV samples ($p < 0.01$). No differences were found between both viral types in relation to the mutation frequency. The presence of mutations in the *K-ras* gene in non cancerous cytological samples point out new questions about the role of mutations in proto-oncogenes and the development of cervical cancer.

Recibido: 27-4-99. Aceptado: 30-12-99.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de cuello uterino es, a nivel mundial, la segunda enfermedad maligna entre las mujeres, tanto en incidencia como en mortalidad (1). Existe una fuerte evidencia experimental y epidemiológica que otorga al Papillomavirus Humano un papel preponderante en la etiología del cáncer cervical (2, 3, 4). Sin embargo, dada la alta prevalencia de la infección por VPH de alto riesgo (tipos virales 16 y 18) en la población general y la baja incidencia de carcinoma cervical se presume que la sola infección por VPH sería insuficiente para provocar la transformación neoplásica (5).

Estudios realizados sugieren que la mayoría de las infecciones por VPH serían transitorias, siendo el virus suprimido en cierto momen-

to por el sistema inmune del propio hospedador y llevando la carga viral a niveles no detectables (6, 7). Asumiendo esta hipótesis, la persistencia en el tiempo de la infección por VPH sería un prerequisite para el desarrollo de las neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN) de alto grado.

Se ha demostrado que para que se produzca la transformación maligna deben acumularse múltiples alteraciones genéticas. La activación de oncogenes, la pérdida o inactivación de segmentos cromosómicos y/o genes supresores de tumor, entre otras, aparecen frecuentemente asociadas a los tumores humanos (8). Varios proto-oncogenes celulares se encuentran estrechamente relacionados con la proliferación celular y las mutaciones que originan la expresión inapropiada de estos ge-

nes estarían involucradas en el proceso carcinogénico (9, 10).

Los genes de la familia *ras* codifican para proteínas de 21 kDa, conocidas como p21, que se ubican en la membrana celular, poseen actividad GTPasa y están relacionadas con la transducción de señales. El evento que transforma un gen *ras* normal en un oncogen es una mutación puntual, que determina la sustitución de un aminoácido en la proteína codificada. Solamente las mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61 de los genes *ras* resultan en la pérdida de la actividad GTPasa intrínseca de la proteína y parecen estar vinculadas con la progresión neoplásica (11). Han sido encontrados genes *ras* mutados en una amplia variedad de tumores humanos; mientras que las mutaciones en H-*ras* y N-*ras* son menos frecuentes, aquellas en el codón 12 del gen K-*ras* se encuentran con una alta prevalencia en muchos tumores sólidos (12, 13, 14, 15, 16). Numerosos estudios se han realizado con el fin de establecer el papel de la activación del proto-oncogen K-*ras* y la presencia del Papillomavirus humano en el carcinoma cervical (17, 18, 19). Sin embargo, pocos estudios han sido realizados en muestras no cancerosas (20).

En el presente trabajo se analizó la prevalencia y relación de mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras* en muestras de citología exfoliativa cervico-vaginal no cancerosas, positivas para ADN-VPH de tipos 16 y 18.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se analizaron 91 muestras no cancerosas de citología exfoliativa cervico-vaginal positivas para ADN-VPH tipo 16 o 18, correspondientes a 91 pacientes con sintomatología asociada a la infección viral y 27 muestras negativas para VPH como grupo control. De las 91 muestras positivas para VPH analizadas, el 75% fueron clasificadas como SIL de bajo grado y 25% como SIL de alto grado. La recolección del material cervico-vaginal se realizó mediante espátula de Ayre estéril sumergida luego en 5 ml de solución de PBS con 0.05% de Merthiolate. Se conservaron a 4°C.

Extracción de ADN

Las muestras de citología exfoliativa cervico-vaginal fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min para separar las células. Las células fueron luego resuspendidas y lavadas dos veces en 1 ml de PBS. Una alícuota de 200-300 µl fue centrifugada y resuspendida en 300 µl de buffer de digestión (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 mM EDTA; 1% Tritón X100 y 0,5% Tween 20) y 8 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó durante 3 h a 56°C, se hirvió durante 8-10 min para inactivar la enzima y se guardó a -20°C hasta su uso.

Detección de genoma viral por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación se realizó en 50 µl finales conteniendo

buffer de PCR (10mM tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 2 pmoles de cada uno de los cebadores externos generales MY09 y MY11 (21), seguidos de un amplificación anidada con los cebadores GP5 y GP6 (22), según fue descrito previamente (23). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio.

Identificación de tipos virales 16 y 18

La identificación del tipo viral se realizó por el método de amplificación anidada utilizando en la primera ronda los cebadores generales MY09 y MY11 bajo las mismas condiciones que en el punto anterior; la segunda ronda de amplificación se realizó con sondas específicas para cada tipo viral como único cebador. El producto de amplificación obtenido en la primera ronda fue diluido 1/100 y para la segunda ronda se utilizaron 5 μl en un volumen final de 25 μl de mezcla de reacción (10 mM tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 25 pmol de sonda específica de secuencia). Se realizaron reacciones por separado conteniendo las sondas previamente publicadas para los tipos 16 y 18 (21). Los amplificadores se analizaron en geles de agarosa 2.5%, teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados por luz UV320nm. Como controles positivos se utilizaron células Hela para el tipo 18 y Caski para el tipo 16. Como control interno de inhibidores de amplificación se utilizaron ceba-

dores específicos para el locus APP (Amyloid Precursor Protein) del genoma humano.

En todos los experimentos realizados se tomaron las precauciones necesarias para evitar la contaminación por arrastre.

Identificación de las mutaciones en el codón 12 del oncogén K-ras por PCR con enriquecimiento alélico

Las mutaciones en la primera y segunda base del codón 12 del gen K-ras fueron detectadas utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con enriquecimiento alélico, modificando la técnica descrita previamente (24). Esta técnica permite la amplificación selectiva del alelo K-ras mutado por medio de la creación artificial de un sitio de restricción único. Después de la eliminación de las copias del alelo normal por digestión del producto de PCR de la primer ronda, con la enzima de restricción *BstNI*, se procede a la amplificación específica del alelo mutado. Esto brinda un método altamente sensible para la detección de mutaciones determinadas en secuencias específicas de ADN cuando se encuentran en baja proporción respecto de las secuencias normales.

La primera ronda de reacción de PCR fue realizada en 50 μl finales, utilizando 5 μl de muestra, 2,5 mM MgCl₂, 100 μM dNTPs, 10 pmoles de los cebadores 5BKIM y 3KiE (24), 1,25 U de Taq Polimerasa y buffer de PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, y 50 mM KCl). Los ci-

culos de amplificación consistieron en 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C, 4 min y 15 ciclos de 94°C por 20 seg, 58°C por 20 seg y 72°C por 20 seg. Se utilizó un ciclo de 99°C por 30 min para la inactivación completa de la polimerasa. Una alícuota de 12 µl del amplicón fue digerida con 5 U de la enzima *BstNI* con 100 g/ml de BSA, en 17 µl finales a 60°C por 2 h.

La segunda ronda de amplificación fue realizada utilizando el volumen total de la digestión realizada (inactivada a 100°C por 10 min) en la misma mezcla de reacción pero conteniendo 1,25 mM MgCl₂ y 50 pmoles de los cebadores 5BKIM y 3AKIL (24). La amplificación se realizó por 25 ciclos de 94°C por 20 seg, 65°C por 20 seg y 72°C por 20 seg, seguido de un ciclo de inactivación a 99°C por 30 min. La digestión con *BstNI* del amplicón de la segunda ronda se realizó en las condiciones previamente descritas.

Como control positivo de la reacción se utilizó ADN de la línea celular K562, la que es homocigota normal. Como control negativo se incorporó un tubo conteniendo agua en lugar de ADN cada vez que se realizaron amplificaciones.

La detección del producto de digestión del amplificado se realizó por corrida electroforética en minigel de poliacrilamida 8%, a 170 volts por 45 min, tinción con Bromuro de Etidio y exposición a UV 320 nm.

Análisis estadístico de los resultados

Se compararon las frecuencias de mutación entre las muestras tipificadas como VPH-16 y -18 por medio de una tabla de contingencia aplicando el estadístico ².

RESULTADOS

Todos los ADN aislados de las muestras positivas para VPH fueron aptos para la tipificación viral. Por otra parte, la amplificación del codón específico de *ras* fue posible en las 91 muestras analizadas, así como en el grupo control y el control positivo utilizado. No se observó producto de amplificación en ninguno de los controles negativos utilizados en las reacciones de PCR. El tamaño del amplicón para el alelo mutado del gen K-*ras* fue de 91 pb y para el alelo no mutado 63 y 28 pb, producto de la digestión enzimática (Fig. 1). En todas las muestras, incluidas las mutadas, se evidenció la presencia del alelo normal dada la alta relación de magnitud existente entre células normales y mutadas.

Se detectaron mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras* en 8 muestras de las 53 tipificadas como VPH-16 (15%), mientras que en las muestras tipificadas como VPH-18 se detectaron 8 mutadas de 38 muestras analizadas (21%). El porcentaje de mutaciones en K-*ras* en las muestras analizadas, sin considerar el tipo viral existente, fue de 17,58%. Por otra parte, no se encontraron mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras* en las muestras nega-