

GENOTIPAGEM DO GENE p53 A PARTIR DE AMOSTRAS TUMORAIS FIXADAS EM FORMALINA: PADRONIZAÇÃO PARA ESTUDOS GENÔMICOS DE CÂNCER COLORRETAL

RIBEIRO, Samuel Gonçalves¹; JANNKE, Heitor Alberto²; DUARTE, Wladimir
Ribeiro²; THUROW, Helena Strelow¹; HARTWIG, Fernando¹; COLLARES, Tiago¹

SEIXAS, Fabiana Kommilig¹

¹Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Genômica Funcional,
Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), UFPel

²Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia – LAPACIT

1 INTRODUÇÃO

O câncer é originado se o equilíbrio entre a origem e a morte da célula é direcionado para uma proliferação incontrolada (Michor et al., 2004). Os tumores podem ser benignos se crescerem localizados sem invasão a tecidos adjacentes ou malignos se houve invasão de tecidos próximos e espalhamento de metástases. O câncer continua ser uma das principais causas de morte no mundo, apesar da grande quantidade de pesquisas científicas neste campo (Anand et al., 2008).

As mutações no gene supressor de tumor p53 são muito comuns e a sua distribuição pode ser informativa da natureza dos mecanismos mutagênicos, dando indícios da etiologia do câncer e da patogênese molecular (De Moura Gallo et al., 2005). A sua perda de função, considerada marca universal de tumores humanos (Whibley et al., 2009), leva a uma proliferação incontrolada e promove o desenvolvimento do câncer (Olivier et al., 2009)

O câncer de colorretal (CRC) é a terceira causa mais comum de câncer no mundo. No Brasil, o CRC é a quinta causa de morte no sexo masculino e a terceira no sexo feminino, tendo-se observado aumento de suas taxas de mortalidade nas últimas décadas (Gomes et al., 2005). A sobrevida global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% nos países em desenvolvimento. O bom prognóstico faz com que o CRC seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo (INCA, 2010).

Este trabalho visou padronizar uma metodologia de extração de DNA genômico de amostras de CRC fixadas em formalina para futuras ampliações e genotipagens de SNP no códon 72 do gene p53 (resultante na variação entre os aminoácidos Arginina e Prolina).

2 METODOLOGIA

Origem das amostras: As amostras referentes ao estudo serão providas do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia – LAPACIT. Situado no município de Pelotas/RS, o laboratório, de caráter privado que atende o município

e região, executa exames especializados em citopatologia e histopatologia, tendo como clientes os hospitais de Beneficência Portuguesa de Pelotas (HBPP), Hospital Universitário São Francisco de Paula (HSFP), Fundação de Apoio Universitário (FAU).

Obtenção do DNA genômico: Para padronização e otimização da extração de DNA genômico de tecidos fixados em formalina, dois kits diferentes foram utilizados: *DNeasy® Blood & Tissue Kit* e *QIAamp DNA FFPE Tissue* (QIAGEN®). Ambos os kits apresentam metodologia similar de extração após o passo de adição da enzima proteinase K. Assim, a principal diferença entre os kits se encontra na maneira pela qual as amostras contendo formalina são tratadas. O kit *QIAamp DNA FFPE Tissue* indica a lavagem de um macerado de 5-10uM de tecido formalizado com 1mL de etanol, misturando-se por vortex. A solução deve ser centrifugada em velocidade máxima (14000rpm) por 2min, procedendo-se à remoção do sobrenadante. Após evaporação do etanol residual em temperatura ambiente, deve-se ressuspender o pellet em 180uL de tampão ATL e adicionar 20uL de proteinase K. A solução deve ser incubada em 56° C por 1h, procedendo-se outra incubação em 90° C por 1h (esta para reverter ligações cruzadas de formalina).

O kit *DNeasy® Blood & Tissue Kit* apresenta uma etapa de pré-tratamento para tecidos fixados em formalina, consistindo de duas lavagens com PBS. Não mais do que 25mg de amostra devem ser utilizadas, visto que a quantidade dos reagentes que serão utilizados está adaptada para esta quantidade. Após a lavagem, o PBS deve ser descartado, seguindo-se para o passo de maceração, adição de 180uL de tampão ATL (tampão de lise de tecido) e adição de 20uL de proteinase K. Indica-se incubar a 56°C durante 1-3h (com vortexagem ocasional). Como as amostras estavam fixadas em formalina, procedeu-se a incubação em 90° C durante 1h (não indicado neste kit).

Após estas etapas de incubação, as metodologias de cada kit se assemelham, como na adição de RNase para obtenção de DNA genômico livre de RNA (passo opcional), seguida de adição de tampão AL (tampão de lise) e etanol. A solução é adicionada a uma coluna provida pelo kit, sendo centrifugada. A coluna passa por duas lavagens (tampões AW1 e AW2), cada uma consistindo de adição do tampão e centrifugação, sempre descartando a solução e posicionado a coluna em outro tubo coletor. Ao final, é realizada a eluição em tampão ATE. As amostras foram eluídas em 30uL para o kit *QIAamp DNA FFPE Tissue* e em duas vezes com 25uL por vez, totalizando 50uL de solução com DNA purificado para o kit *DNeasy® Blood & Tissue*.

Genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53: A genotipagem foi realizada através da técnica de PCR-RFLP. O fragmento contendo o polimorfismo do códon 72 foi amplificado utilizando *primers* que compreendem a região do exon 4 do gene através da técnica de PCR. As reações foram padronizadas nas seguintes condições: 94°C por 5min, 35 ciclos de 94°C, 57°C e 72°C (1min cada) e 72°C por 5min, sendo as amostras mantidas em 4°C após a reação. Esta porção genômica amplificada foi clivada com a enzima *BstUI* a 60°C durante 3h, a qual poderia gerar 3 fragmentos para a determinação dos genótipos: 113 e 81pb é relativo ao genótipo Arg/Arg, 199pb (sem clivagem) a Pro/Pro e 199, 113 e 81pb a Arg/Pro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizadas 21 extrações de DNA genômico, nas quais foram distribuídas em 10 amostras correspondentes àquelas classificadas com CRC e suas respectivas partes compreendidas nas mucosas não afetadas que serviam como controles. Em um caso, obteve-se 2 tumores em regiões diferentes na peça da biópsia. As bandas obtidas na extração podem ser visualizadas em eletroforese em gel de agarose conforme a Figura 1.

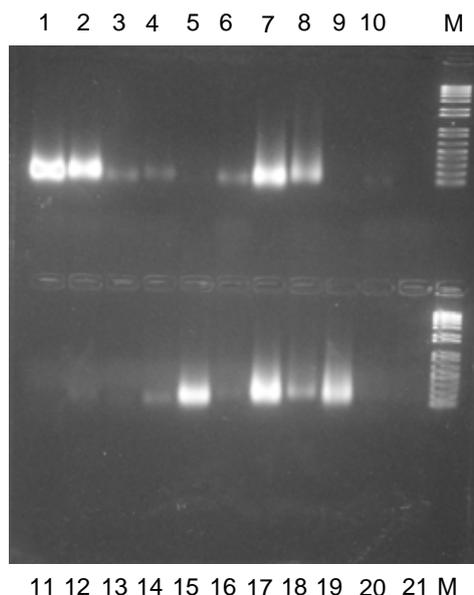


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 1%

Amostras: 1. 51524-10 T, 2. 51524-10 M, 3. 49513-10 T, 4. 49513-10 M, 5. 51575-10 T, 6. 51575-10 M, 7. 53630-10 T, 8. 53630-10 M, 9. 51241-10 T, 10. 51241-10 M, 11. 51070-10 T, 12. 51070-10 M, 13. 50201-10 T, 14. 50201-10 M, 15. 54118-10 T, 16. 54118-10 M, 17. 54498-10 T Me, 18. 54498-10 T Ma, 19. 54498-10 M, 20. 54205-10 TR, 21. 54205-10 M.

Após a eletroforese, deu-se continuidade aos passos de amplificação para o gene *p53* (Figura 2) e digestão para o polimorfismo do códon 72 (Figura 3) somente as amostras que apresentaram bandas visíveis no gel e quantificadas através da plataforma Qubit® (Invitrogen®): 51524-10 Tumor, 51524-10 Mucosa, 53630 Mucosa, 54118-10 Tumor, 51575-10 Tumor, 53630-10 Mucosa, 51070-10 Mucosa, 51524-10 Tumor, B (controle positivo).

Na amplificação dos fragmentos por PCR, todas as amostras geraram amplicons esperados à altura de 199 pb, correspondente ao tamanho do gene *p53* (Figura 2).

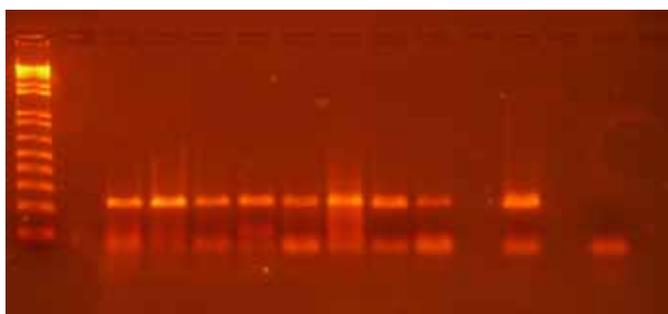


Figura 2 – PCR – Códon 72, Éxon 4 do gene *p53*

Após esta etapa, realizou-se a digestão destes produtos de PCR, nos quais, do volume total de 25ul de cada amostra, 12ul foram utilizados para o passo da genotipagem dos polimorfismos do códon 72. Observou-se que para todas as amostras, foi possível realizar a clivagem enzimática e consecutivamente genotipar os polimorfismos do códon 72 do gene (Figura 3).

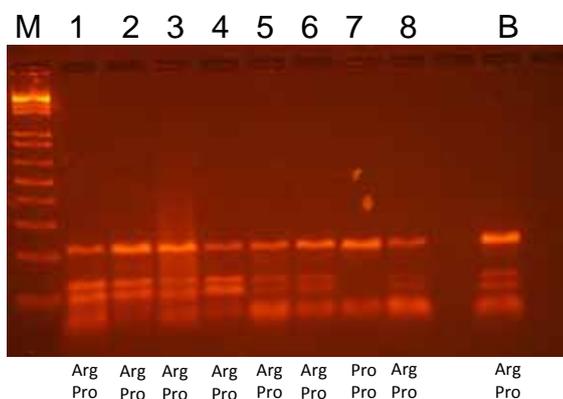


Figura 3 – Genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene *p53* com a utilização da enzima BstUI

4 CONCLUSÕES

O presente estudo atingiu a padronização e aperfeiçoamento da extração de amostras fixadas em formalina através de ambos os kits comerciais, bem como na amplificação deste material genético através da técnica de PCR e ainda realizar a genotipagem de polimorfismos do códon 72 do gene *p53*, considerado o guardião do genoma e importante na área oncológica-molecular. Além disso, este trabalho possibilitou dar continuidade aos experimentos previamente delineados de análise mutacional de amostras diagnosticadas com CRC e, ainda, sugere novas oportunidades para que outros estudos de diferentes tumores e de diferentes genes associados a eles sejam realizados.

5 REFERÊNCIAS

- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm.Res.**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- DE MOURA GALLO, C.V.; AZEVEDO E SILVA MENDONÇA, DE, M.E.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. **Mutat. Res.**, v. 589, p. 192-207, 2005.
- GOMES, D.C.; OLIVEIRA, J.F.P.; DUARTE, K.S.; SANTOS, M.O.; REBELO, M.S.; REIS, R.S. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2005. Disponível em <http://www.inca.gov.br>, acessado em 20/05/2009.
- MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M.A. Dynamics of cancer progression. **Nat.Rev.Cancer**, v. 4, n. 3, p. 197-205, 2004.
- OLIVIER, M.; PETITJEAN, A.; MARCEL, V.; PETRE, A.; MOUNAWAR, M.; PLYMOTH, A.; DE FROMENTEL, C. C.; HAINAUT, P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. **Cancer Gene Ther.**, v. 16, p. 1-12, 2009.
- WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 9, p. 95-107, 2009.