

PADRONIZAÇÃO DA PCR TOUCHDOWN NA PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE METÁSTASE UTILIZANDO O GENE TIMP-3

GOEDERT, Lucas¹; YURGEL, Virginia¹; THUROW, Helena¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling¹; COLLARES, Tiago².

¹ Laboratório de Genômica Funcional – CDTec/Biotecnologia – UFPel

² Laboratório de Embriologia e Transgênese Animal – CDTec/Biotecnologia – UFPel
goedertlucas@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Nos organismos, as células estão rigorosamente aderidas umas nas outras e também com a matriz que as envolve, dessa maneira, preservando a integridade do tecido, sua estrutura e organização espacial. A organização tecidual é essencial para manter sua função e fisiologia adequada, assim como, outras importantes atividades celulares são dependentes da adesão entre as células, incluindo proliferação, motilidade, migração e apoptose. Em decorrência dessas características, uma disfunção na adesão celular é identificada em diversas patologias, especialmente na progressão do câncer (Brooks, *et al.*, 2010).

Enquanto tumores primários são estáticos, ou seja, permanecem localizados na sua região original e, em vista disso, podem ser removidos através de procedimentos cirúrgicos; no processo de progressão tumoral as células perdem sua capacidade de aderência e se tornam mais migratórias, contribuindo para o início da metástase. No câncer, onde os mecanismos de reparo celular são deficientes, lesões locais e rompimento da adesão das células tumorais, causam um dano indesejável e comprometedor ao tecido local (Drivalos, *et al.*, 2011).

Diversos receptores de membrana estão envolvidos no processo de adesão celular, interagindo fisicamente com moléculas específicas encontradas na superfície das células adjacentes ou em associação à matriz que as envolve. A disfunção desses receptores pode comprometer o funcionamento celular e ter consequências drásticas durante processos de inflamação e angiogênese, resultando em possíveis processos de metástases (Paron, *et al.*, 2011).

Inúmeras moléculas estão envolvidas na adesão celular atuando, indiretamente como supressores tumorais, como as E-caderinas e também secretas celulares presentes na matriz, como por exemplo, fibronectinas, lamininas, colágenos e proteoglicanas (Schaefer, *et al.*, 2010).

A invasividade do câncer é sustentada por um aumento da atividade enzimática das células tumorais, expressando metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs pertencem à família de endopeptidases zinco-dependentes, as quais constituem um grupo de 20 proteínas que são responsáveis pela degradação de um vasto número de proteínas, especialmente aquelas envolvidas na adesão celular e componentes da matriz extracelular. Além disso, as MMPs estão envolvidas no rompimento da matriz extracelular das células endoteliais, aumentando a angiogênese tumoral (Zarrabi, *et al.*, 2011).

Outro grupo de proteases dependentes de zinco é a família da Adamalisina (ADAMs). As ADAMs também apresentam funções de metaloproteases. Ambas as proteínas apresentam domínios conservados entre os membros da sua família, os quais podem sofrer intervenção de reguladores negativos, processo necessário para a remodelação da matriz extracelular.

O principal regulador das MMPs e ADAMs é a família denominada de Inibidores de Metaloproteases (TIMP), constituída de quatro membros TIMP-1, -2, -3 e -4. Tais proteínas apresentam uma região N-terminal conservada que se liga ao domínio catalítico das MMPs, inibindo sua atividade. Todas as MMPs podem ser inibidas pela TIMP, entretanto não é mantida a mesma eficácia para todas as inibições (Stetler, *et al.*, 2008).

Entre os inibidores se destaca a TIMP-3, a qual inibe eficazmente a MMP-2, MMP-9 e a grande maioria das ADAMs. Além dessas funções, a família de TIMP participa em diversas atividades biológicas incluindo diferenciação, crescimento, migração, invasão celular, angiogênese e apoptose. Esses efeitos são mediados independentemente da inibição da MMPs.

Visto a importância do estudo da TIMP-3 em virtude de suas características específicas de anti-angiogênese e, principalmente, de inibição de MMPs (Hoque, *et al.*, 2008), o presente estudo tem por objetivo padronizar, através da técnica de Touchdown PCR, a amplificação dos 5 éxons do gene TIMP-3 a fim de avaliar possíveis mutações que podem alterar o funcionamento dessa proteína em amostras de diferentes tumores.

PCR Touchdown é uma variação da técnica de PCR convencional que oferece uma simples e rápida maneira de otimizar o processo de PCR, aumentando sua especificidade, sensibilidade e rendimento, sem a necessidade de longas técnicas laboriosas ou reconstrução dos primers. A PCR Touchdown emprega uma temperatura de anelamento superior (5-10°C) à temperatura de *melting* (T_m) dos primers nos ciclos iniciais e então sofre uma redução progressiva de 1° ou 2° C por ciclo ou a cada dois ciclos. Essa redução se dá até alcançar a temperatura ideal ou 1 a 5° C inferior da atuação dos primers, a qual é mantida até o término do programa. A utilização de temperaturas de anelamento mais elevadas nos ciclos iniciais propicia um aumento na especificidade da reação sem prejudicar o rendimento do produto amplificado.

Essa técnica proporciona uma grande aplicabilidade na padronização de protocolos de PCR e detecção de polimorfismos de base única. A PCR Touchdown é particularmente útil para amostras de difícil amplificação, contudo pode também ser padronizado para a otimização e aumento da especificidade da amplificação, reduzindo a amplificação de fragmentos não-específicos (Korbie, *et al.*, 2008).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Amostras e Extração de DNA

As amostras utilizadas para a padronização da PCR Touchdown, são provenientes do biobanco de DNA do Laboratório de Genômica Funcional/UFPEL. Para a extração do DNA genômico foi seguido os procedimentos recomendados pelo fabricante do DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen®). As amostras foram eluídas num volume de 100µL. O material foi armazenado em ultrafreezer a - 80°C.

PCR Touchdown

A amplificação do gene foi realizada usando a técnica de PCR Touchdown. Foram utilizados primers descritos por Liu *et al.*, (2007). O protocolo foi estabelecido para a melhor amplificação através de dois programas específicos para cada grupo de éxons. Para os éxons 1 e 3, iniciou-se com uma desnaturação a 95° C (10'), seguido por outro ciclo de 94° C (30''), uma sequência de ciclos de anelamento de

4 CONCLUSÃO

Visto a qualidade dos resultados apresentados, o protocolo de PCR Touchdown utilizado, o qual foi adaptado da literatura (Liu, *et al.*, 2007) demonstrou alta confiabilidade e eficiência para o processo de padronização da amplificação das amostras advindas da população-alvo do estudo, o que garantiu grande qualidade do sequenciamento proporcionando um bom andamento do projeto.

5 REFERÊNCIAS

BROOKS, Susan. et al. Molecular interactions in cancer cell metastasis. Acta histochemica. Oxford, Uk, 25 mar. 2010.

DRIVALOS, Alexandros. et al. The role of the cell adhesion molecules (integrins / cadherins) in prostate cancer. International braz j urol. Brazil, 30 maio 2011.

HOQUE, Mohammad Obaidul. et al. Timp3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. J urol.. USA, 01 fev. 2008.

KORBIE, Darren J; MATTICK, John S. Touchdown pcr for increased specificity and sensitivity in pcr amplification. Nature protocols. USA, 21 ago. 2008.

LIU, Mira C. P.. et al. Genetic and epigenetic analysis of the timp-3 gene in ovarian cancer. Cancer letters. USA, 24 mar. 2007.

PARON, Igor. et al. Tenascin-c enhances pancreatic cancer cell growth and motility and affects cell adhesion through activation of the integrin pathway. Plos one. USA, 29 jun. 2011.

SCHAEFER, Liliana; SCHAEFER, Roland M.. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. Cell tissue res. USA, 10 jun. 2010.

STETLER-STEVENSON, William G.. The tumor microenvironment: regulation by mmp-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. Cancer metastasis rev.. USA, 01 mar. 2008.

ZARRABI, Kevin. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-14 (mmp-14)-mediated cancer cell migration*. Jbc papers in press. USA, 27 jul. 2011.