

## ANÁLISE MUTAGÊNICA DO GENE TIMP-3 NA PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE METÁSTASE EM CARCINOMAS BUCAIS.

**GOEDERT, Lucas<sup>1</sup>; NASCENTES, Luiza<sup>1</sup>; YURGEL, Virginia<sup>1</sup>; NEDEL, Fernanda<sup>1</sup>; TARQUINIO, Sandra<sup>3</sup>; COLLARES, Tiago<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Genômica Funcional – CDTEC/Biotecnologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Embriologia e Transgênese Animal – CDTEC/Biotecnologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Odontologia  
goedertlucas@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

A organização tecidual é essencial para manter a função e fisiologia adequada do tecido, assim como, outras importantes atividades celulares são dependentes da rigorosa 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 e invasividade do câncer (Brooks, *et al.*, 2010).

Enquanto tumores primários são estáticos, 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).

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 da atividade da TIMP-3 como um inibidor da atividade proteolítica do MMPs, acredita-se que seu principal papel no microambiente tumoral seja reduzir a invasividade do tumor e da metástase. A baixa expressão e atividade da TIMP-3 ocorre em alguns tipos de câncer como Adenocarcinomas Esofágicos (Smith, *et al.*, 2008) e tem sido associada a um pobre prognóstico, resultando em uma baixa sobrevivência dos pacientes. Uma das hipóteses para essa baixa expressão e atividade baseia-se na possível presença de mutações que afetam a atividade natural inibitória da proteína, facilitando a invasividade tumoral; e a segunda hipótese para a redução da expressão da proteína TIMP-3 é a ocorrência de metilação do DNA na região promotora do gene, afetando assim, a sua expressão (Smith, *et al.*, 2008).

Assim, o presente estudo teve como objetivo fazer uma análise mutagênica por sequenciamento do gene de amostras proveniente de pacientes diagnosticados com Carcinoma Bucal, para possivelmente relacionar a frequência de mutações com a invasividade do câncer de acordo com o histórico do paciente.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

### Amostras e Extração de DNA

As 10 amostras diagnosticadas com carcinoma bucal utilizadas para a análise mutagênica do gene TIMP-3, 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 em um volume de 100µL. O material foi armazenado em ultrafreezer a – 80°C.

### Etapa de Amplificação

A amplificação dos 5 éxons do gene foi realizada usando as técnicas de PCR Convencional e 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 foi utilizada a técnica de Touchdown PCR, iniciando-se com uma desnaturação a 95°C (10'), seguido por outro ciclo de 94°C (30''), uma sequência de ciclos de anelamento de 60°C até 56°C (30'') diminuindo 1°C a cada ciclo por 6 ciclos consecutivos e um ciclo de extensão de 72°C (45''). Posteriormente, ciclos de desnaturação de 94°C (30''), anelamento 56°C (30'') e extensão a 72°C (45''), totalizando 40 ciclos e ao final um ciclo a 72°C (5').

Para o grupo de éxons 2,4 e 5 foi utilizado o seguinte programa de PCR Convencional: iniciando-se com uma desnaturação de 94°C (5'), seguidos de 30 ciclos de 94°C (45''), 60°C (45'') e 72°C (45''), finalizando com uma extensão de 72°C(7'). As reações de PCR foram executadas com um volume de 25 µl contendo 1,2 µl de DNA, 2,1 µl de cada primer forward e reverse na concentração de 10 pmol, 12,4 µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA) e 7,4 µl de H<sub>2</sub>O.

## Purificação, Sequenciamento e Análise das Amostras

A amplificação dos éxons foi confirmada por sequenciamento usando os primers anteriormente citados. Os produtos de PCR foram purificados com o auxílio do Kit de Purificação de Banda de Gel de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, USA). O sequenciamento foi realizado com o uso do MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) e os cromatogramas foram analisados e editados usando o ContigExpress®, programa fornecido pelo Vector NTI 11.0 suite (Invitrogen, USA). Os resultados do sequenciamento foram comparados com a sequência referência do gene TIMP-3 depositada no NCBI (identificação NG\_009117.1).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode observar na Fig. 1 a técnica de sequenciamento forneceu resultados de boa qualidade, o que demonstra que os protocolos de amplificação foram devidamente padronizados e a etapa de purificação bem estabelecida. As sequências obtidas foram devidamente editadas e agrupadas para verificar a existência de mutações e/ou alterações genéticas. Até a presente data foram obtidas 36 sequências que, depois de editadas, apresentaram uma alta qualidade nos padrões dos eletroferogramas, permitindo uma boa análise e interpretação dos dados. Dessas 36 sequências, apenas duas apresentaram alterações genéticas em relação à sequência referência, mais precisamente, Polimorfismos de Base Única (SNP).

Os SNPs foram localizados na posição 1435 do mRNA (SNP número de acesso – rs9862) e correspondem ao éxon 3 da amostra 7 e da amostra 41, entretanto trata-se de um SNP sinônimo, ou seja, os códons da sequência referência e das amostras seqüenciadas codificam para o mesmo aminoácido independente do fato de serem sequências trinucleotídicas diferentes. Essa característica é proveniente da degeneração do DNA e, segundo o conhecimento atual, tendem a não incorrer em nenhuma alteração de função da proteína TIMP-3 (Komar, 2009)

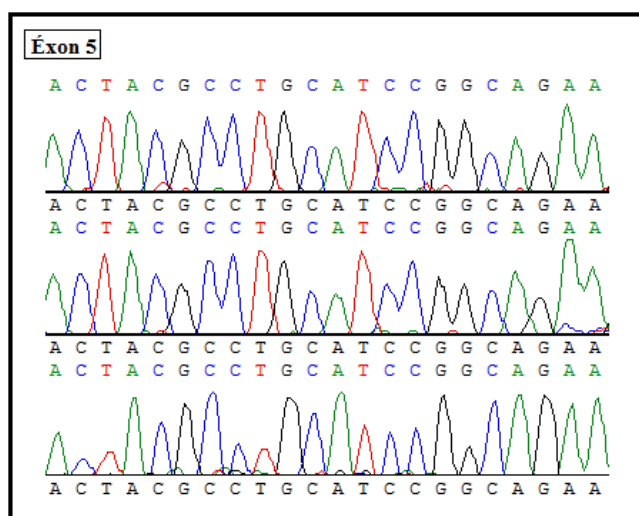


Figura 1- Análise do seqüenciamento do éxon 5 da amostra 4.

## 4 CONCLUSÃO

A análise mutagênica foi realizada com sucesso nas amostras seqüenciadas até a presente data e não foram detectadas alterações genéticas no gene TIMP-3 que possibilitariam uma associação com o grau de invasividade do câncer dos pacientes diagnosticados com carcinoma bucal. As próximas etapas do projeto consistem em seqüenciar novas amostras para garantir resultados estatísticos relevantes, além disso, faz-se necessário uma análise dos perfis de metilação do gene TIMP-3 como alternativa promissora na prospecção de marcadores moleculares para a invasividade do carcinoma bucal utilizando o gene TIMP-3.

## 5 REFERÊNCIAS

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

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

KOMAR, Anton A. Snps, silent but not invisible. **Genetics perspectives**. USA, 2009.

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

SMITH, Eric. et al. Methylation of timp3 in esophageal squamous cell carcinoma. **World journal of gastroenterology**. USA, 2008.

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

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