

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**VARIAÇÕES DA TÉCNICA DDRT-PCR PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO
GÊNICA DIFERENCIAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA**

NÁDIA PEREIRA DE CASTRO

Prof. Dr. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia para a obtenção do Grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

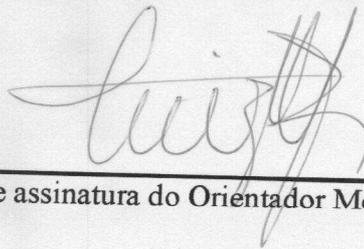
Uberlândia-MG
Abril-2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

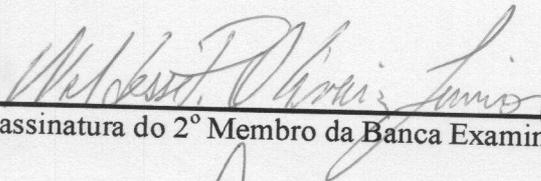
VARIAÇÕES DA TÉCNICA DDRT-PCR PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO
GÊNICA DIFERENCIAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA

NÁDIA PEREIRA DE CASTRO

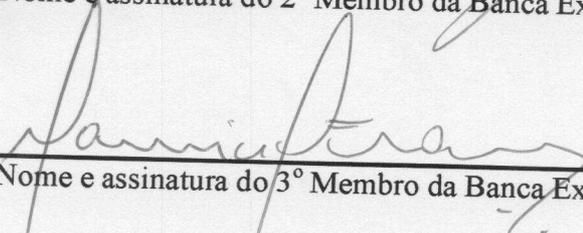
Aprovado Pela Banca Examinadora Em 23/04/02 Nota: 100,0



Nome e assinatura do Orientador Membro da Banca Examinadora



Nome e assinatura do 2º Membro da Banca Examinadora



Nome e assinatura do 3º Membro da Banca Examinadora

Uberlândia, _____ de Abril de 2002.

VARIAÇÕES DA TÉCNICA DDRT-PCR PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA
DIFERENCIAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA

VARIATIONS OF DDRT-PCR TECHNIQUE FOR ANALYSIS OF DIFFERENTIAL
GENE EXPRESSION IN SAMPLES OF BREAST CANCER

NÁDIA PEREIRA DE CASTRO¹ WALDESSE PIRAGÉ DE OLIVEIRA JUNIOR²,
JAQUELINE DAS DORES DIAS³, PAULO CÉSAR FERNANDES⁴, LUIZ RICARDO
GOULART⁵.

(1) Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

nadiapc@yahoo.com

(2) Doutorando em Genética pelo Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade
Federal de Uberlândia. pirage@ufu.br

(3) Mestranda em Genética pelo Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade
Federal de Uberlândia. jacdias@zipmail.com.br

(4) Médico no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

(5) Professor titular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de
Uberlândia. lrgoulart@ufu.br

(1, 2, 3 e 5) Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB)/ Universidade Federal de
Uberlândia/ Av. Amazonas s/ n, Bloco2E, Campus Umuarama, Uberlândia-MG, 38400-
446.

(4) Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) / Av. Para 1720,
Campus Umuarama, Uberlândia – MG, CEP: 38400-902.

Apoio financeiro: CNPq/UFU

VARIAÇÕES DA TÉCNICA DDRT-PCR PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA

VARIATIONS OF DDRT-PCR TECHNIQUE FOR ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SAMPLES OF BREAST CANCER

RESUMO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres, sendo que apenas 5 à 10% dos casos são hereditários. Devido à natureza multigênica do câncer e a grande influência ambiental nos casos esporádicos, é de importância fundamental o diagnóstico precoce para a obtenção do sucesso terapêutico. Neste contexto, embora muitos marcadores moleculares tenham sido descritos, as informações levam, em sua maioria, para genes de ocorrência tardia. Com o intuito de isolar novos marcadores moleculares, duas variações metodológicas do DDRT-PCR para análise da expressão gênica em tecidos tumorais e normais foram comparadas, sendo uma das técnicas a metodologia convencional que usa entre os iniciadores uma seqüência obrigatória oligo (dT) durante a transcrição reversa seguida pela PCR com um iniciador randômico. A outra metodologia usa apenas iniciadores arbitrários. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de poliacrilamida corados por nitrato de prata. Resultados revelaram que a metodologia convencional apresentou um menor número de bandas com maior resolução do que as obtidas pela amplificação randômica, mas esta última, evita que somente sejam realizadas ampliações de cDNAs correspondentes à porção 3'.

Unitermos: Câncer de mama, ESTs, DDRT-PCR.

INTRODUÇÃO

Dentre os diversos tipos de câncer, o de mama é uma das neoplasias de maior incidência mundial, afetando uma em cada oito mulheres, em média. Devido a sua alta frequência, é provavelmente o mais temido pelas mulheres, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção de sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (www.inca.org.br/cancer/tipos/mama).

No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres. Em 1998, foram registradas 8.044 mortes decorrentes deste tipo de câncer. Dos 305.330 novos casos de câncer com previsão estimada em 2001, o câncer de mama será o principal a atingir a população feminina, sendo responsável por 31.590 novos casos (www.inca.org.br/cancer/tipos/mama). Estima-se que cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama e ovário sejam hereditários.

Os fatores de risco do câncer de mama podem ser caracterizados como hereditários, ambientais e culturais. Os fatores ambientais ocupam lugar preponderante entre os fatores de risco (aproximadamente 80 a 90% dos cânceres são devidos ao meio ambiente). Dentre os principais fatores ambientais citam-se: tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, uso de medicamentos (ex: reposição hormonal), fatores ocupacionais e radiações (www.inca.org.br/prevencao/fatores).

Atualmente, diversos marcadores moleculares têm sido associados aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama. Dentre os principais, estão os genes BRCA1 e BRCA2; que são responsáveis pela maioria dos cânceres de mama do

tipo herdado (WARMUTH *et al.*, 1997). O termo herdado refere-se ao câncer que ocorre quando a história familiar sugere alta penetrância de um gene “major” e o tipo familiar àquele no qual um ou dois parentes em primeiro grau desenvolvem câncer (HILL, *et al.*, 1997). Outros genes também já foram isolados e apresentam relação com o câncer de mama, como: SRP1, associado ao desenvolvimento metastático (ANISOWICZ *et al.*, 1999); gene UDPGDH que é regulado por andrógenos e está envolvido no mecanismo de inativação dos esteróides sexuais (LAPOINTE & LABRIE, 1999); gene DRIM que é regulado negativamente durante a metástase (SCHWIRZKE *et al.*, 1998) e muitos outros.

Estes exemplos demonstram alguns dos genes estudados, porém muitos mecanismos deverão ser esclarecidos num futuro próximo.

Esforços semelhantes têm sido feitos na tentativa de obter novos marcadores moleculares para avaliação, diagnóstico e prognóstico da doença esporádica. Assim, várias técnicas têm sido desenvolvidas nos últimos anos para analisar a expressão gênica.

Muitos trabalhos que visam isolar e caracterizar novos genes utilizam a técnica *Differential Display* como ferramenta principal, sendo uma técnica importante na pesquisa sobre o câncer e outros estudos com humanos, animais, vegetais, microrganismos e outros.

A técnica *Differential Display* de LIANG & PARDEE, (1992), ou de acordo com a nomenclatura do PCR, DDRT-PCR (BAUER *et al.*, 1993) pode ser uma ferramenta muito útil na tentativa de aumentar os conhecimentos sobre o câncer uma vez que possibilita a análise da expressão gênica, sem considerar um gene alvo específico.

O DDRT-PCR usa a transcrição reversa (RT), que consiste na síntese de moléculas de DNA (cDNA) a partir de RNA, tendo sido descrita por VERES *et al.* (1987), na qual utilizaram a enzima de um retrovírus, transcriptase reversa, para catalisar a síntese do cDNA.

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase ("PCR - Polymerase Chain Reaction") foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (INNIS & GELFAND 1990; MULLIS & FALOONA 1987; SAIKI *et al.*, 1985) e desde então revolucionou toda a Genética. A PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta metodologia se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que "flanqueiam" a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998).

Cada ciclo da PCR envolve 3 passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA molde é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 à 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 à 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e da seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridação DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que "flanqueiam" a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada porção terminal 3' dos *primers*. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde à seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência seja produzida no processo

(FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998). Vários ciclos repetidos permitem a amplificação do fragmento, cujo tamanho é limitado pelos *primers* (porção 5') (WHITE *et al.*, 1989).

O passo decisivo para a expansão da técnica de PCR ocorreu quando SAIKI *et al.* (1988) isolaram uma DNA polimerase (Taq polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes térmicas e polimerisa a 72°C, mantendo assim a atividade por alguns minutos a 95°C (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998). As condições iniciais para a amplificação, tais como concentrações de MgCl₂, Taq DNA polimerase e de *primers* e a temperatura de hibridação, devem ser definidas para cada par de *primers* (PASSAGLIA & ZAHA 1996).

A DDRT-PCR usa na reação da RT *primers* 3' ancorados (oligo dT), selecionando assim apenas RNAs-mensageiros. Na PCR, combinações de *primers* 3' ancorados, associados a *primers* arbitrários de 10 pares de base podem gerar fragmentos que se originam principalmente da cauda poli (A) e estendem cerca de 50-600 nucleotídeos "upstream" (LIANG & PARDEE. 1992; BAUER *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1993). A técnica é útil para gerar um padrão completo de todos os RNAs mensageiros expressos na célula, usando um número razoável de pares de *primers* (BAUER *et al.*, 1993).

Os *primers* arbitrários de 10 pares de base já haviam sido utilizados por WILLIAMS *et al.*, (1990) e WELSH & MACCLELLAND (1990) para amplificar polimorfismos no DNA, e mais recentemente, para obter RNAs mensageiros alvos de genes diferencialmente expressos (WELSH & MACCLELLAND 1992).

Essa técnica tem sido amplamente utilizada, com sucesso, por vários grupos, para isolar genes diferencialmente expressos em várias situações biológicas, incluindo o

câncer, diabetes, embriogênese, desenvolvimento cerebral e outros. Sob condições apropriadas, o padrão de fragmentos derivados de um tipo celular é reproduzível e pode ser comparado com os de outros tipos de células (WARTHOE *et al.*, 1995).

Em 1992, LIANG & PARDEE, utilizaram o DDRT-PCR para comparar RNAs mensageiros de células epiteliais mamárias humanas normais e tumorais e descobriram que o gene S1 pode estar relacionado com o controle do crescimento dessas células do câncer de mama.

HELPS *et al.*, (1995), utilizaram o DDRT-PCR em *Drosophila melanogaster* para caracterizar e isolar o gene homólogo ao gene BRCA1 humano, sendo esse diferencialmente expresso em tumor de mama.

CUNNINGHAM *et al.*, (1996), estudaram o desenvolvimento de suínos e descobriram, via DDRT-PCR, um aumento na expressão de produtos de PCR específicos durante a rápida elongação trofoblástica, o que ajudou a esclarecer alguns pontos no desenvolvimento desses animais.

Um trabalho interessante foi realizado por MALHOTRA *et al.*, (1999), utilizando a DDRT-PCR para estudar o desenvolvimento de órgãos em fetos humanos, selecionaram a partir de tecido hepático, cDNAs diferencialmente expressos entre as amostras do feto e de adulto. Como resultado, eles isolaram vários genes que se apresentavam expressos no feto (ex. TGF2 ou fator-2 de crescimento tipo-insulina) e que estavam sem expressão no adulto e vice-versa.

A ampla utilização do DDRT-PCR deve-se à sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade e necessidade de pouco RNA (LIANG & PARDEE 1992; BAUER *et al.*, 1993; ZIMMERMANN & SHCULTZ 1994; XINKANG & FEUERSTEIN 1995).

A DDRT-PCR é um método muito flexível e compreensivo na detecção de quase todos os genes expressos em qualquer tipo de célula, além de identificar diferentes níveis de expressão gênica (WARTHOE, *et al.*, 1995). Uma alternativa a esta técnica convencional seria a utilização de apenas *primers* arbitrários tanto na RT quanto na PCR.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar os perfis de expressão gênica diferencial gerados por duas variações da técnica DDRT-PCR em amostras de câncer de mama e determinar qual é a mais informativa na geração de perfis de seqüências expressas. Desta forma, este trabalho poderá contribuir no estudo de expressão gênica do câncer com informações que poderão ser úteis no diagnóstico e tratamento da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue e biópsia de tecidos de pacientes com câncer de mama foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU, obtidas em processos normais de diagnóstico e tratamento, realizada com a permissão dos pacientes que assinaram um termo de consentimento (ANEXO I). O sangue foi coletado em tubos por sistema de *Vacutainer*, contendo EDTA (Ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico) para evitar coagulação e biópsias foram coletadas de ambos tecidos normal e neoplásico maligno de mama de cada paciente, colocando-as em solução fisiológica e sendo imediatamente processadas para a análise.

Das amostras coletadas procedeu-se a extração do RNA total. Todas as precauções foram tomadas para evitar tanto a contaminação das amostras com RNase (enzima que degrada o RNA), quanto à contaminação cruzada de amostras, durante a manipulação de sangue e biópsias. Após a coleta do sangue, alíquotas de 1,5 mL foram colocadas em microtubos de 2,0 mL. Centrifugou-se a 1800 g por 40 minutos, isolando assim a camada de leucócitos. Esta foi lavada usando Solução de Lavagem (Tris-HCl, MgCl₂, NaCl₂ e água), centrifugada a 1800 g por 1 minuto. Esta operação foi repetida por mais duas vezes, descartando-se o sobrenadante. Nesta etapa, adicionou-se o TRIZOL-Reagent (GIBCO-BRL), conforme recomendações do fabricante. A biópsia foi cortada e macerada com auxílio de um bisturi e o tecido foi homogeneizado em TRIZOL-Reagent. Adicionado este reagente, as amostras (sangue e biópsia) foram processadas da mesma maneira.

Após a extração (ANEXO II), a qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em tampão Tris-Borato EDTA (0,5 X TBE), conforme SAMBROOK *et al.*, (1989). Utilizou-se formamida na amostra a ser aplicada no gel, pois a diluição em formamida protege o RNA contra degradação (CHOMCZINSKI, 1992). Os amplicons foram visualizados em transiluminador UV e fotografado em VDS Image Master (Pharmacia), após serem corados com brometo de etídeo (10 mg/mL).

Verificada a qualidade do RNA, este foi tratado com RNase-free DNase I (Promega) de acordo com o fabricante (ANEXO III). Utilizou-se Tampão 10X, 4U/μL de RNasin (inibidor de RNases da Invitrogen), 1U/μL de DNase (enzima que degrada o DNA), DTT (Ditionitretol), RNA total e água/DEPC (Dietilpirocarbonato).

Em seguida, as concentrações do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica à 260 nm..

Posteriormente, 200 ng das amostras de RNA total foram transcritas reversamente na presença de 100U Transcriptase Reversa MMLV-RT Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase (Invitrogen), 50 μ M dNTPs (desoxirribonucleotídeos) trifosfato, (Amersham Pharmacia), 15U RNasin, tampão da RT (1x) e 8 pmoles de *primers* (oligo dT no DDTR-PCR convencional ou arbitrário de 10 pb na DDTR-PCR modificada), completando-se a reação com água/DEPC. A reação foi incubada a 37°C por 1 h e aquecida a 95°C por 5 minutos para inativar a transcriptase reversa, pois esta inibe a atuação da Taq DNA polimerase na amplificação do cDNA (SELLNER *et al.*, 1992; FEHLMANN *et al.*, 1993).

A amplificação ocorreu via PCR, que consistiu das seguintes condições: 1,5mM MgCl₂, 1U Taq DNA polimerase, 100 μ M dNTPs, 8 pmoles de cada *primer* (oligo dT e arbitrário no DDTR-PCR convencional ou apenas arbitrário de 10 pb na DDTR-PCR modificada), 2,0 μ L de cDNA, completando-se o volume final da reação com água/DEPC. O ciclo térmico da PCR consistiu de aquecimento a 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 40°C por 2 minutos e 72°C por 1 minutos e 30 segundos, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para testar as metodologias foram utilizados os seguintes *primers*: 3' oligo dT(T₁₂GA, T₁₂AG, T₁₂CG) e 6 OPs (*primers* arbitrários da OPERON Technologies) de 10 pares de bases. Os OPs utilizados foram: OPA4(5'AATCGGGCTG3'), OPA6(5'GGTCCCTGAC3'), OPA14(5'TCTGTGCTGG3'),

OPF4(5'GGTGATCAGG3'),

OPF14(5'TGCTGCAGGT3'),

OPW8(5'GACTGCCTCT3').

Cerca de 7 μ L dos amplicons gerados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 30% (19:1-Acrilamida:Bis) não desnaturante 6% por cerca de 4 horas a 250 volts. Logo após o término da eletroforese, o gel foi corado de acordo com BLUM *et al.* (1987), com modificações de BASSAM *et al.* (1991) e OLIVEIRA JR. (1999). Primeiramente, foi deixado por 30 minutos em ácido acético 10%, lavado 2 vezes com água destilada por 2 minutos e corado com solução contendo 400mg de nitrato de prata dissolvido em 200mL de água destilada e adicionado 300 μ L de formaldeído. O gel foi deixado nesta solução por 20 minutos no escuro.

Após esta fase, o gel foi lavado com água destilada por 1 minuto, adicionando-se uma solução reveladora gelada contendo: 6g de carbonato de sódio, 300 μ L de formaldeído, 40 μ L de tiosulfato (10mg/mL) em 200mL de água destilada. A solução reveladora permaneceu em contato com o gel até obter um padrão adequado de bandas.

A reação foi parada com ácido acético 10% por 5 minutos e a seguir o gel foi lavado com água destilada por 2 minutos. Depois de corado, o gel foi colocado em papel celofane para secagem. Os géis foram fotografados para análise das bandas diferencialmente expressas e posteriormente foram recortadas para futuros estudos.

RESULTADOS

O padrão da extração do RNA total com TRIZOL-Reagent é visualizado na FIGURA 1a, apresentando baixa contaminação por DNA.

Na FIGURA 1b, observam-se 50µg de RNA total após o tratamento com DNase. Verificou-se uma diminuição da intensidade de ácidos nucleicos (RNA) e ausência de DNA, quando se compara com o mostrado na FIGURA 1a.

As FIGURAS 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mostram os padrões diferenciais de expressão gênica em 4 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, gerados por 2 metodologias diferentes. Na metodologia convencional, verifica-se um menor número de bandas com maior resolução do que as obtidas pela amplificação randômica, sendo observada ESTs diferencialmente expressas em ambas as técnicas. Visualiza-se no perfil eletroforético dos géis, variação nas duplicatas, bandas presentes apenas em uma paciente (bandas paciente-específicas) e fragmentos constitutivos em ambas pacientes, conforme indicado pelas setas em cada figura.

A FIGURA 2 mostra a metodologia convencional, com a seguinte combinação de *primers*: OPA06 e T₁₂GA. Nesta figura, visualizam-se amplificações feitas em amostras (normal e tumoral) de duas pacientes (A e B), com perfis eletroforéticos exclusivos para cada repetição, embora os padrões obtidos permanecessem semelhantes dentro de cada classe, normal ou tumoral.

Na FIGURA 3, observa-se no perfil eletroforético, a metodologia DDRT-PCR modificada, utilizando-se apenas o *primer* arbitrário OPA6 tanto na RT quanto na PCR

para as mesmas amostras da FIGURA 2. Verifica-se nesta técnica uma maior quantidade de bandas expressas quando comparada com a figura anterior.

A FIGURA 4 revela expressão de outras duas pacientes (C e D). Observa-se a metodologia DDRT-PCR convencional gerada pelos *primers*: OPF4 e T₁₂CG. Verifica-se diferença na intensidade dos fragmentos e a utilização de amostra de sangue, mas esta não se mostrou informativa.

Na FIGURA 5, observa-se o perfil referente ao *primer* randômico OPF4 na metodologia DDRT-PCR modificada e as mesmas amostras das pacientes da FIGURA 4, sendo observado um maior número de ESTs (Expressed Sequence tags) diferencialmente expressas. Visualizam-se bandas referentes a amostras de sangue, normal e/ou tumoral específicos em cada paciente e também o controle negativo das reações.

A FIGURA 6 mostra um padrão de expressão gênica diferencial em amostras da paciente A, utilizando a metodologia DDRT-PCR convencional com *primers* OPA06 e T₁₂GA, incluindo amostra de sangue e controle negativo, não sendo realizadas duplicatas neste gel. Visualizam-se fragmentos diferencialmente expressos em todas as amostras.

A FIGURA 7 mostra o perfil eletroforético em amostras da paciente A com combinações de *primers* diferentes, indicando que um deles (OPA6) mostrou-se mais informativo do que o outro (OPW8). A metodologia visualizada neste gel é a DDRT-PCR modificada utilizando apenas *primers* randômicos.

DISCUSSÃO

Os protocolos utilizados tanto na extração quanto no tratamento com DNase, permitiram a obtenção de material com boa qualidade para a realização do DDRT-PCR. O tratamento é um passo indispensável, pois se obtém amostras com superior qualidade apesar da diminuição da concentração de RNA. Entretanto, quantidades tão baixas quanto 0,02 μ g (equivalente ao RNA de 200 células) são suficientes para realização do DDRT-PCR conforme descreveram LIANG *et al.* (1993).

As FIGURAS 2, 3 e 8 indicam que, independentemente da metodologia, as variações dos perfis eletroforéticos da DDRT-PCR dependem do tipo de *primer* e do genoma funcional da paciente e ainda há grande variabilidade entre as repetições, sugerindo que a técnica DDRT pode ser informativa quanto à expressão, mas possui problemas de repetibilidade.

As FIGURAS 2 e 6 apresentam grande diferença na qualidade dos perfis das seqüências expressas, isso demonstra a variabilidade das reações.

A expressão diferencial de genes (ESTs), apresentando-se como diferença na intensidade dos fragmentos ou presença/ausência de bandas nas diferentes amostras, é determinada pela interação entre os genes com o ambiente, podendo estar provavelmente relacionada com as manifestações clínicas da doença em cada paciente, pois o(s) possível(is) gene(s) representado(s) pelo fragmento diferencialmente expresso, pode(m) estar sendo suprimido(s) ou superexpresso(s), de acordo com o estágio de desenvolvimento no qual se encontra a doença. Isso foi verificado por BAUER *et al.* (1993), através da aplicação desta técnica na comparação de células em diferentes

situações fisiológicas ou estágios de desenvolvimento. Já bandas constitutivas (de mesmo peso molecular) nas amostras das pacientes, quando comparadas, podem sugerir uma expressão relacionada ao sexo (feminino), ao tecido utilizado (mama), ou mesmo a genes constitutivos importantes na manutenção do ciclo celular ou outras funções da célula, bem como RNA ribossômico ou transportador, no caso da metodologia modificada.

Ambas as técnicas desenvolvidas neste trabalho apresentam vantagens e desvantagens. A metodologia convencional possibilita uma seleção específica de RNA-mensageiro que é a expressão gênica momentânea da célula, o que permite a identificação de um possível gene relacionado ao câncer de mama; contudo a utilização de *primers* oligo-DT neste procedimento, restringe as amplificações à porção 3' do RNA. Isso representa uma desvantagem durante a amplificação, pelo fato de genes eucariotos apresentarem regiões denominadas UTRs (regiões não-traduzidas) tanto na porção 3' quanto na 5', e estas não são codificadas, mas podem estar envolvidas na regulação pós-transcricional e na estabilidade do RNA mensageiro, segundo descrito por STATON *et al.* (2000). Já a metodologia modificada com uso de *primers* randômicos, apresenta uma maior probabilidade de amplificar porções centrais do gene. A desvantagem desta técnica consiste em não selecionar apenas o RNAm, e sim, todos os RNAs existentes na célula; contudo, tanto o RNA transportador quanto o RNA ribossômico apresentam seqüências conservadas, minimizando a probabilidade de um fragmento diferencialmente expresso estar relacionado a algum destes RNAs. O melhor é realizar a purificação do RNA mensageiro das amostras, aumentando assim a possibilidade de um fragmento expresso diferencialmente estar relacionado com o câncer. Para se obter maiores informações a cerca das bandas diferencialmente

expressas e suas relações no desenvolvimento da doença, outras técnicas moleculares são necessárias, como: clonagem, seqüenciamento, ensaios com Northern Blot e RT-PCR.

O gel de poliacrilamida não desnaturante 6%, foi escolhido por apresentar uma melhor definição no padrão de bandas dos produtos amplificados e por ser adequado para se recuperar, reamplificar e sequenciar uma banda de interesse, de acordo com GOULART (1999). Além disso, como foi descrito por BAUER *et al.* (1993), o gel não desnaturante reduz a complexidade artificial do padrão de bandas.

A grande maioria dos géis apresenta amostras duplicadas, pois segundo LIANG *et al.*, (1993), o único caminho para minimizar bandas falso-positivas é realizar duplicatas ou repetir o experimento para aquelas linhas na qual a suposta banda candidata foi identificada.

A variação nas repetições da mesma amostra pode sugerir a existência de amplificações inespecíficas, ocorrendo sem que estejam ligadas ao evento molecular ou ainda pode estar ligada ao evento, mas devido à problemas de repetibilidade com uso de *primers* randômicos, é necessário que bandas diferencialmente expressas sejam clonadas, seqüenciadas e novamente testadas em experimentos de PCR quantitativo ou Northern blots.

Em alguns géis, a amostra de sangue mostrou-se pouco informativa, talvez devido a sua própria condição, ou ao tempo de estocagem e degradação durante seguidas manipulações. Já as seqüências diferencialmente expressas no sangue e presentes na biópsia tumoral podem indicar um processo metastático, sugerindo a presença de células micrometastáticas circulantes.

Diferentes *primers* e combinações foram usadas, mas alguns não geraram perfis adequados para a análise. Isso torna relevante a necessidade de se usar vários *primers* na tentativa de maximizar a obtenção de RNAs-m diferencialmente expressos, como foi descrito por LIANG & PARDEE (1992).

Segundo DOSS (1996), para se permitir o uso da coloração por nitrato de prata na detecção de bandas, é usado nas reações de amplificação à concentração de 200 μ M de dNTPs. No entanto, neste trabalho, utilizou-se 100 μ M nas amplificações e as bandas foram detectadas, obtendo-se um padrão economicamente mais viável e de boa qualidade.

Este trabalho confirma os resultados encontrados por AN *et al.*, (1996), os quais descreveram que a coloração por nitrato de prata fornece poucas bandas, e que seus resultados são difíceis de controlar e inconsistentes, pois sua sensibilidade é muito inferior à dos radioisótopos. No entanto, apresenta as vantagens de ser simples, rápida, segura e de custo inferior aos elementos radioativos.

A técnica DDRT-PCR possibilitou a obtenção de fragmentos de vários tamanhos, desde bandas de baixo peso molecular (50pb) até fragmentos de 700pb, sendo estes, maiores que os descritos por LIANG & PARDEE. 1992; BAUER *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1993, que demonstraram que a metodologia pode gerar fragmentos que se originam principalmente da cauda poli (A) e estendem cerca de 50-600 nucleotídeos "upstream.

Verifica-se que nenhuma metodologia utilizada demonstrou superioridade em relação à outra quando comparadas. A relevância dos resultados está no uso de combinações diferenciadas de *primers*, gerando diferentes perfis de seqüências

expressas mais informativas que outras, sendo que estas combinações dependem exclusivamente da homologia parcial com o genoma humano.

CONCLUSÃO

A combinação diferenciada de *primers* permite um amplo padrão de RNAs expressos na célula.

Ambas metodologias utilizadas neste trabalho mostraram-se eficientes em gerar perfis de seqüências expressas diferenciadas, contudo a metodologia DDRT-PCR modificada pode ser melhorada, através da purificação do RNA mensageiro das amostras. Este procedimento permite, através de *primers* randômicos, amplificar regiões centrais do possível gene relacionado ao câncer de mama, não restringindo as ampliações apenas à porção 3' do RNA.

Novos estudos deverão ser realizados para sequenciar e caracterizar as ESTs diferencialmente expressas que foram isoladas neste trabalho, pois o seqüenciamento permitirá um maior conhecimento dos fragmentos gerados por DDRT-PCR, mostrando se de fato estas bandas estão relacionadas ao surgimento do câncer de mama.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por tudo que sou.

Aos meus pais (Rubles e Neide) e aos meus irmãos (Rômulo e Rener) pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos pela confiança e amizade

Aos meus amigos da Universidade (Cris, Pri, Luiz, Jean, Carol, Adriano, Julia, Ludmila, Patrícia S., Shakira, Ricardo, Zuza, Serginho, Pri Castilho, Pri Martins, Cristina, Abner, Cláudia, Patrícia Cordeiro, Mirian, Cláudio, Renato, Cínthia, Duarte, Sérgio Reis, Viviane, Raquel, Elisa, Fernandinha, Fernando, Gustavo e Renata) pelo companheirismo, paciência e todos os momentos que tivemos.

Ao Prof. Luiz Ricardo pela confiança e oportunidade de crescer.

Ao Waldesse, amigo e Co-orientador, por me ensinar praticamente tudo que sei de laboratório e por me instruir a ler vários artigos, sei como isso é importante.

Ao Maurício Machaim, professor e membro da banca, pelos ensinamentos e por aceitar o convite de compor a banca examinadora.

Aos amigos do laboratório (Juliana Meola, Ana Cândida, Giovana, Jaqueline, Priscila, Elis, Katiana, Fred, Carlos, Guilherme, Machaim, Adriana, Juliana Franco, Mércia, Lorraine, Cristiane, Renata, Andréa, Paula, Karina, Alexandra, Betânia e Ana Laura) pelo agradável ambiente de trabalho e pela disposição em ajudar.

À todos que participaram direta e indiretamente do trabalho.

VARIATIONS OF DDRT-PCR TECHNIQUE FOR ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SAMPLES OF BREAST CANCER

ABSTRACT

The breast cancer is one of the main causes of death in women; however, only 5 to 10% of the cases are hereditary. Due to the multigenic nature of the cancer and the great environmental influence in sporadic cases, it is important to detect as early as possible to achieve therapeutic success. In this context, although many molecular markers have been described, they lead, in their majority, to genes of later cancer stages or to a disseminated micrometastatic cell stage. The purpose of this investigation is to compare two methodology variations of the DDRT-PCR based on gene expression patterns of malignant and normal breast tissues in order to isolate new molecular markers. The conventional methodology that uses an oligo (dT) primer in the reverse transcription followed by the PCR with a random primer will be compared to methodology that uses only random primers for both RT and PCR reaction. Amplicons were visualized in polyacrilamide gel electrophoresis stained with silver nitrate. Results demonstrated that the conventional methodology produced lower number of amplicons but with higher resolution than those produced by random amplification; however, the latter methodology does not have the limitation of amplifying only cDNA 3' ends, as occurs in the conventional one.

Uniterms: Breast Cancer, ESTs (Express Sequences tags), DDRT-PCR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, G.; LUO, G.; VELTRI, R. W.; O'HARA, S. M. Sensitive nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. **Bio Techniques**, Westboro-MA, v. 20, n. 3, p. 342-346. 1996.

ANISOWICZ, A.; SOTIROPOULOU, G.; SAGER, R. Re-expression of SPR1 in breast cancer cells by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or UV irradiation is mediated by the AP-1 binding site in the SPR1 promoter. **Molecular Medicine**, Baltimore-MD, v.5, n.8, p. 526-541, 1999.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego-CA, v.196, p. 80-83, 1991.

BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOE, P.; STRAUSS, M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n.18, p.4272-4280, 1993.

BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Germany, v.8, p.93-99, 1987.

CHOMCZYNSKI, P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.3791-3792, 1992.

CUNNINGHAM, M. E.; MALAYER, J. R.; YELICH, J. V.; GEISERT, R. D. Utilization of differential display PCR to identify changes in gene expression in early porcine conceptus development. **Journal of Animal Science**, Dunlap Ave-Savoy, v.74, supl.1, p.73, 1996.

DOSS, R. P. Differential display without radioactivity - a modified procedure. **Bio Techniques**, Westboro-MA, v.21, n.3, p.408-410, 412, 1996.

FEHLMANN, C.; KRAPF, R.; SOLIOZ, M. Reverse transcriptase can block polymerize chain reaction. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v.39, n.2, p.111-114, 1993.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, Embrapa-Cenargem, Brasília, 1998. p.37-38.

GOULART, L. R. Comunicação pessoal, 1999.

HELPS, N. R.; ADAMS, S. M.; BRAMMAR, M. W. J.; VARLEY, J. M. The *Drosophila melanogaster* homologue of the human BRCA1 gene is highly expressed during embryogenesis. **Gene**, Amsterdam-Netherlands, v.162, n.2, p.245-248, 1995.

HILL, A. D. K.; DOYLE, J. M.; McDERMOTT, E. W.; O'HIGGINS, N. J. Hereditary breast cancer. **British Journal of Surgery**, Oxford, v.84, p.1334-1339, 1997.

INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSHY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**, San Diego-CA, 1990. p.3-12, 24-28.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Cancer de Mama**. Disponível em: <http://www.inca.org.br/cancer/tipos/mama>. Acesso em: 20 set. 2001.

LAPOINTE, J. & LABRIE, C. Identification and cloning of a novel androgen-responsive gene, uridine diphosphoglucose dehydrogenase, in human breast cancer cells. **Endocrinology**, Bethesda-MD, v.140,n.10, p.4486-4493, 1999.

LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n.14, p.3269-3275, 1993.

LIANG, P. & PARDEE, A. P. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington-DC, v.257, p.967-971, 1992.

MALHOTRA, K.; LUEHRSEN, K.R.; COSTELLO, L. L.; RAICH, T. J.; SIM, K.; FOLTZ, L.; DAVIDSON, S.; XU, H.; CHEN, A.; YAMANISHI, D. T.; LINDEMANN, G. W.; CAIN, C. A.; MADLANSACAY, M. R.; HASHIMA, S. M.; PHAM, T. L.; MAHONEY, W.; SCHUELER, P. A. Identification of differentially expressed mRNAs in human fetal liver across gestation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.27, n.3, p.839-847, 1999.

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, San Diego-CA, v.55, p.335-350, 1987.

OLIVEIRA JR., Waldesse Piragé de. **Análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis Mellifera* LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) por DDRT-PCR.** Uberlândia, 1999. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

PASSAGLIA, L. M. P. & ZAHA, A. Técnicas de DNA Recombinante. In: ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**, Porto Alegre, RS, 1996. 324p.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington-DC, v.230, p.487-491, 1988.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, Washington-DC, v.230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratorial manual**, Cold Spring-NY, v.1, 1989.

SCHWIRZKE, M.; GNIRKE, A.; BORK, P.; TARIN, D.; WEIDLE, U. H. Differential gene expression in mammary carcinoma cell lines: identification of DRIM, a new gene down-regulated in metastasis. **Anticancer Research**, Athens-Greece, v.18, n.3A, p.1409-1421, 1998.

SELLNER, L. N., COELEN, R. J., MACKENZIE, J. S. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.1487-1490, 1992.

VERES, G.; GIBBS, R. A.; SCHERER, S. E.; CASKEY, C. T. The molecular basis of the sparse for mouse mutation, **Science**, Washington-DC, v. 237, p.415-417, 1987.

WARMUTH, M. A.; SUTTON, L. M.; WINER, E. P. **The American Journal of Medicine**, Belle Mead-NJ, n.102, p.407-415, 1997.

WARTHOF, P.; BAUER, D.; ROHDE, M.; STRAUSS, M. Detection and identification of expressed genes by differential display *in PCR Primer: a laboratorial manual*. Cold Spring-NY, 1995.

WELSH, J.; CHADA, K.; DALAI, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; MACCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.4965-4970, 1992.

WELSH, J. & MACCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

WHITE, T. J.; ARNHEIN, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Technical Focus**, v.5, n.6, p.185-188, 1989.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

XINKANG, W. & FEUERSTEIN, G. Z. Direct sequencing of DNA isolated from mRNA Differential Display, **BioTechniques**, Westboro-MA, v.18, n.3, p.448-452, 1995.

ZIMMERMANN, J. W. & SHCULTZ, R. M. Analysis of gene expression in the pre-implantation mouse embryo: use of mRNA differential display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington-DC, v.91, p.5456-5460, 1994.

ANEXO I

Termo de Consentimento

O laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia está realizando estudo genético relacionado ao câncer de mama. Este estudo está sendo dirigido pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e Dr. Paulo César Fernandes, juntamente com a acadêmica Nádia Pereira de Castro, graduanda em Biologia pela UFU.

O projeto consiste na detecção de genes diferencialmente expressos associados ao câncer de mama, em pacientes acometidas pela doença com histórico familiar e em casos esporádicos.

Para detectar genes diferencialmente expressos, é necessária a coleta de 4 mL de sangue periférico e obtenção de biópsias tumorais de mama, empregando-se material descartável, evitando riscos de contaminação.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os experimentos com o RNA.

O paciente poderá pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e aqueles que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelo presente termo apresentado por este documento,

Eu, _____

Concordo em colaborar com a pesquisa declarando estar ciente dos riscos,
benefícios e direitos.

Paciente _____

Testemunhas

ANEXO II

Extração de RNA Utilizando TRIZOL

- Adicione 1,0mL de TRIZOL para cada 100mL de amostra ou 100mg de tecido
- Agite em vortex por 15 segundos e incube por 5 minutos à temperatura ambiente
- Adicione 200µL de clorofórmio para cada 1,0mL de TRIZOL
- Agite em vortex por 15 segundos e incube de 2-15 minutos à temperatura ambiente
- Centrifugue a 12000g por 15 minutos a 4°C
- Transfira o sobrenadante para um novo tubo
- Adicione 1,0mL de isopropanol
- Incube as amostras overnight à -80°C
- Centrifugue a 12000g por 10 minutos à 4°C
- Descartar o sobrenadante
- Lavar o pellet com 1,0mL de etanol 75%, agitando em vortex.
- Centrifugue a 7500g por 5 minutos a 4°C
- Secar o pellet brevemente e ressuspensa em água tratada com DEPC.

* Incube com a mistura por 15' a temp. ambiente

ANEXO III**Tratamento com Dnase**

Tampão da Taq 10x	30 μ L
Inibidor de RNases(4U/ μ L)	3 μ L
DNase(1U/ μ L)	30 μ L
DTT 10mM	30 μ L
RNA total (50 μ g)	
Água/DEPC (q.s.p.300 μ L)	

- Misturar suavemente
- Incubar a 37°C por 90 minutos
- Adicionar 25 μ L de STOP Reaction

STOP Reaction

EDTA 0,5M	7,5 μ L
NaOAc 3M	37,5 μ L
SDS 20%	3,75 μ L
Água	26,25 μ L
Volume total	75 μ L

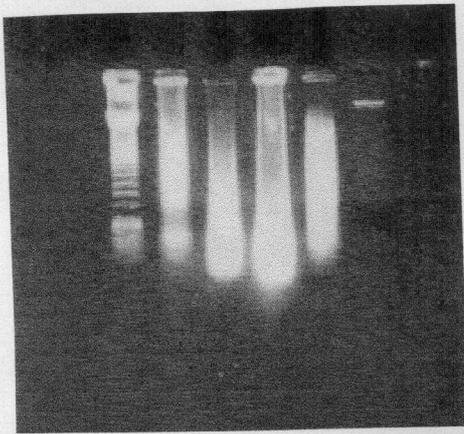
- Adicionar 225 μ L água/DEPC por reação
- Tratar com 1:1 Fenol-Cl (1:1)
- Centrifugar a 12.000rpm por 10 minutos a 4°C
- Transferir o sobrenadante para outro tubo
- Tratar com 1:1 Cl
- Centrifugar a 12.000rpm por 10 minutos a 4°C
- Transferir o sobrenadante para outro tubo com solução de precipitação

Solução de Precipitação

15 μ L NaCl (5M) + 1000 μ L EtOH 100% para cada 300 μ L da fase aquosa

- Incubar overnight a -70°C para cada RNA
- Centrifugue a 12000g por 10 minutos à 4°C
- Descartar o sobrenadante
- Lavar o pellet com 1,0mL de etanol 75%, agitando em vortex
- Centrifugue a 7500g por 5 minutos a 4°C
- Secar o pellet brevemente e ressuspenda em água tratada com DEPC.

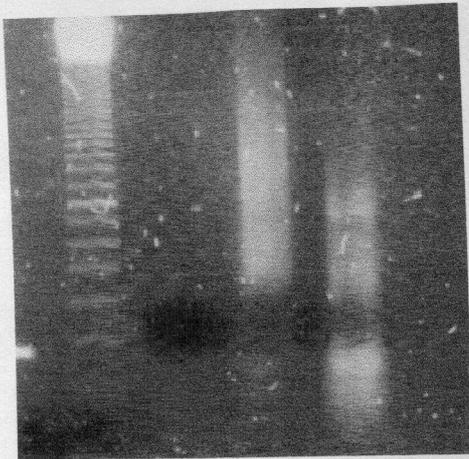
M T1 N2 T3 N3 S3



M-Marcador de 100pb, T-
tecido tumoral, N- tecido
normal e S - sangue. 1, 2 e
3- Pacientes

FIGURA 1a: Padrão de Extração de
RNA Total

M S3 N3 T3



·M- Marcador de 100pb, S -
sangue, N - normal, T -
tumoral. 3- Paciente

FIGURA 1b: Padrão de RNA Total
Tratado com DNase

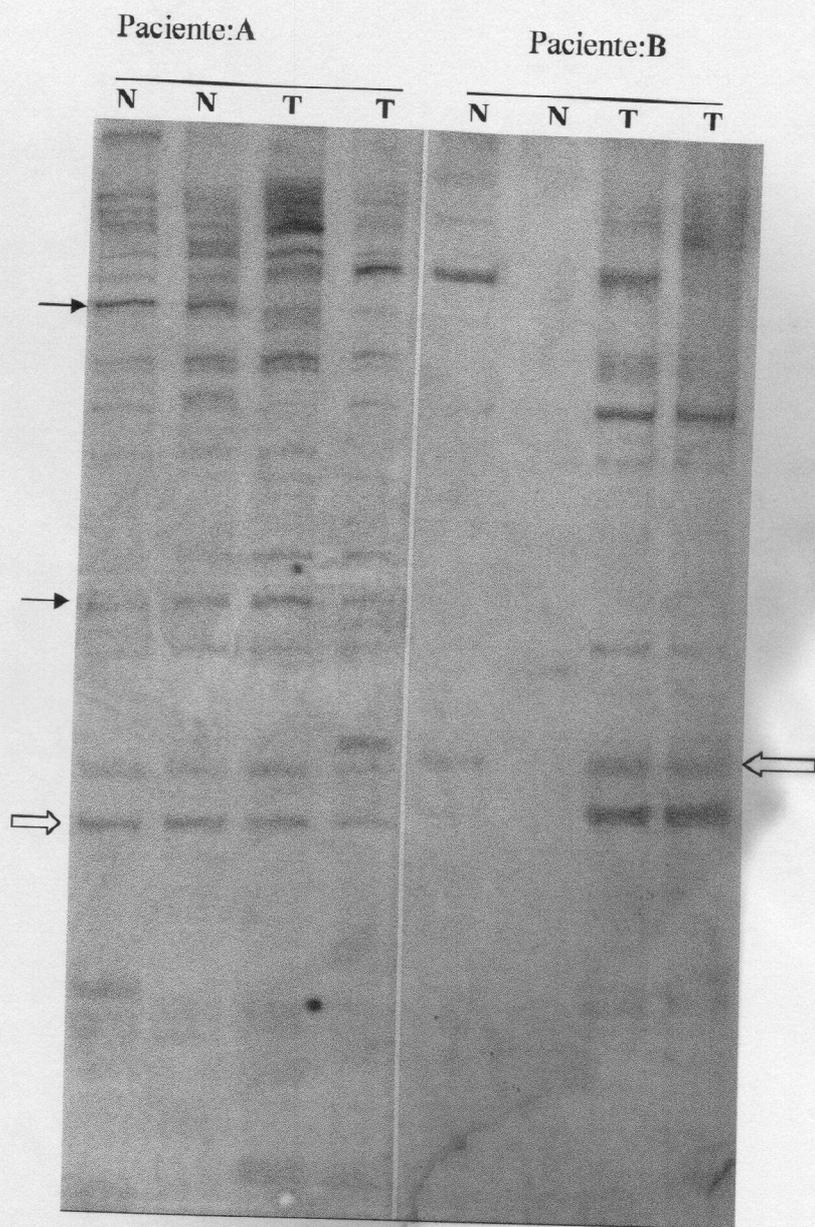


FIGURA 2: DDRT-PCR convencional.
Primers: OPA06 e T₁₂GA N: normal, T: tumoral
 ⇨ Bandas constitutivas em ambas pacientes
 → Bandas Paciente-específicas

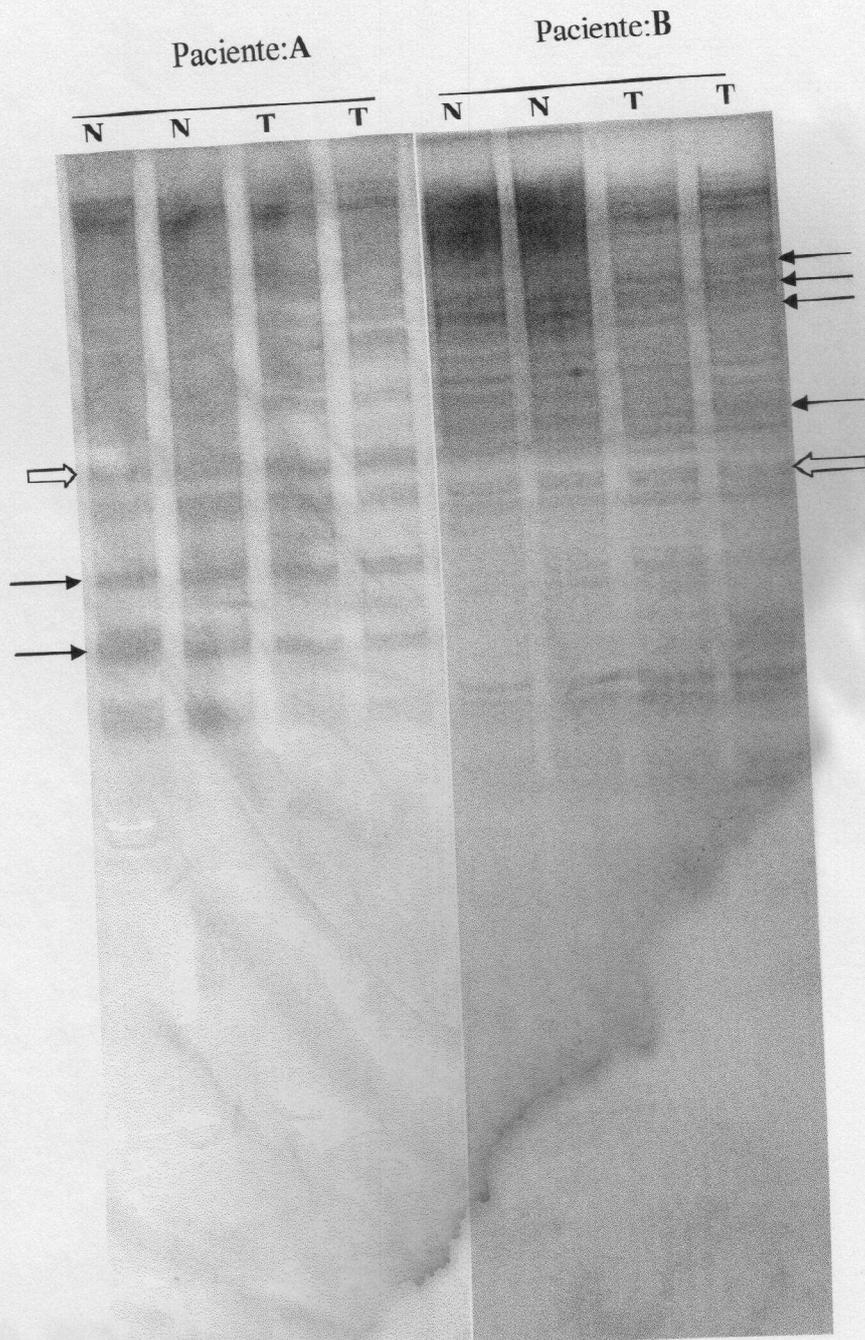


FIGURA 3: DDRT-PCR modificada. *Primer:*
 OPA06 N: normal, T: tumoral
 ⇨ Bandas constitutivas em ambas pacientes
 → Bandas Paciente-específicas

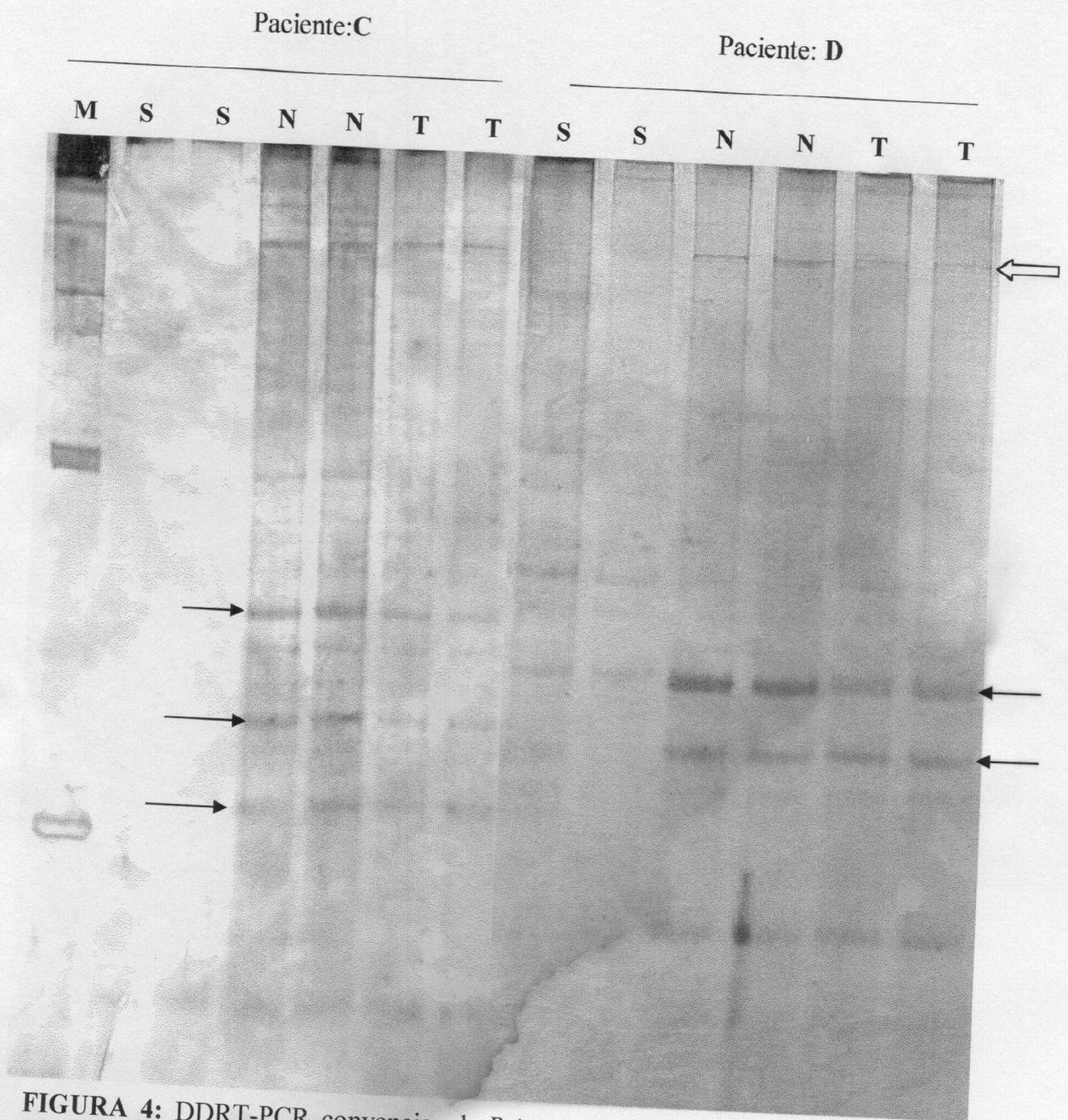


FIGURA 4: DDRT-PCR convencional. *Primers:* OPF04 e T₁₂CG. M: marcador 100 pb. S: sangue, N: normal, T: tumoral. As setas indicam ESTs diferencialmente expressas.

- ⇨ Bandas constitutivas em ambas pacientes
- Bandas Paciente-específicas

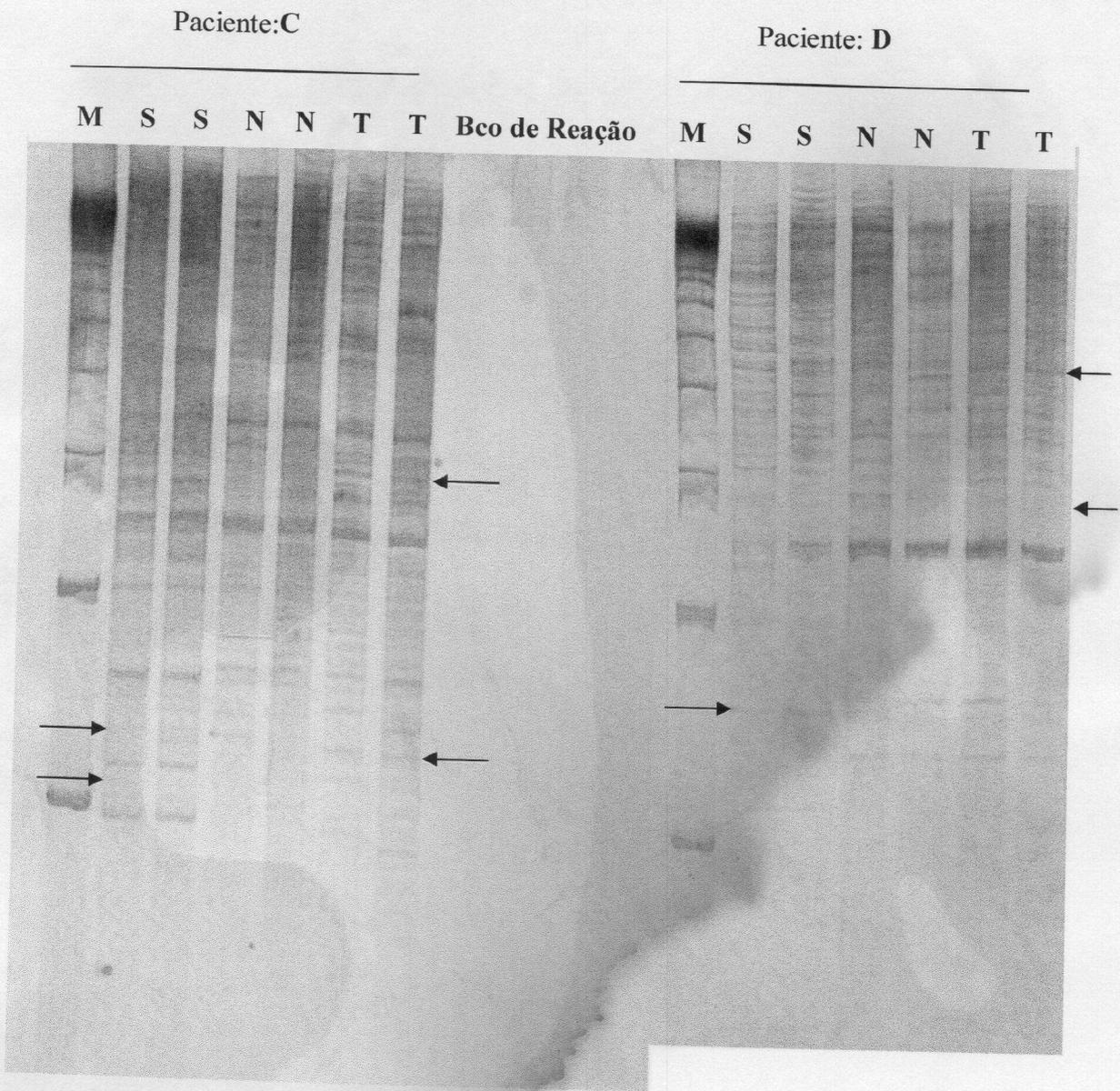


FIGURA 5: DDRT-PCR modificado. *Primer:* OPF04. **M:** marcador 100 pb. **Bco:** Branco de reação, **S:** sangue, **N:** normal, **T:** tumoral. As setas indicam ESTs diferencialmente expressas.

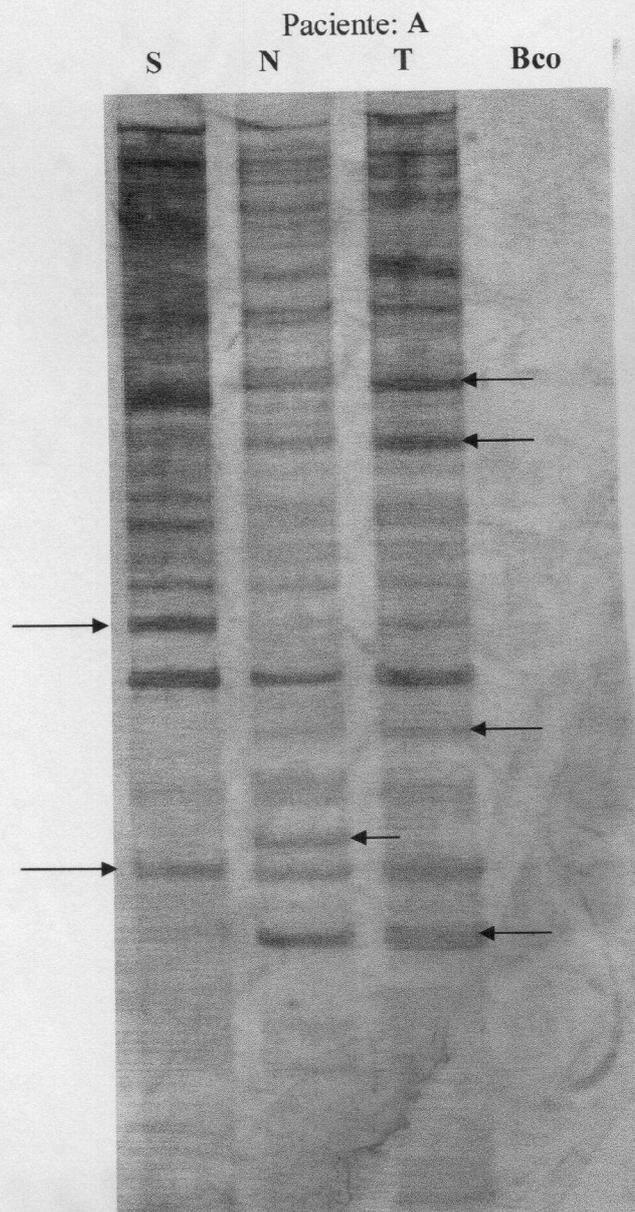


FIGURA 6: DDRT-PCR convencional
Primers: OPA06 e T₁₂GA
Bco: Branco da Reação, **S:** sangue, **N:** normal, **T:** tumoral.
 As setas indicam as ESTs diferencialmente expressas.

Paciente: A

OPA06

OPW08

N N T T N N T T

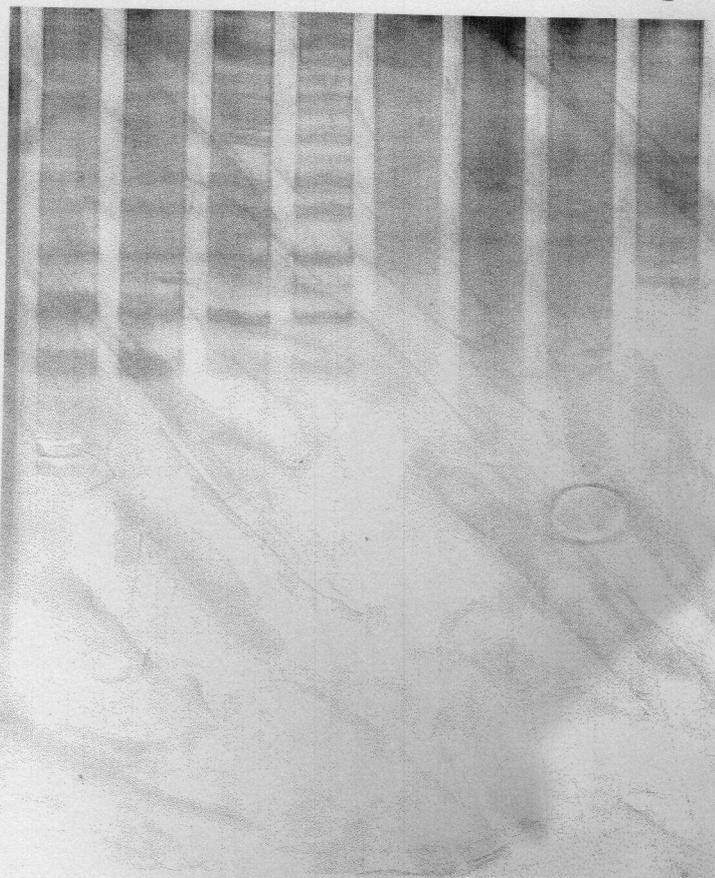


FIGURA 7 : DDRT-PCR modificada.
N: normal, T: tumoral.