



Evento	Salão UFRGS 2018: SIC - XXX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Padronização da técnica de MS-MLPA para análise simultânea do perfil de metilação de 25 genes supressores de tumor associados à carcinogênese mamária
Autor	LAÍS DAMASCENO
Orientador	RUBIA DENISE RUPPENTHAL

Padronização da técnica de MS-MLPA para análise simultânea do perfil de metilação de 25 genes supressores de tumor associados à carcinogênese mamária.

Laís Damasceno & Prof.ª Dr.ª Rúbia Denise Ruppenthal UFCSPA-UFRGS-HCPA

Introdução: O carcinoma mamário é um dos cânceres mais comuns em mulheres e apresenta vários subtipos, sendo, portanto, altamente heterogêneo. Por este fato é relevante clinicamente conhecer esses subtipos com a finalidade de se adequar o tratamento de acordo com a agressividade do carcinoma e associá-lo ao prognóstico do paciente. A metilação é resultado de uma desregulação do DNA, que ocorre epigeneticamente e pode estar correlacionada com os subtipos de carcinoma e sua severidade. O objetivo desta etapa do trabalho é padronizar as reações de *Methylation-Specific Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MS-MLPA) utilizando DNA controle (referência) para posterior aplicação do teste em amostras clínicas. **Metodologia:** Na padronização do MS-MLPA o kit comercial utilizado foi *Salsa® MLPA ME001-C2 Tumour Suppressor Mix 1 (MCR Holland, Amsterdam, Netherlands)*, que contém um total de 41 sondas específicas para 25 genes alvo (TP73, CASP8, VHL, RARB, MLH1, RASSF1, FHIT, APC, ESR1, CDKN2A, CDKN2B, DAPK1, CELF2, KLLM, CD44, GSTP1, ATM, CADM1, CDKN1B, CHFR, BRCA2, CDH13, H1C1, BRCA1, TIMP3). O DNA referência utilizado foi o *Human Genomic DNA Female (Promega Corporation, Madison, USA 100ug)*. Resumidamente, a MS-MLPA se baseia em 4 etapas e todas ocorrem em um termociclador: desnaturação (98°C, 5 min), hibridização (60°C, 20 h), ligação com ligase-65 seguida de digestão com endonuclease sensível à metilação *HhaI* (48°C, 30 min) e por fim, a amplificação pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na PCR, os fragmentos não digeridos (metilados) foram amplificados após 35 ciclos. A amostra foi submetida à eletroforese capilar (Genetic Analyzer AB 3500, Applied Biosystems) seguida de análise do eletroferograma e visualização dos picos que demonstram presença ou ausência de metilação do DNA dos 25 genes analisados. Para a padronização da MS-MLPA foram feitos 4 (quatro) testes sequenciais no qual foram sendo adicionadas variações em relação ao protocolo sugerido pelo fabricante: *teste 1*, adição de 15 ng/ul de DNA referência submetido ao protocolo MS-MLPA original sem modificações; *teste 2*, adição de 20 ng/ul de DNA que foi requantificado pós-diluição inicial e então submetido ao protocolo MS-MLPA; *teste 3*, condições estabelecidas no teste 2 com adição de medidas anti-evaporação das sondas; *teste 4*, mesmas condições do teste 3 com substituição da enzima DNA polimerase externa ao kit MS-MLPA original. **Resultados:** Foi possível padronizar a reação da MS-MLPA após a introdução das modificações aqui propostas ao protocolo original. O teste 4 resultou em um eletroferograma onde puderam ser observados fragmentos de DNA condizentes com os tamanhos esperado para os 25 locus analisados, na faixa de 136 à 484 pb. Foi possível observar a amplificação das 9 fragmentos controle com tamanho de amplificação menor que 120 pb: 4 fragmentos Q (DNA quantity, 64, 70, 76 e 82 pb), 3 fragmentos D (DNA desnaturation: 88, 92 e 96 pb), um fragmento X de 100 pb (marcador do cromossomo X) e ausência do fragmento Y. **Conclusão:** Foi possível padronizar a reação da MS-MLPA após a introdução das modificações aqui propostas no protocolo original. **Perspectivas:** determinação do perfil de metilação pela comparação dos resultados da MS-MLPA de amostras clínicas (carcinomas mamários) quando comparadas ao DNA referência.