

FORMAÇÃO DE BIOBANCOS DE DNA PARA ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL NA ESPÉCIE EQUINA

BASGALUPP, Suélen Porto¹; LUCAS, Caroline Gomes¹; LEON; Priscila Marques Moura de²; COLLARES, Tiago²;

SEIXAS, Fabiana Kolling¹

¹Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

²Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas
suelenbasgalupp@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Com os avanços na área da biotecnologia, através da genômica e proteômica, há uma grande necessidade de armazenar materiais biológicos, juntamente com informações clínicas e individuais. O armazenamento desses materiais biológicos de pacientes estabelece condições para que os mesmos possam se beneficiar de inovações tecnológicas e novos desenvolvimentos em medicina personalizada (1).

Pode-se definir um Biobanco de DNA como um centro de recursos biológicos, no qual são efetuados serviços especializados de coleta, armazenamento, processamento e distribuição de amostras biológicas sob condições exigidas para pesquisa (2). Para garantir a integridade e confiabilidade das amostras, torna-se necessário definir procedimentos para amostragem, transporte e armazenamento, além de procedimentos de biossegurança (3). Diversas são as aplicações de Biobancos de DNA, entre elas está a elucidação da patologia de doenças de interesse, o desenvolvimento de testes de diagnóstico precoce e identificação de marcadores moleculares de interesse terapêutico (4).

Embora o genoma da espécie equina seja conhecido, há uma carência de estudos nessa área (5). No entanto, o sequenciamento do genoma dessa espécie possibilitou o desenvolvimento de novas ferramentas que facilitam a análise de todo o genoma. Entre elas está a construção de um chip para a detecção de SNPs, o qual irá estabelecer as bases para vários estudos visando a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a biologia normal de equino e identificando fatores genéticos e sua relativa contribuição nas causas e na progressão de doenças (6).

Estudos recentes dedicados à genômica clínica buscam identificar os componentes genéticos e ambientais nas doenças multifatoriais, por meio de estudos de polimorfismos de DNA e de variações estruturais no genoma para identificar indivíduos com maior risco de desenvolver determinada doença (7). Estudos de expressão gênica buscam esclarecer o mecanismo molecular das doenças e para a obtenção de marcadores genômicos de diagnóstico, prognóstico e avaliação da resposta a agentes terapêuticos (8).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer Biobancos de DNA a partir de amostras de sangue e de tecido fixado em formol para estudos de Genômica Funcional aplicados à reprodução e oncologia da espécie equina.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Biobancos formados a partir de amostras de sangue

Foram coletadas amostras provenientes de sangue periférico de equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI). O sangue venoso foi coletado da jugular utilizando tubos vacutainer BD (Becton Dickinson UK limited, Oxfordshire, UK) contendo *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA). O processamento foi realizado dentro de 15 minutos. 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.

Biobancos formados a partir de amostras de tecido fixados em formol

Foram coletadas amostras de tecido a partir de biópsia dos sarcóides em equinos e fixadas em solução de formol tamponado 10%. Foi feito um pré-tratamento de tecidos fixados em formalina, no qual as amostras foram lavadas duas vezes em PBS para remover o fixante. Posteriormente o PBS foi removido e foi realizada a purificação de DNA total de tecidos animais (Protocolo Spin-Coluna). Foram realizados cortes de até 25mg de tecido em pequenos pedaços e colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5mL e após, adicionado 180µL de tampão Tissue Lysis Buffer (ATL). Em seguida, foi adicionado 20µL de proteinase K, os tecidos foram submetidos ao vortex e incubados a 56° C overnight para que fossem completamente lisados. As seguintes etapas do protocolo de extração do DNA foram realizadas conforme instruções do fabricante (DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen®). As amostras foram eluídas em 50µL. O material foi armazenado em ultrafreezer a – 80°C.

Quantificação das amostras de DNA

A quantificação do DNA das amostras dos dois grupos em estudo foi realizada através do espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, USA), utilizando um volume de 2µL de cada amostra, calculando a concentração e a qualidade das amostras através de software. O equipamento fez a leitura da quantidade de DNA em diferentes comprimentos de onda, sendo utilizada a razão de A260/A280 para estimativa da qualidade de cada amostra analisada.

Utilização das amostras no diagnóstico molecular

O número total de amostras coletadas a partir do sangue e do tecido de equinos foi utilizado na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene p53, com a finalidade de padronização da técnica molecular para utilização em estudos posteriores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram realizadas 187 extrações de DNA a partir de amostras de sangue provenientes de equinos da raça Puro Sangue Inglês e 32 extrações de DNA a partir de amostras de tecido provenientes de biópsias de sarcóides equinos encaminhadas ao Centro Regional de Diagnóstico – Patologia da Universidade Federal de Pelotas.

Nas amostras provenientes de sangue a quantificação média observada foi no valor de 45,34ng/ μ L, sendo a máxima de 178ng/ μ L e a mínima de -10,7ng/ μ L. Quanto à razão A260/A280, essas amostras apresentaram a média de 1,5, sendo a máxima de 4,474 e a mínima de 0,551.

Nas amostras coletadas a partir de biópsia dos sarcóides em equinos a quantificação média observada foi no valor de 88,19ng/ μ L, sendo a máxima de 362ng/ μ L e a mínima de 2,5ng/ μ L. Quanto à razão A260/A280, essas amostras apresentaram a média de 1,29, sendo a máxima de 1,933 e a mínima de 0,589.

Uma notável diferença entre os dois grupos analisados de Biobancos equinos está na quantidade de DNA utilizado para padronização da PCR para o gene alvo de amplificação, a p53. Em amostras extraídas do sangue de equinos foi necessária a utilização do volume de *template* igual a 1 μ L. Enquanto que para as amostras de DNA provenientes do Biobanco criado a partir de tecido fixado em formol foi necessária uma quantidade maior de DNA como *template*, sendo utilizado um volume de 10 μ L em cada reação de PCR.

A análise do genoma equino sofreu dramático progresso em pouco tempo. O mapeamento genético vem permitindo o isolamento de genes e marcadores associados a características economicamente importantes, como relacionadas à reprodução, ao desempenho atlético e à resistência ou susceptibilidade a doenças. Atualmente, o gene p53 vem sendo correlacionado com a ocorrência de sarcóides em equinos (9) e com a capacidade reprodutiva de éguas. Com relação ao desempenho atlético, destaca-se o gene PDK4 que está diretamente ligado ao fenótipo atlético (10). Um subconjunto de sarcóides equinos apresentam expressão perinuclear da p53, nos quais a função normal da proteína nuclear supressora de tumor é removida, resultando numa perturbação do equilíbrio do crescimento e morte celular (11). Estes estudos ressaltam a importância dos estudos de genômica funcional na espécie equina.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho obteve sucesso no estabelecimento de Biobancos de DNA da espécie equina. Estes Biobancos permitem a realização de estudos moleculares no Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDTec/Biotecnologia da UFPel. Este material biológico armazenado servirá de fonte para o aprofundamento das linhas de pesquisa em genômica funcional aplicada a reprodução e a oncologia na espécie equina.

5 REFERÊNCIAS

1. BAST, R. C., Jr., et al. Translational crossroads for biomarkers. **Clin.Cancer Res.** 11.17, 6103-8, 2005.
2. OOSTERHUIS, J.W.; COEBERGH, J.W.; VAN VEEN, E.B. Tumour banks: well-guarded treasures in the interest of patients. **Nature Reviews on Cancer**, v. 3, p.73-77, 2003.

3. SOMOZA, N.; TORÀ, M. Biological Safety in the Storage and Transport of Biological Specimens From Patients With Respiratory Diseases Used in Research Settings. **Arch Bronconeumol**, 45:187-95, 2009.
4. FORSTI, A.; HEMMINKI, K. Breast Cancer Genomics Based on Biobanks. **Methods in Molecular Biology**, v. 675, p. 375-385, 2011.
5. WADE, C. M.; GIULOTTO, E.; SIGURDSSON, S.; ZOLI, M.; GNERRE, S.; IMSLAND, F.; LEAR, T. L.; ADELSON, D. L.; BAILEY, E.; BELLONE, R. R.; BLOEKER, H.; DISTL, O.; EDGAR, R. C.; GARBER, M.; LEEB, T.; MAUCELI, E.; MACLEOD, J. N.; PENEDO, M. C. T.; RAISON, J. M.; SHARPE, T.; VOGEL, J.; ANDERSSON, L.; ANTCZAK, D. F.; BIAGI, T.; BINNS, M. M.; CHOWDHARY, B. P.; COLEMAN, S. J.; DELLA VALLE, G.; FRYC, S.; GUÉRIN, G.; HASEGAWA, T.; HILL, E. W.; JURKA, J.; KIALAINEN, A.; LINDGREN, G.; LIU, J.; MAGNANI, E.; MICKELSON, J. R.; MURRAY, J.; NERGADZE, S. G.; ONOFRIO, R.; PEDRONI, S.; PIRAS, M. F.; RAUDSEPP, T.; ROCCHI, M.; RØED, K. H.; RYDER, O. A.; SEARLE, S.; SKOW, L.; SWINBURNE, J. E.; SYVÄNEN, A. C.; TOZAKI, T.; VALBERG, S. J.; VAUDIN, M.; WHITE, J. R.; ZODY, M. C. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. **Science**, v. 326, p. 865- 867, 2009.
6. CHOWDHARY, B.P.; PARIA, N.; RAUDSEPP, T. Potential applications of equine genomics in dissecting diseases and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 208–218, 2008.
7. Cohen J. Genomics. DNA duplications and deletions help determine health. **Science**, 317(5843):1315-7, 2007.
8. DALTON, W.S.; FRIEND, S.H. Cancer biomarkers - an invitation to the table. **Science**, 312(5777):1165-8, 2006.
9. BOGAERT, L.; POUCKE, M. V.; BAERE, C.; DEWULF, J.; PEELMAN, L.; DUCATELLE, R.; GASTHUYS, F.; MARTENS, A. Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 2155–2161, 2007.
10. HILL, E. W.; GU, J.; MCGIVNEY, B. A.; MACHUGH, D. E. Target of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, v. 41 (Suppl. 2), p. 56–63, 2010.
11. NIXON, C.; CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.; CAMPO, M. S.; BURR, P.; ARGYLE, D. J.; REID, S. W. J.; NASIR, L. Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, CDK-2, p27 kip1 and p53 in equine sarcoids. **Cancer Lett**, v. 221, p. 237–245, 2005.