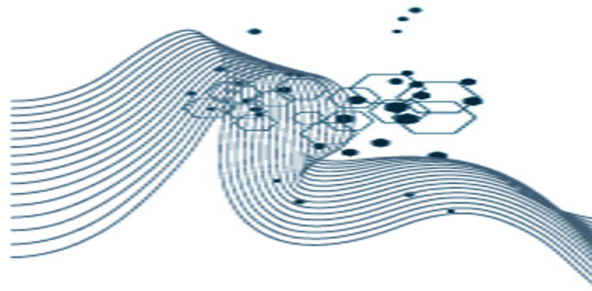


DNA Day



Preparado por Alexandre Teixeira, Andreia Neves, Astrid Moura Vicente, Luisa Romão, Marta Barreto

Sociedade Portuguesa de Genética Humana

Em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)



SPGH Sociedade Portuguesa de Genética Humana

Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge



Proposta de actividade

Medicina personalizada: como podemos determinar a segurança e eficácia de um tratamento farmacológico estudando o perfil genético de um indivíduo?

Protocolo experimental para determinação de variantes genéticas envolvidas na metabolização do anticoagulante oral Varfarina – Nível secundário

Introdução

O protocolo a seguir apresentado integra o conceito de Farmacogenética e propõe uma exemplificação de um método, usado em laboratório, que permite a obtenção de perfis genéticos. Neste caso em particular, de indivíduos que tomam Varfarina.

A Varfarina é o anticoagulante oral mais usado na prática clínica. É utilizada para prevenção e, nalguns casos, prevenção e tratamento, de trombozes, acidentes vasculares cerebrais (AVC) e enfartes do miocárdio.

A escolha da Varfarina para esta proposta de actividade baseou-se no facto deste ser um fármaco que necessita ser administrado na dose correcta para que os indivíduos que o tomam possam beneficiar da sua acção terapêutica sem que estejam sujeitos aos efeitos adversos que podem surgir se a dose administrada se revele excessiva, efeitos esses que se manifestam sob a forma de hemorragias.

Depois de administrada e absorvida no trato gastro-intestinal, a Varfarina é metabolizada por enzimas metabolizadoras de fármacos que pertencem ao citocromo P450. Estas enzimas são codificadas pelo gene CYP2C9 que possui várias variantes, das quais, duas estão envolvidas na metabolização da Varfarina (CYP2C9*2 e CYP2C9*3). Estas variantes são no fundo duas formas do mesmo gene e são denominadas SNPs, ou seja, resultam de uma alteração de um único nucleótido na sequência do DNA.

A presença destas variantes no genoma de indivíduos que tomam a Varfarina irá determinar a velocidade á qual a mesma será metabolizada.

A maioria dos indivíduos é designada *wild type*, ou seja, não possui variações no seu genoma. Este grupo de indivíduos metaboliza rapidamente a Varfarina e, por isso, necessitam de doses elevadas para poderem beneficiar do efeito da mesma. Outros, possuem variações no seu genoma, as quais se podem traduzir pela presença de uma ou mais variantes. Isto porque cada um de nós tem duas cópias de cada cromossoma e, conseqüentemente, de cada gene. Indivíduos que possuam duas variantes do gene CYP2C9 necessitam de doses reduzidas de

Varfarina, uma vez que metabolizam a mesma muito lentamente, evitando-se assim hemorragias devido à toxicidade provocada por excesso de fármaco no organismo. Existem ainda aqueles que possuem apenas uma variante. Estes indivíduos necessitam de doses intermédias ou referidas como doses normais de Varfarina, uma vez que metabolizam o fármaco a uma velocidade intermédia.

Deste modo, o conhecimento do perfil genético de cada indivíduo permite personalizar a terapia com Varfarina, adequando a dosagem às características genéticas de cada um.

Procedimento

Parte 1 - Isolamento de DNA a partir de células da mucosa bucal

Objectivo: obtenção de células para extracção de DNA e posterior amplificação por PCR da região polimórfica *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*.

Objectivo: extracção de DNA genómico

Procedimento: (Todo este procedimento poderá ser realizado pelo monitor utilizando um kit para extracção de DNA de saliva – Oragene DNA)

1. Utilizar o cotonete fornecido pelo kit para preparar um esfregaço bucal;
2. Misturar esta amostra de células da mucosa bucal com a solução do kit no tubo fornecido pelo kit invertendo-o várias vezes;
3. Incubar a amostra a 50°C num banho durante pelo menos 1 hora ou numa estufa durante pelo menos 2 horas;
4. Transferir 500ul da mistura Oragene DNA kit/saliva para um tubo eppendorf de 1.5 ml;
5. Adicionar 20ul de Oragene DNA purifier ao tubo anterior e vortexar durante alguns segundos;
6. Incubar o tubo no gelo durante 10 minutos;
7. Centrifugar o tubo à temperatura ambiente durante 5 minutos a 13.000 rpm;

8. Transferir cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur para um novo tubo eppendorf. Deitar fora o pellet que contém detritos celulares;
9. A 500ul de sobrenadante, adicionar 500ul de etanol a 95-100%. Inverter gentilmente o tubo 10 vezes;
10. Deixar a amostra repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir a precipitação do DNA;
11. Centrifugar o tubo à temperatura ambiente durante 2 minutos a 13.000rpm;
12. Remover cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta e descartá-lo. Cuidado para não remover o pellet que contém o DNA;
13. Lavagem com etanol: Adicionar cuidadosamente 250 ul de etanol a 70%. Deixar repousar à temperatura ambiente durante 1 minuto e finalmente remover o etanol sem tocar no pellet.
14. Adicionar 100ul de H₂O para dissolver o DNA. Vortexar pelo menos durante 5 segundos.

Esta solução de DNA pode ser usada imediatamente ou guardada a 4° C durante um mês.

Parte-2 Amplificação da região polimórfica *CYP2C9*2* ou *CYP2C9*3* por PCR e sua digestão com enzimas de restrição.

Objectivo: análise do polimorfismo *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3* por reacção de PCR e posterior digestão com enzimas de restrição

Com o objectivo de genotipar as sequências *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*, foram desenhados primers específicos para a região do cromossoma que flanqueia o local de inserção destes SNPs:

Primer forward *CYP2C9*2*: 5'-TGCACGAGGTCCAGAGGTAC-3'

Primer reverse *CYP2C9*2*: 5'-ACAACTTACCTTGGGAATGAGA-3'

E

Primer forward *CYP2C9*3*: 5'-GTATTTTGGCCTGAAACCCATA-3'

Primer reverse *CYP2C9*3*: 5'-GGCCTTGGTTTTTCTCAACTC-3'

Estes primers vão ser utilizados numa reacção de PCR usando como molde o DNA das células da mucosa bucal.

Procedimento:

1. Identifique os vários microtubos contendo DNA dos alunos, outro para o controlo negativo. Pipete os seguintes reagentes, substituindo o DNA genómico por H₂O no controlo negativo:

Reagentes	CYP2C9*2 e CYP2C9*3(µl)
H ₂ O	15.8
Tampão 10x	2.5
MgCl ₂	1.5
dNTPs 10pmol	1
Primer forward 10 pmol	1.0
Primer reverse 10 pmol	1.0
Taq DNA polimerase 5U/µl	0.2
DNA	2.0
Volume final	25.0 µl

2. Coloque os microtubos no termociclador e inicie o programa de PCR com as condições que se seguem:

CYP2C9*2

Desnaturação inicial – 5 minutos a 95° C

Desnaturação – 30 segundos a 95° C

Annealing –30 segundos a 60° C

Extensão – 30 segundos a 72° C

} x 35 ciclos

CYP2C9*3

Desnaturação inicial – 5 minutos a 95° C

Desnaturação – 30 segundos a 95° C

Annealing –30 segundos a 58° C x 35 ciclos

Extensão – 30 segundos a 72° C

3. Digestão do DNA amplificado com enzimas de restrição

Preparar a solução de enzima *AvaII* para digestão do produto de PCR da região CYP2C9*2 num tubo eppendorf (para um volume final de 20ul):

7.5 ul H₂O

10ul da mistura de PCR obtida

2ul Tampão da enzima 10x concentrado

0.5 ul enzima *AvaII*

Incubar durante 2 horas a 37°C.

Preparar a solução de enzima *NciI* para digestão do produto de PCR da região CYP2C9*3 num tubo eppendorf (para um volume final de 20ul):

7.5 ul H₂O

10ul da mistura de PCR obtida

2 ul Tampão da enzima 10x concentrado

0.5 ul enzima *NciI*

Incubar durante 2 horas a 37°C.

4. No final da reacção as amostras devem ser armazenadas a -20° C.

Parte-3 Preparação do gel de electroforese

Objectivo: preparação de um gel de agarose a 3 %

Atenção:

Nesta aula, há o uso de um composto, o **brometo de etídio**, que, por se intercalar entre as bases do DNA **possui efeitos mutagénicos e carcinogénicos comprovados**. Portanto, cumpra sempre as seguintes regras de segurança:

- use sempre luvas ao manipular soluções com brometo de etídio ou géis corados
- limite o uso de brometo de etídio a uma área restrita da bancada
- depois de usadas, deite as soluções, luvas e géis corados para recipientes próprios para posterior incineração
- Só os monitores é que deverão manusear estes compostos

Note que, quando correctamente manipulada a concentração de brometo de etídio usada no gel para corar DNA envolve um risco mínimo

Procedimento: (Só os monitores é que deverão realizar este procedimento, o qual deverá ser feito previamente)

1. Coloque 3 g de agarose num frasco com 100 ml de tampão TBE. Rolhe parcialmente o frasco e aqueça a solução no microondas até à sua completa dissolução.
2. Arrefeça a solução de agarose até à temperatura de ~60° C e adicione 2.5 µl da solução stock de brometo de etídeo (10 mg/ml).
3. Verta a agarose no molde e coloque o pente.
4. Quando o gel estiver solidificado, retire o pente e envolva o gel em película aderente. Armazene a 4° C.

Parte 4 – Análise dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose.

Objectivo: separação por electroforese dos produtos de PCR e determinação dos vários génotipos para os polimorfismos *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*.

Procedimento: (Este procedimento poderá ser simulado na aula tendo os géis já feitos e carregando nestes amostras de DNA previamente preparadas)

1. Elabore um esquema com a ordem de colocação das amostras no gel. Poderá ou não usar-se um marcador de massa molecular para distinção do tamanho das bandas. Como exemplo temos o marcador DNA 100bp ladder. (ver figura)
2. 3. Coloque o gel na tina. Os poços ficam sempre junto ao pólo negativo (cátodo). Adicione

tampão **TAE** até cobrir o gel. Certifique-se que os poços estão completamente submersos e livres de bolhas de ar.

Nota: A razão pela qual os poços ficam sempre junto ao pólo negativo é devido a que os ácidos nucleicos estão carregados negativamente, assim irão migrar para o pólo positivo, ou seja para o lado oposto ao cátodo (princípio pela qual se baseia a electroforese).

Atenção, tampão em excesso conduz a corrente por cima do gel e retarda a separação do DNA.

3. Adicione 5µl de corante de electroforese a cada um dos microtubos anteriores.

4. Aplique 10µl do marcador e 20µl das amostras no gel. Aplique as amostras no gel de acordo com o esquema preparado: segure a pipeta com firmeza, remova todo o ar presente na ponta (ao expelir uma bolha de ar a amostra sai fora do poço e perde-se ou contamina os outros poços), introduza a ponta da pipeta no poço e verta a amostra com cuidado. Deve ver a amostra corada depositar-se no fundo do poço.

Cuidados a observar: **não** perfurar o fundo do poço; **não** aspirar o líquido do poço.

5. Tape a tina de electroforese e ligue os eléctrodos a uma fonte de alimentação. Atenção às cores dos cabos de ligação: ligue vermelho a vermelho (ânodo) e preto a preto (cátodo)

6. Ligue a fonte e regule a tensão para **100 volts**. Deve obter valores de intensidade de corrente da ordem dos 50-100 miliamperes. Deixe a electroforese decorrer durante cerca de **45 min**, vigiando periodicamente a frente de migração.

7. No final da electroforese desligue a fonte. Atenção: **nunca retire a tampa da tina com a corrente ligada!!** Com luvas, remova o gel e observe-o no transiluminador (tirar uma foto)

Atenção: a luz UV pode danificar a retina - use sempre óculos de protecção, ou simplesmente um vidro, que filtra os raios UV !!

8. Determine o genótipo de cada indivíduo analisado para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3..

Para tal o monitor deverá ter uma foto de um gel já analisado anteriormente e com os alunos determinar a dosagem de varfarina a administrar hipoteticamente em cada aluno.

100bp ladder

Exemplo do Gel para os polimorfismos

