

GENOTIPAGEM E ANÁLISE EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DO GENE DA p53 EM TUMORES DE CÉLULAS DA GRANULOSA (TCG) DE EQUINOS

BJÖRKNESJÖ, Stéphanie Caruccio; OLIVEIRA, Ruan; HAAS, Cristina Sangoi; LEON, Priscila Marques Moura de; CAMPOS, Vinícius Farias; SEIXAS, Fabiana Kömmling,

COLLARES, Tiago

Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

Os ovários correspondem a órgãos endócrinos desenvolvidos a partir da gônada bipotente. Estão diretamente relacionados com a produção de esteróides sexuais, fatores de crescimento, além de fatores de transcrição e citocinas que amparam à sinalização de vias complexas aos processos de formação, crescimento e maturação folicular (Havelock *et al.*, 2004). Ao redor do oócito encontram-se as células da granulosa, responsáveis pela conversão de andrógenos a estrógenos (Havelock *et al.*, 2004). Tal linhagem celular promove também, além da secreção de pequenas quantidades de progesterona, a síntese de inibina (Bailey *et al.*, 2002).

Em equinos, o tumor de células da granulosa (TCG) equivale à neoplasia mais freqüente de ovário (McCue *et al.*, 2006; Assis Neto *et al.*, 2010) representando cerca de 5,6% de todas as ocorrências tumorais nesta espécie (Prestes *et al.*, 2001). O TCG tem origem no estroma ovariano especializado, sendo considerado como tumor de estroma dos cordões sexuais (McCue *et al.*, 2006). Este tipo de neoplasia, geralmente benigna, ocorre de forma unilateral, inibindo o crescimento e atividade do ovário contralateral, fato este justificado pela alta secreção de inibina pelo ovário neoplásico (Bailey *et al.*, 2002). Esta glicoproteína encontra-se em concentrações elevadas em aproximadamente 90% dos tumores de células da granulosa em equinos (Ellenberger *et al.*, 2007).

Éguas com TCG podem manifestar estro prolongado, ciclos irregulares, ninfomania, anestro, ou comportamento masculinizado (Assis Neto *et al.*, 2010). Para diagnóstico da disfunção, deve ser efetuado juntamente com a análise do comportamento do animal, o levantamento do histórico reprodutivo e a palpação retal. A confirmação deve ser realizada por exames complementares de dosagem hormonal, ou por meio de biópsia com teste histopatológico, citologia aspirativa ou ultra-sonografia. O tratamento indicado equivale à ovariectomia (Prestes *et al.*, 2001; McCue *et al.*, 2006)

Em 50% dos cânceres avançados de ovário humano, encontram-se formas mutadas da p53, proteína de 53 kDa que atua como importante fator de transcrição em pontos chave do ciclo celular (Psyrris *et al.*, 2007). Diferentes expressões gênicas da mesma foram identificadas em tecidos com a devida neoplasia e relacionadas a índices específicos de progressão tumoral (Psyrris *et al.*, 2007). A proteína p53, portanto, além de constituir um marcador importante ao

prognóstico de tumores humanos, também é utilizada como um alvo potencial a diversos estudos moleculares em equinos.

O presente trabalho teve como objetivo descrever três casos de tumor de células da granulosa, analisando a expressão do gene TP53 e a presença de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no códon 72 deste. Para tanto, realizaram-se estudos sobre a expressão da proteína p53, em tecidos de ovários equinos previamente estabelecidos como positivos e negativos para o tumor de granulosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Ovários equinos anormais foram obtidos em abatedouro local durante a coleta de material para as pesquisas em andamento no laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese da Universidade Federal de Pelotas. A procedência e o histórico das éguas são desconhecidos e apenas foi observado que estas apresentavam condições corporais normais, sem quaisquer alterações macroscópicas. Imediatamente coletou-se material dos ovários afetados, juntamente de seus pares contralaterais, para extração de DNA e RNA, bem como fixação para histopatologia. Amostras das três estruturas, supostamente tumorais, foram coletadas e identificadas aleatoriamente como T1, T2 e T3. Partes de seus respectivos ovários contralaterais também foram removidas e identificadas como N1, N2 e N3.

Após a análise macroscópica dos ovários anormais e de seus pares, fragmentos de 1cm³ foram fixados em formalina 4%, com objetivo de preservar os tecidos às análises histopatológicas. Para a confecção das lâminas, os fragmentos foram embebidos com parafina, fatiados em 3µm de diâmetro e corados com hematoxilina eosina (HE). A caracterização se deu por visualização em microscópio óptico nos aumentos de 40 a 100 vezes.

Posteriormente, realizou-se a extração de DNA dos tecidos em questão pelo Kit Dneasy TissueKit QIAGEN®, segundo indicações do fabricante. Para promover a amplificação do gene TP53, aplicou-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), baseada na utilização de *primers*, previamente desenhados pelo programa Vector NTI 11 (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Tais primers amplificam a região do éxon 4, na qual o códon 72 está contido. O produto foi corado com GelRed™ (Biotium Inc., CA) e encaminhado à eletroforese em gel de agarose 1% para a confirmação dos resultados esperados.

Na genotipagem do gene TP53, foi utilizado 12µl do produto amplificado por PCR. O reconhecimento e a clivagem das regiões CGC, presentes no códon 72 do éxon 4 do TP53, foram estabelecidos através da digestão enzimática com BstUI, realizada a uma temperatura de 60° C por 2h e 30 min. A visualização dos genótipos pôde ser efetuada após eletroforese em gel de agarose 2,5%, através da coloração emitida por GelRed™ à luz ultravioleta.

A extração de RNA das seis amostras identificadas foi estabelecida segundo protocolo proposto utilizando Reagente TRIzol® (Invitrogen®, USA). O RNA extraído foi quantificado através do sistema Qubit™ (Invitrogen, USA) e, então, padronizado. Por conseguinte, confeccionou-se o cDNA por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, USA), segundo instruções do fabricante.

O cDNA sintetizado passou a ser utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para a realização desta técnica, foi utilizado o kit SYBR Green Platinum (Invitrogen, USA) e de *primers* para os genes TP53 e GAPDH. O gene GAPDH, codificante para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foi utilizado como normalizador do processo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observou-se, que todos os ovários, previamente diagnosticados como tumorais, estavam aumentados de tamanho. O par contralateral dos mesmos apresentava-se bem diminuído e com ausência de folículos antrais e corpo lúteo, fato característico de acíclicos. Após o corte das estruturas neoplásicas, reconheceu-se o endurecimento das mesmas e percebeu-se a presença de um tecido fibroso de cor amarelada, com pequenas áreas esbranquiçadas e pontos hemorrágicos.

As amostras T1 e T2 não apresentavam folículos e mediam aproximadamente de 9 a 10 cm de diâmetro. A amostra T3, porém, apresentava folículos internos e diâmetro em torno de 7 cm. Através de punção folicular, foram realizadas tentativas de obtenção de oócitos, os quais não foram encontrados.

A histopatologia indicou a presença de tumor de células da granulosa com padrão microfolicular. As amostras T1 e T2 apresentavam um padrão sólido, já a amostra T3 destacava-se das demais por seu padrão multicístico. A histologia exibia organização celular tubular, semelhante ao padrão das células de Sertoli testiculares. Várias células com padrão característico bipartido foram encontradas.

Após a realização da PCR foi constatado, através dos resultados da eletroforese em gel de agarose 1%, que todas as amostras haviam amplificado o produto esperado de 199pb, correspondente ao gene TP53. Os resultados da genotipagem por RFLP indicaram que os três animais apresentavam heterozigose para o *SNP* do códon 72 do mesmo gene.

Quanto à expressão gênica da p53, não foram observados resultados significativos entre as expressões dos ovários tumorais e contralaterais ($P = 0,98$). Os resultados do qRT-PCR estão representados na Figura 1.

Expressão Comparativa do Gene TP53 em Ovários Equinos Normais e Tumorais

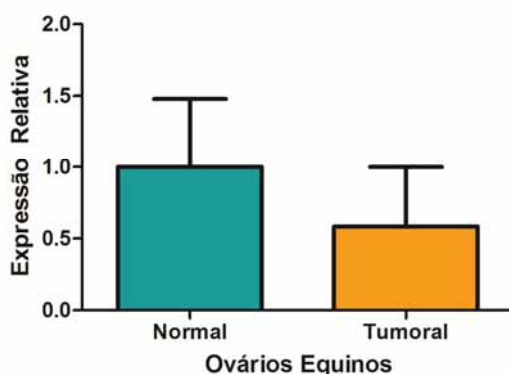


Figura 1 - Expressão Comparativa do Gene TP53 em Ovários Equinos Normais e Tumorais

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, a genotipagem dos ovários tumorais, juntamente com seus respectivos pares contralaterais, demonstrou o mesmo genótipo no SNP presente no códon 72 do gene TP53. Este dado ressalta que a neoplasia apresentada possui outra fonte de mutação, diferente da região analisada.

A expressão gênica da p53 também não demonstrou diferenças significativas quando comparada ao controle, o gene GAPDH. Tal resultado impossibilitou o estabelecimento de uma relação entre os índices de p53 como causa do tumor de células da granulosa em éguas. Assim, estudos posteriores necessitam ser realizados, visando inferir acerca de outros genes envolvidos no processo de tumorigênese, sendo que a avaliação em um número maior de amostras deva ser considerado.

5. REFERÊNCIAS

ASSIS NETO, A.C; BALL, B.A.; BROWNE, P.; CONLEY, A.J. Cellular localization of androgen synthesis in equine granulosa-theca cell tumors: Immunohistochemical expression of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450. **Theriogenology**, v. 74, p. 393–401, 2010.

BAILEY, M.T.; TROEDSSON, M.H.T; WHEATON, J.E. Inhibin concentrations in mares with granulosa cells tumor. **Theriogenology**, v.57, p. 1885-1895, 2002.

ELLENBERGER, C.; BARTMANN, C.P.; HOPPENY, H.O.; KRATZSCH, J.; AUPPERLE, H.; KLUG, E.K. Histomorphological and Immunohistochemical Characterization of Equine Granulosa Cell Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, p.167-176, 2007.

HAVELOCK, J.C.; RAINEY, W.E.; CARR, B.R. Ovarian granulosa cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 67-78, 2004.

MCCUE, P.M.; ROSER, J.F.; MUNRO, C.J.; LIU I.K.M.; LASLEY Bill L. Granulosa Cell Tumors of the Equine Ovary. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, p.799–817, 2006.

PRESTES, N.C.; ALVARENGA, M.A.; BANDARRA, E.P.; SUZANE S.M.C.; CRUZ, M.L. Tumor ovariano das células da granulosa em vaca Simental- relato de caso. **Continuous Education Journal**, v.4, p. 28-32, 2001.

PSYRRI, A; KOUNTOURAKIS, Z.; YU, Z.; PAPADIMITRIOU, C; MARKAKIS, S.; CAMP, R. L; ECONOPOULOS, T; DIMOPOULOS M.A. Analysis of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. **Annals of Oncology**, v.18, p.709–715, 2007.