

## **Avaliação da qualidade do DNA obtido a partir de material tumoral emblocado em parafina de pacientes com câncer colorretal**

<sup>1</sup> Francisca Ladyssa Lima Moura; <sup>2</sup> Thuany Pinto Rocha de Souza; <sup>3</sup> Felipe Souza da Silva; <sup>4</sup> Maria Elena Nobre Soares; <sup>5</sup> Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes

<sup>1</sup> Graduanda em Enfermagem pela Faculdade Rodolfo Teófilo; <sup>2</sup> Graduanda em Enfermagem pela Faculdade Rodolfo Teófilo; <sup>3</sup> Graduando em Enfermagem pela Faculdade Rodolfo Teófilo;

<sup>4</sup> Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Ceará e

<sup>5</sup> Doutora em Microbiologia Médica pela Universidade Federal do Ceará

**Área temática: Temas transversais**

**Modalidade: Pôster Simples**

**E-mail do autor: ladyssalm@icloud.com**

### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** Sabe-se o quão importante são as amostras de DNA para avaliação de tecido tumoral. Tendo em vista que através da sua integridade pode-se ter bons resultados para análises de mutações gênicas. **OBJETIVO:** Avaliar a qualidade do DNA obtido a partir de material tumoral emblocado em parafina de pacientes com câncer colorretal. **MÉTODOS:** A população alvo foi composta por 132 pacientes com câncer colorretal admitidos para tratamento oncológico no Hospital Haroldo Juaçaba. O estudo foi realizado no setor de patologia do Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), onde foram analisadas as informações dos laudos anatomopatológicos, revisão de prontuários físicos e eletrônicos e revisão de lâminas histológicas para demarcação da área tumoral. **RESULTADOS:** Na seguinte pesquisa ficou evidenciado que dos 132 pacientes identificados como portadores de algum tipo de câncer colorretal, observou-se que foi possível obter DNA viável para análise somente de 56 amostras. **CONCLUSÃO:** Foi relatado que a absorção de DNA depende do solvente usado. As soluções ácidas representarão a proporção de 260/280 em 0,2 a 0,3, enquanto uma solução básica representará a proporção em 0,3. Portanto, se comparar a proporção 260/280 para diferentes amostras de DNA.

**Palavras-chave:** Ácidos Nucleicos Livres, Neoplasias Colorretais, Câncer Colorretal.

### **1 INTRODUÇÃO**

Para o Brasil, estimam-se, para cada ano do triênio de 2020-2022, 20.520 casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19,63 casos novos a cada 100 mil homens e

19,03 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2021). A incidência é maior na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento aumentam a partir dos 40 anos.

O câncer colorretal está entre o terceiro tumor com maior frequência nos países desenvolvidos, possuindo importante componente genético. Segundo os dados do INCA (2021) a taxa de mortalidade se encontra como a segunda maior, portanto cerca de 39% dos casos de CCR situam-se no reto.

Os fatores prognósticos do câncer colorretal possuem múltiplas variáveis que podem intercalar com o estado clínico da doença. A análise e o mapeamento do genoma humano em conjunto ao

desenvolvimento de técnicas moleculares permitem que sejam feitas análises genômicas, tendo em vista que o câncer advém de mutações gênicas (LOSSO, et al., 2012).

A instabilidade de microssatélites (MSI) possui como definição a alteração do sequenciamento repetitivo do DNA, quando a extração de células em determinados tumores ocorre pode-se observar que esse sequenciamento apresenta alterações no número de unidades repetidas que pode suceder em um ou mais microssatélites (LOSSO, et al., 2012).

A correção para determinadas alterações acontece através de algumas proteínas com função de realizar reparos, pois, o DNA está sempre sofrendo modificações, portanto esse reparo tem como principal função manter a integridade do DNA. Essas proteínas são produzidas a partir de genes conhecidos como MMR (PINHO, 2002).

Nestes tumores, a deficiência nas enzimas de reparo da via de mal pareamento (MMR), tais como MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, resulta em um fenótipo conhecido como instabilidade de microssatélites (MSI). MSI é reconhecida como uma das principais vias carcinogênicas do câncer colorretal, tumor que pode fazer parte da síndrome de Lynch (LS). A identificação do MSI no câncer colorretal é importante, pois o MSI pode servir como uma ferramenta de triagem para detectar LS, um marcador prognóstico para o desfecho do paciente e um marcador preditivo para a resposta à quimioterapia e à imunoterapia (DE' ANGELIS et al., 2018).

O complexo MMR é responsável por reconhecimento e correção de diversos erros de pareamento de bases nitrogenadas do DNA e a ausência de alguma dessas proteínas interfere nessa correção aumentando significativamente a predisposição ao câncer em decorrência do estabelecimento de instabilidade microssatélite (SINICROPE, 2019). Tal deficiência pode ser decorrência de mutações gênicas inativadoras da expressão das proteínas de reparo. Nesse sentido, os dados de imunohistoquímica merecem ser correlacionados com a presença de mutações em genes de reparo de DNA que afetem a sua expressão (BLUME-JENSEN et al., 2015).

Deficiência ou inativação de uma ou mais vias de reparo levam ao aparecimento de novos alelos que não estão presentes no DNA normal, sendo chamado “fenótipo de instabilidade de microssatélites” (“fenótipo MSI”) ou “fenótipo de erro de replicação”. Microssatélites são pequenas sequências de repetições sucessivas dispersas pelo genoma de mamíferos. As unidades de repetição variam de 1 a 4pb de tamanho e a sequência inteira de uma repetição típica é menor do que 100pb de comprimento (BOWCOCK et al., 1993; JIAN-HUA et al., 2005).

## 2 MÉTODO

### Casuística

A população alvo foi composta por 132 pacientes com câncer colorretal admitidos para tratamento oncológico no Hospital Haroldo Juaçaba. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob número de protocolo: CAAE 74549317.0.0000

### Local de Estudo

O estudo foi realizado no setor de patologia do Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), onde foram analisadas as informações dos laudos anatomopatológicos, revisão de prontuários físicos e eletrônicos e revisão de lâminas histológicas para demarcação da área tumoral. A partir destas demarcações, foram realizadas as extrações de DNA, utilizando a amostra biológica oriunda da área tumoral.

Na sequência o DNA foi extraído a partir de cortes dos tecidos fixados em formalina e conservados em parafina (FFPET), de acordo com instruções do kit Cobas DNA Sample Preparation.

Extração de DNA. (Tumoral).

As amostras de tecido tumoral (resultantes de biopsia, ou mastectomia) fixadas em parafina (FFPE – Formalin-fixed paraffin embedded) foram feitos cortes histológicos com 5µm de espessura para confeccionar lâminas histológicas. O DNA será extraído a partir das células fixadas. As lâminas foram primeiramente desparafinizadas em Xilol e álcool e o DNA foi extraído usando o Kit de Extração de DNA de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras de tecido tumoral (resultantes de biopsia, ou mastectomia) fixadas em parafina (FFPE – Formalin-fixed paraffin embedded) foram feitos cortes histológicos com 5µm de espessura para confeccionar lâminas histológicas. O DNA será extraído a partir das células fixadas. As lâminas foram primeiramente desparafinizadas em Xilol e álcool e o DNA foi extraído usando o Kit de Extração de DNA de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 132 pacientes identificados como portadores de algum tipo de câncer colorretal, observou-se que foi possível obter DNA viável para análise somente de 56 amostras.

A medição de RNA é conduzida medindo a absorção ultravioleta a 260 nm e 280 nm. O cálculo da concentração de RNA é baseado na absorbância a 260 nm. Além disso, a pureza do RNA é julgada como a proporção de 260 nm/280 nm e uma baixa proporção indica contaminação por proteína. (Okamoto T, Okabe S.)

Antes de usar amostras de DNA em técnicas analíticas, a qualidade e a usabilidade devem ser determinadas por meio de indicadores de qualidade de DNA, que incluem pureza e integridade do DNA. A proporção de absorção a 260 e 280 nm é usada para avaliar a pureza do DNA.<sup>3</sup> Uma proporção de ~1,8 é geralmente aceita como “pura” para o DNA.<sup>4</sup> Se a proporção for consideravelmente menor ( $\leq 1,6$ ), pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente a ou perto de 280 nm. Pelo contrário, como as leituras de absorção não podem discriminar entre DNA e RNA, a presença de RNA pode levar ao aumento da proporção e essa possibilidade deve ser considerada para evitar a quantificação excessiva do DNA. (Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R.)

### 4 CONCLUSÃO

Foi relatado que a absorção de DNA depende do solvente usado. As soluções ácidas representarão a proporção de 260/280 em 0,2 a 0,3, enquanto uma solução básica representará a proporção em 0,3. Portanto, se comparar a proporção 260/280 para diferentes amostras de DNA, é importante garantir que o pH e a força iônica dos tampões de eluição usados sejam os mesmos. Além disso, a absorbância a 260 nm e os valores de 260/280 são reprodutíveis quando o tampão de baixo teor de sal é usado como tampão de eluição, mas não água. (Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. Seleção.)

É de suma importância citar que o DNA pode se fragmentar, pode ocorrer também uma necrose, dificultando então a qualidade desse DNA, assim como um bom pré analítico pode auxiliar na qualidade desse DNA, antes de emblocado o material, um formol tamponado também insere-se na qualidade, lembrando que estes materiais emblocados foram recebidos pela primeira vez em 2008, portanto é um material cujo tempo já está transpassado.

A quantidade e a qualidade desse DNA ficam comprometidos, devido ao tempo de armazenamento do tumor emblocado em parafina, logo a qualidade e a quantidade ficam reduzidas e comprometidas, o que impacta nas análises genéticas, muitas das vezes até inviabilizando essas análises.

## REFERÊNCIAS

ARONSON M, HOLTER S, SEMOTIUK K, WINTER L, POLLETT A, GALLINGER S, COHEN Z, GRYFE R. DNA Mismatch Repair Status Predicts Need for Future Colorectal Surgery for Metachronous Neoplasms in Young Individuals Undergoing Colorectal Cancer Resection. *Dis Colon Rectum*. 2015 Jul;58(7):645-52. doi: 10.1097/DCR.0000000000000391. PMID: 26200678.

BOLAND PM, YURGELUN MB, BOLAND CR. Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes. *CA Cancer J Clin*. 2018 May;68(3):217-231. doi: 10.3322/caac.21448. Epub 2018 Feb 27. *Cancer*. 2018 Aug 1;124(15):3105-3117. doi: 10.1002/cncr.31316.

BLUME-JENSEN P, BERMAN DM, RIMM DL, SHIPITSIN M, PUTZI M, NIFONG TP, SMALL C, CHOUDHURY S, CAPELA T, COUPAL L, ERNST C, HURLEY A, KAPRELYANTS A, CHANG H, GILADI E, NARDONE J, DUNYAK J, LODA M, KLEIN EA, MAGI-GALLUZZI C, LATOUR M, EPSTEIN JI, KANTOFF P, SAAD F.

Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1;21(11):2591-600. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2603. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25733599.

BONASSA, Edva Moreno Aguilar et al. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. In: *Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos*. 2012. p. 644-644.

CASTRILLI G, FABIANO A, LA TORRE G, MARIGO L, PIANTELLI C, PERFETTI G, RANELLETTI FO, PIANTELLI M. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*. 2002 Apr;31(4):234-8. doi: 10.1034/j.1600-0714.2002.310407.x. PMID: 12076327.

CHRISTMANN M, TOMICIC MT, ROOS WP, KAINA B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003 Nov 15;193(1-2):3-34. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00287-7. PMID: 14599765.

DASGUPTA H, ISLAM S, ALAM N, ROY A, ROYCHOUDHURY S, PANDA CK. Hypomethylation of mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with chemotolerance of breast carcinoma: Clinical significance. *J Surg Oncol*. 2019, 119(1):88-100. doi: 10.1002/jso.25304.

DE' ANGELIS GL, BOTTARELLI L, AZZONI C, DE' ANGELIS N, LEANDRO G, DI MARIO F, GAIANI F, NEGRI F. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018 Dec 17;89(9-S):97-101. doi: 10.23750/abm.v89i9-S.7960. PMID: 30561401; PMCID: PMC6502181.

DUFFY MJ, WALSH S, MCDERMOTT EW, CROWN J. Biomarkers in Breast Cancer: Where Are We and Where Are We Going? *Adv Clin Chem.* 2015;71:1-23. doi: 10.1016/bs.acc.2015.05.001. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26411409.

GHOSH A, GHOSH S, MAITI GP, SABBIR MG, ZABAROVSKY ER, ROY A, ROYCHOUDHURY S, PANDA CK. Frequent alterations of the candidate genes hMLH1, ITGA9 and RBSP3 in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and

prognostic significance. *Cancer Sci.* 2010 Jun;101(6):1511-20. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01551.x. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20412120.

HAMID AA, MANDAI M, KONISHI I, NANBU K, TSURUTA Y, KUSAKARI T, KARIYA M, KITA M, FUJII S. Cyclical change of hMSH2 protein expression in normal endometrium during the menstrual cycle and its overexpression in endometrial hyperplasia and sporadic endometrial carcinoma. *Cancer.* 2002 Feb 15;94(4):997- 1005. PMID: 11920468.

HEMMINSKI, K.; SUNDQUIST, J.; BERMEJO, J.L. Familial risks for cancer as the basis for evidence-based clinical referral and counseling. *Oncologist*, vol. 13, p.239- 247, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA. Estimativa, 2020. Incidência do Câncer no Brasil. Disponível em <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>, acessado em 16 de agosto de 2021.

KAUFMANN M, MORROW M, VON MINCKWITZ G, HARRIS JR; Biedenkopf Expert Panel Members. Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer.* 2010 Mar 1;116(5):1184-91. doi: 10.1002/cncr.24874. PMID: 20087962.

KINSELLA TJ. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res.* 2009 Mar 15;15(6):1853-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1307. Epub 2009 Feb 24. PMID: 19240165.

LI M, LIU L, WANG Z, WANG L, LIU Z, XU G, LU S. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep.* 2008 Feb;19(2):401-6. PMID: 18202787.

MCGEE RB, NICHOLS KE. Introduction to cancer genetic susceptibility syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 Dec 2;2016(1):293-301.

SANZ-GARCIA E, ARGILES G, ELEZ E, TABERNERO J. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol.* 2017 Nov 1;28(11):2648-2657. doi: 10.1093/annonc/mdx401. PMID: 29045527.

SINICROPE FA. Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Aug 23;379(8):764-773. doi: 10.1056/NEJMcp1714533.



VASAN K, SATGUNASEELAN L, ANAND S, ASHER R, SELINGER C, LOW TH, PALME CE, CLARK JR, GUPTA R. Tumour mismatch repair protein loss is associated with advanced stage in oral cavity squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2019 Dec;51(7):688-695. doi: 10.1016/j.pathol.2019.08.005. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31630878..

VISVANATHAN K, CHLEBOWSKI RT, HURLEY P, COL NF, ROPKA M, COLLYAR D, MORROW M, RUNOWICZ C, PRITCHARD KI, HAGERTY K, ARUN B, GARBER

J, VOGEL VG, WADE JL, BROWN P, CUZICK J, KRAMER BS, LIPPMAN SM; American Society of Clinical Oncology. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3235-58. doi: 10.1200/JCO.2008.20.5179. Epub 2009 May 26. PMID: 19470930; PMCID: PMC2716943.

PINHO MSL, Câncer colorretal com instabilidade de microssatélites: Uma doença diferente. *Rev bras Coloproct* 2002; 22(2): 139-144.

Losso, Grazielle Moraes et al. Instabilidade de microssatélite - MSI nos marcadores (BAT26, BAT25, D2s123, D5S346, D17S250) no câncer de reto. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* [online]. 2012, v. 25, n. 4 [Acessado 22 Fevereiro 2022] , pp. 240-244. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-67202012000400006>>. Epub 07 Feb 2013. ISSN 2317-6326. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202012000400006>.

Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigação sobre a Origem da Fragmentação do DNA do Espermatozoides: Papel da Apoptose, Imaturidade e Estresse Oxidativo. *Mol Med*. 2015 Jan 30;21(1):109-22. doi: 10.2119/molmed.2014.00158. PMID: 25786204; PMCID: PMC4461587.

Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. Seleção de Fonte de DNA para Aplicações A Jusante Baseada na Análise de Indicadores de Qualidade de DNA. *Biopreserv Biobank*. 2016 Ago;14(4):264-70. doi: 10.1089/bio.2015.0064. Epub 2016 9 de maio. PMID: 27158753; PMCID: PMC4991598.