

Multiplex PCR e PCR de longo alcance como estratégia na obtenção de sequências alvo para o sequenciamento de nova geração aplicados na identificação e caracterização de alterações genéticas de genes relacionados ao câncer de mama hereditário

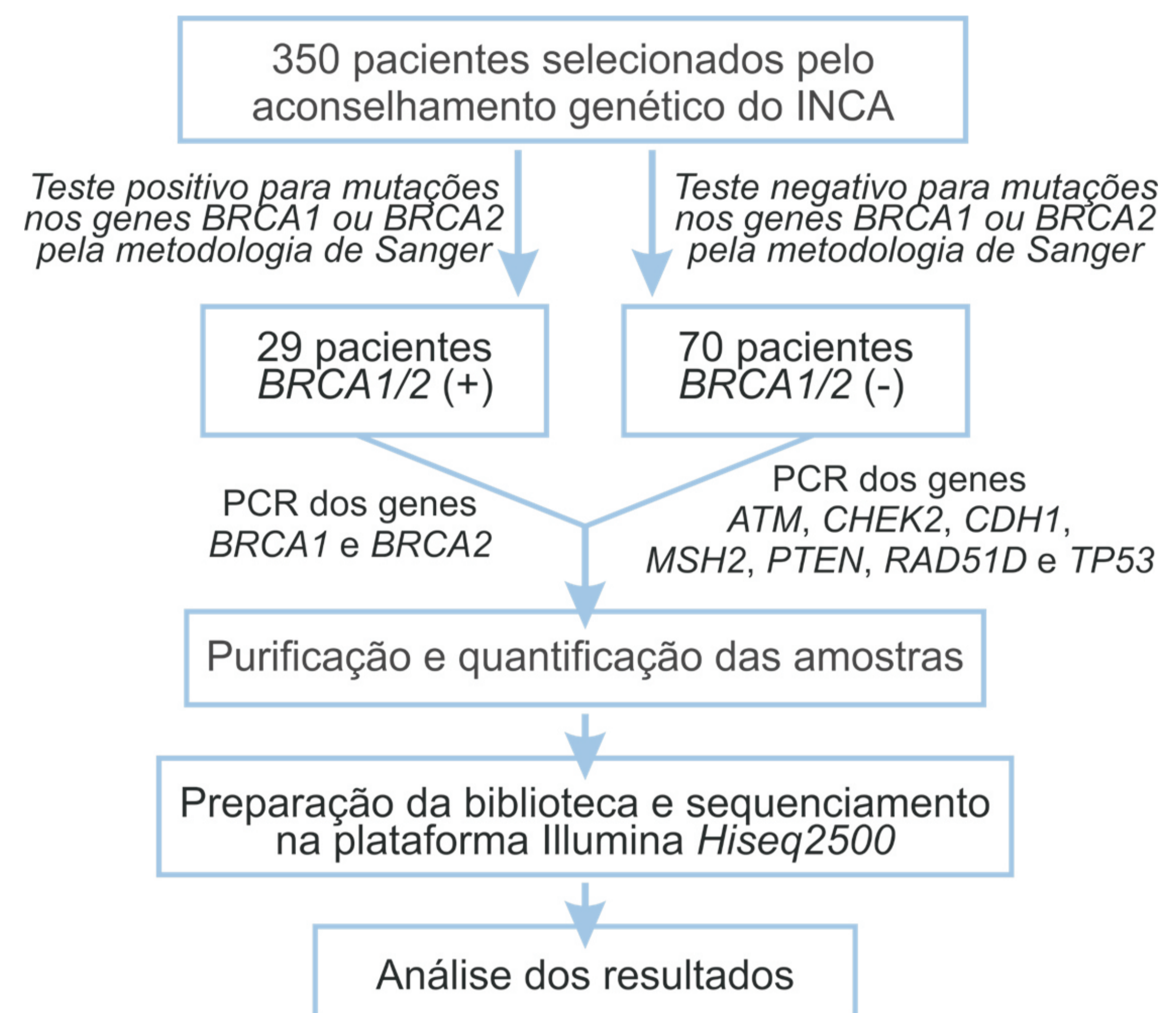
Renan G Gomes¹; Bárbara L Soares¹; Ayslan C Brant²; Miguel A Martins Moreira¹

¹Instituto Nacional do Câncer, Programa de Genética, Rio de Janeiro – RJ; ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Genética, Rio de Janeiro – RJ; gomes.renang@gmail.com

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de tumor de maior incidência e mortalidade em mulheres em todo mundo¹. No Brasil são esperados 58 mil novos casos para o ano de 2016², dos quais, segundo as estimativas, entre 5-10% serão do tipo hereditário³. Desde a descoberta dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, no ano de 1994, acreditava-se que juntos eles representariam entre 60-80% de todos os casos de tumores de mama hereditário³, no entanto, vem sendo observado nos últimos anos que essa estimativa varia fortemente de acordo com a população estudada. No Brasil, por exemplo, eles representam menos de 15% de todos os casos^{5,6}. Ainda, genes relacionados a outras síndromes hereditárias de predisposição ao câncer têm sido identificados em pacientes com diagnóstico clínico para o câncer de mama hereditário, mostrando uma sobreposição de fenótipos entre as síndromes hereditárias de câncer, e a contribuição de outros genes para pacientes com início clínico acentuado para o câncer de mama hereditário⁶. Este trabalho tem como objetivo validar e estabelecer uma metodologia de obtenção de sequências alvo baseada na PCR multiplex e PCR de longo alcance (LR-PCR) de nove genes relacionados à síndrome hereditária de câncer de mama para o sequenciamento de nova geração no âmbito do aconselhamento genético do INCA, e identificar outros genes de predisposição ao câncer de mama em pacientes com diagnóstico clínico da doença.

METODOLOGIA



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as reações de PCR multiplex e LR-PCR foram padronizadas, sendo que, o total de 184 éxons dos 9 genes são amplificadas em 38 reações. No sequenciamento teste realizado a fim de avaliar a eficácia da metodologia de obtenção das sequências alvo, a cobertura média para os 9 genes foi de 695x. Este resultado foi considerado parcialmente satisfatório por estar muito acima do valor recomendado pela literatura (30x). Apesar disso, observamos que os genes que apresentam uma média de amplicons de tamanhos inferiores a 300 pb a cobertura média foi inferior em relação aos genes com amplicons de tamanhos superiores a 300pb, alguns deles tiveram cobertura nula ou próxima de zero. Uma exceção a essa observação ocorreu com o gene *CHEK2* (Tabela 1) que apresenta um fragmento único de 9556 pb. Os resultados observados para os genes *MSH2* e *PTEN* eram esperados tendo em vista que eles apresentam a menor mediana em relação ao tamanho dos amplicons (Tabela 1) e, no processo de preparação das bibliotecas para o sequenciamento, na etapa da reação enzimática de “tagmentação”, sabe-se que os fragmentos de maior tamanho apresentam mais sítios de reconhecimento da enzima transposase para a adição das *tags*, etapa fundamental para a continuidade do processo, logo, estes fragmentos seguem automaticamente para as etapas posteriores e os demais são perdidos ao longo do processo. Apesar disso, dados experimentais mostraram que há uma melhor eficiência para fragmentos de tamanho inferior a 300pb desde que sejam utilizados ajustes que visem compensar o *input* de DNA para os fragmentos de amplicons menores. Em relação à ausência de cobertura observada para o gene *CHEK2* acreditamos que possa ter ocorrido devido a erros nas etapas que precedem a obtenção da biblioteca, o que teria levado a perda dos amplicons desse gene.

Tabela 1. Resultados parciais obtidos no sequenciamento teste.

Gene	Número de éxons	Número de amplicons	Mediana dos amplicons	Número de reações		Número de amplicons com cobertura		Cobertura média
				LR-PCR	Multiplex PCR	<30x	>30x	
<i>ATM</i>	64	20	3017 pb	9	4	4	16	139x
<i>BRCA1</i>	24	6	1547 pb	6	0	0	6	207x
<i>BRCA2</i>	27	20	781 pb	0	6	8	12	525x
<i>CDH1</i>	16	8	1878 pb	0	2	2	6	1389x
<i>CHEK2</i>	7	1	9556 pb	1	0	1	0	0x
<i>MSH2</i>	16	16	246 pb	0	6	4	12	150x
<i>PTEN</i>	9	9	282 pb	0	2	5	4	310x
<i>RAD51D</i>	10	4	1412 pb	0	1	0	4	3163x
<i>TP53</i>	11	3	1215 pb	0	1	0	4	374x

CONCLUSÃO

O ajuste realizado visando a sobreposição dessa barreira metodológica na etapa de “tagmentação” foi insuficiente para a obtenção de uma cobertura homogênea entre os amplicons, novos ajustes serão aplicados visando preencher essa lacuna. Apesar disso, a metodologia de obtenção das regiões alvo baseada nas reações de PCR de longo alcance e PCR multiplex, são rápidas, de fácil aplicação e pouco onerosa, e se mostraram eficientes especialmente para amplicons maiores que 500pb.

REFERÊNCIAS

- ¹GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.
²Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil \ Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
³Carroll JC, Cremin C, Allanson J, et al. Hereditary breast and ovarian cancers. Canadian Family Physician. 2008;54(12):1691-1692.
⁴Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? Breast Cancer Research 1999; 1(1):14-17
⁵de Oliveira, ES, Soares, BL, Lemos, S. et al. Screening of the *BRCA1* gene in Brazilian patients with breast and/or ovarian cancer via high-resolution melting reaction analysis. Familial Cancer (2016) 15: 173.
⁶Palmero, EI, Alemar, D. et al. “Screening for Germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *CHEK2* Mutations in Families at-Risk for Hereditary Breast Cancer Identified in a Population-Based Study from Southern Brazil.” *Genetics and Molecular Biology* 39.2 (2016): 210–222. PMC. Web.