

Padronização de técnica por PCR em tempo real (qPCR) para análise de metilação em pacientes com câncer colorretal atendidos na FCECON

Bruna Campos da Silva; Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO); brunacds40@gmail.com;
Lívia Raquel Macedo Gusmão; Faculdade Nilton Lins;
Mikele Praia de Oliveira; PPGIBA-UFAM;
Valquíria do Carmo Alves Martins; FCECON e PPGIBA-UFAM;
Dieila Giomo de Lima; Centro de Pesquisa Boldrini;
Mariana Brait; AC Camargo Câncer Center;
Flávia Níniver de Oliveira Gomes; PPGIBA-UFAM;
Kátia Luz Torres; FCECON e PPGIBA-UFAM;

1. Introdução

O câncer colorretal (CCR) relaciona-se a todas as neoplasias malignas que acometem o intestino grosso (ceco, cólons ascendente, transverso, descendente e sigmoide) e reto. É a malignidade mais frequente do trato gastrointestinal, sendo o terceiro câncer mais incidente no mundo e a segunda principal causa de morte por câncer.¹

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCR ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais frequentes. No Amazonas, o CCR também é o terceiro tipo mais comum, com uma incidência anual estimada de 300 novos casos para o período de 2023-2025. Este número abrange 140 casos em homens e 160 em mulheres, destacando uma prevalência maior entre as mulheres. Em Manaus, a taxa bruta de incidência é de aproximadamente 11,55 por 100 mil mulheres e 8,81 por 100 mil homens.²

O CCR é uma doença caracterizada pelo acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas, algumas das quais são responsáveis pela ativação de oncogenes ou inativação de genes oncosuppressores, que são capazes de conduzir a evolução maligna do epitélio normal através de lesões neoplásicas precoces para o CCR.³

Pelo menos três vias principais são descritas para o desenvolvimento do CCR, sendo a instabilidade Cromossômica (CIN) que envolve o ganho ou perda de cromossomos, associando-se a mutações em genes como KRAS e APC, a instabilidade de Microsatélites (MSI) que é causada pela disfunção dos genes de reparo de incompatibilidade do DNA e a metilação da ilha CpG que envolve a adição de grupos metil (CH₃) em regiões CpG, o que pode silenciar genes supressores de tumor e favorecer a progressão tumoral.³

Sabe-se ainda que em mamíferos, a metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em citosinas (C) que são seguidas de guaninas (G), chamado de dinucleotídeo CpG. Muitos CpG são encontrados no que chamamos de ilhas CpG e estas tendem a ser encontradas nos promotores de genes. A regra geral é que as ilhas CpG, tendem a ser protegidas da metilação. No entanto, se for encontrado metilação nas ilhas CpG em regiões de genes supressores de tumor, pode induzir a inibição dos fatores de transcrição promovendo o silenciamento da expressão gênica.⁴

Então no câncer, em vez de ter o mesmo tipo de composição de metilação do DNA que se têm em uma célula normal, as ilhas CpG são hipermetiladas e quando associado ao promotor de genes supressores de tumor, causando a inativação transcricional desses genes e leva ao desenvolvimento e progressão do câncer.^{3,4}

Estudos sobre metilação do DNA e perfil genético têm o potencial de melhorar o diagnóstico precoce, personalizar os tratamentos e prevenir a progressão da doença em pacientes com câncer colorretal.⁵ Neste contexto, a padronização de uma técnica por PCR em Tempo Real (qPCR) para análise de metilação em pacientes com câncer colorretal assume papel importante na potencialização de geração de dados de importância clínica no manejo dos

pacientes. Sendo assim, este estudo tem como objetivo padronizar a técnica por PCR em Tempo Real (qPCR) para análise de metilação em pacientes com câncer colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

2. Material e Métodos

Trata-se de um estudo experimental de padronização de técnica por qPCR voltado para detecção de perfil de metilação em 8 genes alvos específicos, em pacientes com câncer colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON.

As amostras utilizadas na padronização foram de DNA de tecido tumoral e não tumoral adjacentes de pacientes com o diagnóstico de CCR, ≥ 18 anos e sem tratamento prévio. A extração das amostras foi realizada utilizando o kit comercial Promega RealiaPrep™ gDNA Tissue Miniprep (Promega Corporation, Madison, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As alíquotas foram armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular da FCECON a -80°C e fazem parte do biorrepositório do estudo maior intitulado “Análise do espectro molecular e clínico do câncer colorretal: da epidemiologia e qualidade de vida à genética e análises ômicas” (estudo EMCOR), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON sob o número de CAEE 52343821.2.0000.0004 e número de parecer 5.180.654 e atende a Resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas, utilizando o Nanodrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific™ São Paulo, Brasil), seguindo os procedimentos operacionais do fabricante. As amostras também foram submetidas a corridas em gel de agarose a 0,8% para certificar-se quanto a integridade de DNA das mesmas.

Antes da etapa de conversão do DNA com bissulfito de sódio, as amostras extraídas também foram quantificadas no fluorímetro Qubit® 4.0 (Thermo Fisher Scientific©) seguindo as orientações do fabricante, pois é necessário verificar se o input de DNA extraído está entre 200 e 500 ng (em até 45 μL). Caso o volume de DNA seja insuficiente, este será equiparado adicionando-se H_2O livre de nucleases.

As amostras de DNA então foram tratadas com bissulfito de sódio utilizando o kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O objetivo do tratamento do DNA com bissulfito de sódio é converter as citosinas não metiladas em uracilas, não alterando as citosinas metiladas. Este procedimento de conversão por bissulfito é realizado em três etapas: purificação, desnaturação, conversão com bissulfito de sódio (adicionando reagentes e incubação). O DNA convertido com bissulfito de sódio foi estocado em freezer a -20°C , até posterior análise.

Os DNAs modificados (convertidos) por bissulfito de sódio foram amplificados pela técnica de PCR em tempo real. As análises foram realizadas no volume final de 10 μL , contendo no total 5 μL de EpiTect MethyLight Master Mix (Quiagen, Alemanha), 0,6 μL dos primers forward/reverse, 0,2 μL de sonda, 0,5 μL de DMSO, 1,1 μL de H_2O e o volume 2 μL de DNA tratado com bissulfito de sódio.

O ciclo de amplificação foi de 5 minutos a 95°C , seguido de 50 ciclos de 15s a 95°C e 60s na temperatura de anelamento e extensão de primers a 60°C . Os ensaios foram realizados em duplicata e processados na plataforma QuantStudio™ 5 de PCR em tempo real (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA) no laboratório de biologia molecular da FCECON. Para cada gene alvo foram sintetizados dois pares de primers específicos para as sequências metiladas. A

síntese foi realizada pela empresa ThermoFisher, São Paulo, Brasil). Ademais, foi utilizado o gene β -actina como calibrador da reação.⁶

Os primers e sondas utilizados foram os seguintes: *β -actina primer forward* 5'tggatgatggaggaggttagtaagt3', *primer reverse* 5'aaccaataaaacctactcctcccttaa3', *sonda* 5'FAM-accaccaccaacacacaataacaaacaca-TAMRA3', *CDKN2A primer forward* 5'tggagtttgcgttgattggtt3', *primer reverse* 5'aacaacgcccgcacctct3', *sonda* 5'FAM-accggacccccgaaccgcg-TAMRA3', *CDO1, primer forward* 5'ccacaacgacgaaaataaaacg3', *primer reverse* 5'tcggcgtttagggatcgcg3', *sonda* 5'FAM-ttaacggcgcggttagtcgttcg-TAMRA3', *CRABP1 primer forward* 5'tcgaaatttcgttggtgcgt3', *primer reverse* 5'tatccgtacctaccgcccgc3', *sonda* 5'FAM-accatacccaacttcgcgcacaccta-TAMRA3'. *IGF2 primer forward* 5'gagcgggttcggtgctgta3', *primer reverse* 5'ccaactcgatttaaaccgacg3', *sonda* 5'FAM-ccctctaccgctcggaacccga-TAMRA3', *MLH1 primer forward* 5'ctatcgccgcctcatcg3', *primer reverse* 5'cggtatatactgcttagtattcggtt3', *sonda* 5'FAM-cgcgacgtcaaacgccactacg-TAMRA3', *NEUROG1, primer forward* 5'cgtgtagcgttcgggtatttga3', *primer reverse* 5'cgataattacgaacacactccgaat3', *sonda* 5'FAM-cgataacgacctccgcgaacataaa-TAMRA3', *RUNX3 primer forward* 5'cggtcgatgggtggacgtgt3', *primer reverse* 5'gacgaacaacgtcttattacaacgc3', *sonda* FAM-cgcacgaactcgctacgtaatccg-TAMRA, *SOCS1 primer forward* 5'gcgtcgagttcggtggtatt3', *primer reverse* 5'ccgaaacctcttcacgctaa3', *sonda* FAM-acaattccgctaacgactatcgcgca-TAMRA.

Para cada gene, foi construída uma curva padrão de calibração a partir de diluições seriadas (1:10) de DNA metilado (EpiTect PCR Control DNA, QUIAGEN, Alemanha) com níveis de metilação previamente conhecidos. Essas curvas foram incluídas em todos os ensaios de qPCR, permitindo estimar os níveis de metilação nas amostras tumorais e não tumorais.

O valor de metilação foi calculado pelo método da razão, expressa em percentual, considerando a relação entre a quantidade de cópias do gene-alvo metilado e a média da quantidade de cópias do gene de referência (β -actina), multiplicada por 100⁷. A fórmula aplicada foi: *Metilação = Gene alvo/ β -actina x 100*. Esse cálculo permite expressar a porcentagem de metilação do gene de interesse de forma normalizada, corrigindo eventuais variações na concentração de DNA entre as amostras.

3. Resultados e Discussão

Foi realizado um teste com todos os primers específicos para regiões metiladas dos genes alvos, *CDKN2A*, *CDO1*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*. O teste realizado confirmou a eficiência de anelamento dos primers às regiões-alvo de DNA 100% metilado. Por outro lado, não houve amplificação significativa no controle interno com o DNA não metilado, corroborando a ausência de reação cruzada com regiões desprovidas de metilação. Esses resultados indicam que os primers e sondas utilizados apresentam especificidade para regiões metiladas do DNA humano, tornando-os adequados para amostras experimentais.

Durante a fase de padronização da técnica de PCR em tempo real (qPCR), apenas cinco genes (*β -ACTINA*, *RUNX3*, *CDKN2A*, *CDO1*, *SOCS1*), apresentaram curvas padrão com parâmetros considerados adequados, demonstrando eficiência entre 90-110% e coeficiente de determinação (R^2) $\geq 0,98$. Os demais genes não atenderam aos critérios de qualidade estabelecidos para as curvas padrão, como linearidade e eficiência (tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros das curvas padrão obtidas para os genes-alvo utilizados na padronização da reação de qPCR.

Gene	Eficiência 90-110%	R ² $\geq 0,98$	Curva Padrão Adequada
<i>B-ACTINA</i>	101.58%	0.99	Sim

<i>RUNX3</i>	99.93%	0,99	Sim
<i>CDKN2A</i>	91.66%	0,99	Sim
<i>CDO1</i>	99.70%	0,98	Sim
<i>SOCS1</i>	90.11%	0,98	Sim
<i>CRABP1</i>	89.06%	0,96	Não
<i>MLH1</i>	78.13%	0,99	Não
<i>IGF2</i>	63.52%	0,99	Não
<i>NEUROG1</i>	112.35%	0,92	Não

Dentre esses, o gene *CDKN2A* foi selecionado para continuidade da análise experimental, sendo aplicado a quantificação dos níveis de metilação em 35 amostras pareadas de tecido tumoral e não tumoral de pacientes com câncer colorretal (CCR). Observou-se uma tendência ($p = 0,0568$) de redução dos níveis de metilação nas amostras tumorais, indicando a presença de hipometilação do promotor do gene *CDKN2A* (figura 1).

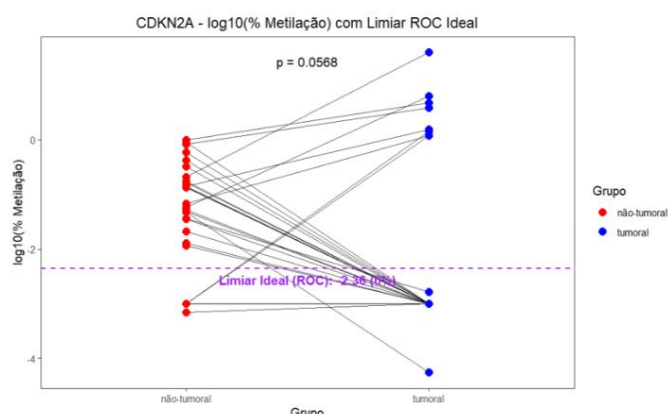


Figura 1: Gráfico de pontos pareados que exibe os níveis de metilação de *CDKN2A* (log10-transformados) em amostras pareadas de tecidos não-tumorais (vermelho) e tumorais (azul). As diferenças na porcentagem de metilação entre os tecidos não-tumorais e tumorais, foram analisadas usando o teste não paramétrico de Wilcoxon. As linhas pretas conectam as amostras do mesmo paciente. O p-valor (0.0568) do teste indica a diferença estatística entre os grupos. A linha tracejada roxa representa o limiar ideal de -2.36 (0% na escala original), determinado pela análise ROC para melhor discriminação (Sensibilidade = 77.14%; Especificidade = 65.71%).

O gene *CDKN2A* é um supressor tumoral envolvido no controle do ciclo celular e a sua hipermetilação leva à inativação e favorece a proliferação celular no CCR. A hipermetilação deste gene é descrita entre 12% e 51% dos CCRs sendo frequentemente incluída nos painéis de marcadores epigenéticos utilizados para caracterizar o fenótipo *CIMP* (CpG Island Methylator Phenotype).⁸ Diferentemente desse padrão, a hipometilação observada neste estudo pode refletir as particularidades epigenéticas da população analisada, influenciadas por variáveis regionais, genéticas ou ambientais.⁹ Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo, voltado à padronização da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para análise de metilação destacam a relevância de investigações epigenéticas alinhadas às características genéticas, ambientais e sociais da população analisada.

4. Conclusões

Este estudo padronizou uma metodologia de PCR em tempo real (qPCR) para análise de metilação em amostras de pacientes com câncer colorretal atendidos na FCECON. As curvas padrão para os genes *β -ACTINA*, *RUNX3*, *CDKN2A*, *CDO1* e *SOCS1* apresentaram parâmetros adequados, comprovando a eficiência e a especificidade técnica do ensaio. A análise preliminar do gene *CDKN2A* apontou uma tendência à hipometilação em tecidos tumorais, o que difere dos padrões geralmente descritos na literatura. Essa variação pode estar associada a características epigenéticas específicas da população estudada.

Palavras- chave: Padronização; qPCR; Metilação; Câncer colorretal.

5. Divulgação

O (s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

6. Referências

1. Estatísticas Globais do Câncer 2020: Estimativas GLOBOCAN de Incidência e Mortalidade em Todo o Mundo para 36 Cânceres em 185 Países - Sung - 2021 - CA: Um Jornal de Câncer para Médicos - Wiley Online Library [Internet]. [citado 21 de julho de 2025]. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>
2. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil [Internet]. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2023 [citado 21 de julho de 2025]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>
3. De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1017.
4. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:11–26.
5. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol*. 2000;183:145–54.
6. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986;321:209–13.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–8.
8. Shima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. *Intl Journal of Cancer*. 2011;128:1080–94.
9. Almeida FGO, De Aquino PF, De Souza ADL, De Souza AQL, Do Carmo Vinhote S, Mac-Cormick TM, et al. Colorectal cancer DNA methylation patterns from patients in Manaus, Brazil. *Biol Res [Internet]*. 2015 [citado 7 de julho de 2025];48. Disponível em: <http://www.biolres.com/content/48/1/50>

Financiamento: FAPEAM – Programa PAIC; FAPEAM Programa PRO-ESTADO;