PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISE DAS VARIANTES GENÉTICAS DO INFLAMASSOMA EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

Autor(res)

Rosa Maria Elias
Rafaela Pedroso
Rafaela Cardoso Do Nascimento
Raquel Maria Neves Amorim
Gilmar Ferreira Do Espírito Santo
Polyana Silva Lemes
Izabel Nazira Nadaf
Raylane Adrielle Gonçalves Cambui
Cleiton Ribeiro Lelis

Categoria do Trabalho

Iniciação Científica

Instituição

UNIC BEIRA RIO

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é considerado um tumor epitelial maligno do cólon e do reto e origina-se da formação de pólipos ou adenomas na mucosa intestinal, os quais possuem potencial carcinogênico dependente de alterações genéticas hereditárias ou adquiridas a partir de mutações somáticas, instabilidades epigenéticas e inflamação intestinal crônica, associada à doença de Crohn ou colite ulcerativa. O inflamassoma é um complexo citoplasmático que se forma em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou ao dano (DAMPs) por receptores semelhantes a Nod (NLR), ou de outros receptores da imunidade inata. Dados do nosso grupo de pesquisa sugerem que variantes genéticas relacionadas a ganho-de-função nos receptores NLRP1 e NLRP3 representam um fator de risco para um pior prognóstico do CCR.

Objetivo

Neste trabalho iremos apresentar a experiência de bancada e familiarização com o protocolo de técnicas para coleta e processamento do sangue para a separação do plasma, Buffy Coat e hemácias para posterior extração de DNA e análise das variantes genéticas do inflamassoma que representam um fator de risco para um pior prognóstico do CCR.

Material e Métodos

Para otimizar a extração de DNA genômico e genotipagem de polimorfismos nos genes do inflamassoma, foi realizado um protocolo para coleta, extração e processamento, evitando alterações externas nas amostras de sangue e tecido. Todos os pacientes receberam informações quanto aos objetivos e protocolo da pesquisa

contidos no termo de consentimento livre e esclarecido. Dos pacientes que aceitaram participar do estudo, foram coletadas amostras de sangue periférico e tecido tumoral para análise dos polimorfismos do inflamassoma. Para a coleta do sangue periférico foram utilizados tubos contendo o anticoagulante EDTA K3 para a extração de Buffy Coat, plasma, hemácias e extração de RNA.O processamento do sangue e armazenamento do material biológico foi realizado no Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular do Hospital Geral.

Resultados e Discussão

As amostras de sangue são coletadas em 4 tubos de 10 ml durante o procedimento cirúrgico e encaminhados ao laboratório para centrifugar em 2 ciclos de 5 min a 3000 rpm, sendo 2 tubos destinados para a separação de plasma, hemácias e o Buffy Coat, transferência para microtubos e armazenamento a -20ºC. Dos outros 2 tubos é separado o Buffy Coat em microtubos, onde é adicionado 250uL de solução salina tamponada (PBS) e submetido a um ciclo de centrifugação (1500 RPM por 10 min). O sobrenadante é então desprezado e é adicionado mais 200uL de PBS ao produto final, homogeneizado com 1 mL de RNAlater para o armazenamento a -20ºC, para posterior extração de RNA. A coleta de 1 cm de tecido tumoral e 1 cm de tecido saudável foi realizada pelo cirurgião oncológico durante o procedimento cirúrgico, fixado em formol tamponado 10% para os ensaios de Imunohistoquímica. A coleta de 0,2 mm de tecido tumoral foi armazenada em um microtubo contendo 1 ml de RNAlater.

Conclusão

As coletas e processamento de amostras biológicas trouxe a oportunidade de vivenciar a experiência de bancada e familiarização de técnicas de processamento do sangue para a separação do plasma, Buffy Coat e hemácias para posterior extração de DNA genômico e genotipagem de polimorfismos nos genes do inflamassoma.

Referências

Cambui RAG, do Espírito Santo GF, Fernandes FP, Leal VNC, Galera BB, Fávaro EGP. Double-edged sword of inflammasome genetics in colorectal cancer prognosis. Clinical Immunology (2020).