



TaqMan versus análise por High Resolution Melting (HRM) na genotipagem do gene *ABCB1*: especificidade, sensibilidade, correlação e custo

Palavras-Chave: Polimorfismo, Reação em cadeia da polimerase, TaqMan, HRM

Autores(as):

Letícia Rogge Nogueira dos Santos, FCF - UNICAMP

Jessica Meulman, FCM - UNICAMP

Profa. Patricia Moriel, FCF - UNICAMP

Prof. Dr. Eder de Carvalho Pincinato (orientador), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O gene *ABCB1* (ATP-binding cassette subfamily B member1), também conhecido como *MDR1* (multidrug-resistance gene 1) ou gene de resistência a múltiplas drogas, está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q21.12) (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2022; BODOR et al., 2005) e é responsável pela codificação da Glicoproteína P (P-gp), uma bomba de efluxo transmembrana dependente de ATP (Adenosina Trifosfato) que transporta diversos fármacos e substâncias endógenas para fora das células, reduzindo a penetração intracelular destas. A P-gp pode ser encontrada em órgãos como fígado, rins, adrenal, intestino delgado, pulmão, células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE), placenta e linfócitos (CORDON-CARDO et al., 1990). Sua função em enterócitos, por exemplo, é o transporte de substâncias para o lúmen intestinal; nas células renais, realiza o transporte para o túbulo proximal e posterior excreção urinária, e na BHE, participa do transporte de substâncias no Sistema Nervoso Central, como antidepressivos por exemplo. Desta forma, a P-gp desempenha um papel importante na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diversas substâncias. Polimorfismos no gene *ABCB1* têm sido extensivamente investigados e descritos na literatura, sendo muitas vezes correlacionados com alterações na biodisponibilidade de fármacos, devido a sua estreita relação com os mecanismos de metabolização dos mesmos (FUNG e Gottesman, 2009).

Os polimorfismos C1236T (rs1128503) e C3435T (rs1045642) estão localizados na região codificadora do gene (exon 13 e 27, respectivamente) e são SNPs silenciosos, ou seja, a mudança de nucleotídeos não altera a sequência do aminoácido codificado (HOFFMEYER et al., 1999), porém, podem estar associados com o desenvolvimento de eventos adversos aos medicamentos, sendo bastante estudados em pacientes que utilizam antidepressivos.

Os métodos de genotipagem foram responsáveis pela determinação de mais de 7 milhões de variantes comumente encontradas na população mundial (MAMOTTE, 2006). Existe hoje uma grande variedade de técnicas moleculares utilizadas para a genotipagem dos SNPs, praticamente todas baseadas na Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). Técnicas clássicas baseadas na genotipagem por PCR, como o PCR oligonucleotídeo alelo-específico (PCR-AE, ou do inglês ASO-PCR) ou a técnica de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição por PCR (PCR-RFLP) são amplamente utilizadas, principalmente pelos seus baixos custos (MARTINO et al., 2010), mas

apresentam limitações quanto à sensibilidade do método e maior complexidade de execução técnica. Um dos métodos mais amplamente utilizados atualmente na genotipagem de SNPs é o método TaqMan, que utiliza duas sondas fluorescentes capazes de discriminar os diferentes alelos. A presença destas duas sondas fluorescentes garante uma altíssima especificidade metodológica, além de simplificar a execução técnica, diminuindo as etapas de trabalho de bancada. A desvantagem deste método, em comparação aos outros, é o alto custo dos ensaios (MARTINO ET AL., 2010). Com o intuito de tentar diminuir os custos das análises de genotipagem e ainda assim garantir a alta sensibilidade e especificidade apresentadas no ensaio TaqMan, Ririe et al.(1997), desenvolveram um método de análise que utiliza como princípio a temperatura de melting do produto da amplificação por PCR em tempo real. A temperatura de melting (T_m), ou temperatura de pareamento, pode ser definida como a temperatura necessária para que metade do DNA esteja em conformação dupla fita e metade na conformação desnaturada (fita simples). Intercalantes de DNA, também chamados de Dye, são utilizados na reação de PCR para que seja possível determinar a T_m do produto de amplificação. Atualmente, novos intercalantes de DNA, como EvaGreen ou LCGreen e o desenvolvimento de novas plataformas para realização do PCR, como o Rotor-Gene Q (Qiagen), associados ainda aos softwares de análise dos resultados, propiciaram um aumento significativo da utilização desta técnica para o estudo dos SNPs (SLOMKA et al., 2017).

Porém, existem algumas limitações para a utilização da técnica de análise por HRM, como o tipo de polimorfismo, qualidade do DNA utilizado e problemas com reprodutibilidade decorrente de pipetagem. Essas limitações estão sendo estudadas na literatura científica e exemplos de sucesso na genotipagem de SNPs são cada vez mais publicados (SLOMKA et al., 2017). Diante das vantagens e limitações apresentadas por ambos os métodos (TaqMan e HRM), há necessidade de padronização laboratorial para cada SNP que se pretende avaliar em um estudo científico e, portanto, justifica-se o desenvolvimento deste projeto, que pretende avaliar qual método pode ser padronizado para a detecção de polimorfismos do gene *ABCB1*.

METODOLOGIA:

Foram utilizados DNA de 96 participantes de um estudo maior, intitulado “Avaliação da influência de polimorfismos nos genes do citocromo P450 e no gene *ABCB1* na farmacocinética de Cloridrato de Trazodona”, que prevê a determinação dos polimorfismos do gene *ABCB1*. Este estudo maior foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (CAAE:39774320.0.0000.5404).

O projeto inicial previa o desenho dos primers específicos para os polimorfismos do gene *ABCB1* (rs1128503 e rs1045642), porém, com o intuito de otimizar o tempo e diminuir os gastos do projeto, utilizamos o desenho de primers já publicados na literatura científica, exemplificado no Quadro 1 (Vaclavikova et al., 2012).

Alvo	Primers (5´-3´)	Tamanho (bp)
rs1128503	Forward:TGTGTCTGTGAATTGCCTTG Reverse:CATCTACCATCCCCTCTGT	181
rs1045642	Forward: TCCTGAAGTTGATCTGTGAAC Reverse: AGTGACTCGATGAAGGCA	233

Quadro 1 – Desenho dos primers para amplificação dos polimorfismos do gene *ABCB1* (rs1128503 e rs1045642).

A preparação inicial para a amplificação dos polimorfismos por HRM foram: 5 uL de Type-it HRM PCR Kit (Qiagen), 0,7 uL de primer forward (10 uM), 0,7 uL de primer reverse (10 uM), 2,1 mL de água livre de DNase e 1,5 uL de DNA (20 ng/uL). E as condições para análise por HRM foram: 1 ciclo de ativação da DNA polimerase à 95°C por 5 minutos; 45 ciclos de 95°C por 10 segundos (desnaturação da dupla fita de DNA) e 55°C por 32 segundos (anelamento e extensão). Após os 40

ciclos, foi realizada uma Curva de Melting para análise de HRM de 65 a 95°C com incremento de 0,1°C/2 segundos. As reações foram realizadas no equipamento Rotor-Gene 5® (Qiagen) e a análise dos resultados foi realizada pelo software Rotor-Gene Q Pure Detection (versão 2.3.5.).

A pesquisa dos polimorfismos do gene *ABCB1* realizada por RT-PCR foi realizada utilizando-se sondas de hidrólise TaqMan® Genotyping (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, Califórnia, EUA). A reação de RT-PCR foi realizada em um aparelho Rotor-Gene 5® (Qiagen) utilizando um volume final de reação de 10 µL, consistindo em 5 µL de TaqMan® Master Mix, 0,5 µL de sonda, 2,5 µL de água livre de DNase e 2,0 µL de DNA (20 ng/µL). As condições do RT-PCR foram: 1 ciclo inicial de 60°C por 2 minutos, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, seguida de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram determinados os genótipos de 96 amostras para os polimorfismos rs1128503 e rs1045642 do gene *ABCB1*. Os genótipos foram determinados por RT-PCR utilizando-se sondas TaqMan e análise por HRM e os resultados foram correlacionados, considerando-se a genotipagem por sondas TaqMan como referência.

Os genótipos das amostras analisadas por HRM foram identificados pela avaliação gráfica da curva de melting (Figura 1A) e de normalização pelo genótipo heterozigoto (Figura 1B). Em todas as reações de RT-PCR foram utilizados controles positivos para os genótipos homozigoto referência, heterozigoto e homozigoto variante e controles negativos (branco), substituindo-se o DNA por água livre de nucleases.

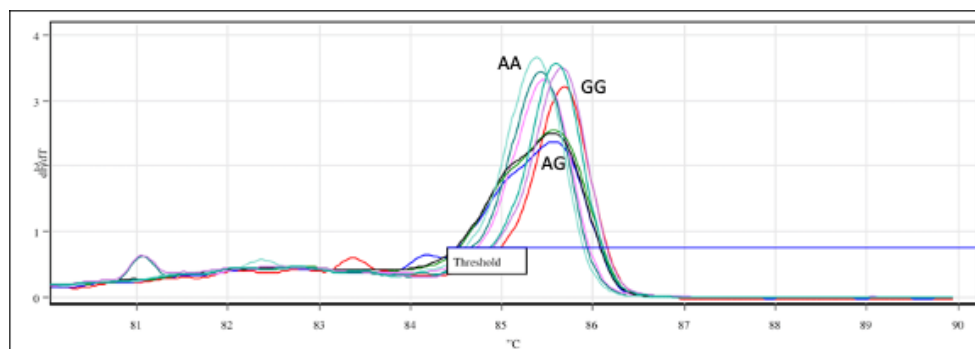


Figura 1A - Gráfico de análise da curva de melting do polimorfismo rs1045642. As amostras com genótipo homozigoto referência (AA) apresentam uma temperatura de melting em torno de 85,4°C; as amostras com genótipo heterozigoto apresentam uma temperatura de melting de 85,6°C e as amostras com genótipo homozigoto variante (GG) apresentam uma temperatura de melting de 85,8°C.

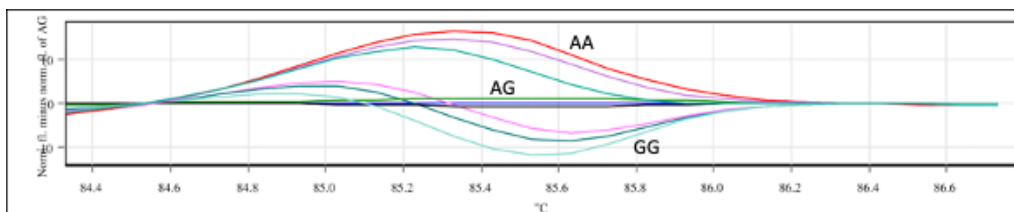


Figura 1B - Gráfico de análise da curva de melting do polimorfismo rs1045642 normalizado pelo genótipo Heterozigoto (AG). As linhas acima de linha central representam o genótipo homozigoto referência (AA) e as linhas abaixo representam o genótipo homozigoto variante (GG).

As genotipagens por sondas Taqman foram determinadas utilizando-se o software Rotor-Gene Q series por meio da interpretação gráfica das fluorescências emitidas pelas sondas marcadas com os fluoróforos VIC e FAM (Figura 3). Nesta técnica, o genótipo homozigoto referência (AA) para o polimorfismo rs1045642 é amplificado por uma sonda que emite fluorescência amarela (VIC) e é traduzida por uma curva sigmóide. Neste genótipo, a sonda marcada com fluorescência verde (FAM) não é amplificada e apresenta uma linha reta (não sigmoidal). O genótipo AG é identificado quando a

sonda VIC e a outra sonda FAN são amplificadas e o genótipo homozigoto variante GG é identificado quando aparece uma curva amplificada com a sonda FAN e a sonda VIC não apresenta amplificação (Figura 3).

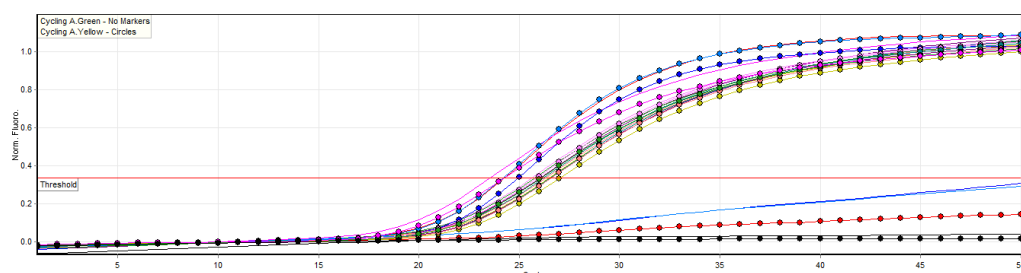


Figura 3 - Representação gráfica da amplificação do polimorfismo ABCB1 rs1045642 por sondas TaqMan. As linhas identificadas com círculos representam a sonda marcada com fluoróforo amarelo (VIC) e as linhas sem círculos identificam as sondas marcadas com o fluoróforo verde (FAM).

Após as determinações dos genótipos por ambas as técnicas, as mesmas foram correlacionadas utilizando-se o cálculo de Spearman, Kappa e o cálculo de sensibilidade, utilizando-se as determinações por TaqMan como referência.

Das 96 determinações, apenas 3 não foram coincidentes entre os métodos, para ambos os polimorfismos estudados.

Estes resultados demonstram que a sensibilidade da determinação por HRM foi de 0,97 para ambos os polimorfismos em comparação com os resultados obtidos pela TaqMan. A correlação de Spearman foi de 0,940 (p-valor <0,001) para ambos os polimorfismos e o teste kappa indicou que ambos os polimorfismos apresentaram 97% de concordância e um kappa de 0,95 (p-valor <0,001). Estes resultados indicam uma alta correlação entre os dois testes (HRM versus TaqMan).

Posteriormente foram realizadas análises de custos comparativos entre os métodos. Os custos de equipamento (Rotor-Gene Q5, centrífuga, capela, fluorímetro, pipetas, etc.), energia, coleta do sangue, extração e quantificação do DNA são valores iguais para os dois métodos e, portanto, não foram adicionados na planilha de valores. O Quadro 2 mostra os valores para a realização de uma reação de cada método.

Ensaio	Reagentes	Custo (R\$)	Nº de reações	Custo por reação (R\$)
HRM	Primers (forward e reverse)	170,00	2.860	0,06
	Master Mix	2.860,00	2.000	1,43
	Total			1,49
TaqMan	Sondas	2.584,00	750	3,45
	Master Mix	744,00	200	3,72
	Total			7,17

Quadro 2 – Custos comparativos entre as duas metodologias para genotipagem de um polimorfismo do gene ABCB1.

Em relação à sensibilidade metodológica, foram realizadas as genotipagens de uma amostra de DNA de 20 ng/uL, diluída nas proporções 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32. Foi possível identificar corretamente o genótipo da amostra em todas as diluições, em ambos os métodos (HRM e TaqMan), ou seja, foi possível identificar corretamente o genótipo em concentrações de DNA de 0,625 ng/uL em ambos os testes.

CONCLUSÕES:

No desenvolvimento do projeto, algumas mudanças foram necessárias, como o desenho dos *primers*, que foi feito através de uma revisão bibliográfica e não por softwares, por conta da facilidade e rapidez do processo. Entretanto, essa alteração não impediu o desenvolvimento do estudo.

Os resultados obtidos neste projeto indicaram que a genotipagem dos polimorfismos rs1045642 e rs1128503 do *ABCB1* obtida por RT-PCR e análise por HRM são altamente sensíveis e se correlacionam de forma significativa com a técnica de RT-PCR utilizando-se sondas de hidrólise TaqMan.

Os custos da genotipagem por HRM são 481% mais baratos quando comparados com a utilização das sondas TaqMan.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a análise dos polimorfismos rs1045642 e rs1128503 do *ABCB1* por HRM pode ser uma alternativa metodológica altamente sensível e concordante com o padrão ouro, que é a determinação por RT-PCR utilizando-se sondas TaqMan.

BIBLIOGRAFIA

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Expression of the Multidrug Resistance Gene Product (P-Glycoprotein) in Human Normal and Tumor Tissues.** Vol. 38, Pr. 1990.

Fung KL, Gottesman MM. **A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function.** *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics.* 2009 May;1794(5):860–71.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, et al. **Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo** [Internet]. National Institutes of Health. 1999. Available from: www.pnas.org.

Mamotte CDS. **Genotyping of single nucleotide substitutions.** *Clin Biochem Rev.* 2006; 27:63-75.

Martino A, Tommaso Mancuso, Anna Maria Rossi. **Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method.** *J Biomol Screen.* 2010 Jul;15(6):623-9.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: **Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.** *AnalBiochem*1997;245:154-160.

Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. **High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping - Limitations and Caveats in Practical Case Studies.** *Int. J. Mol. Sci.*2017, 18, 2316.

U.S. National Library of Medicine - NCBI. **ABCB1 ATP binding cassette subfamily B member 1 [Homo sapiens (human)]** Gene ID: 5243, updated on 6-Feb-2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5243>. 2022.

Vaclavikova et al. **Detection of frequent ABCB1 polymorphisms by high-resolution melting curve analysis and their effect on breast carcinoma prognosis.** *Clin Chem Lab Med* 2012;50(11):1999–2007.