

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MMP-2 EM CÉLULAS HELA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Roberta Gabrielly Borges Araújo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles, Tamy Taianne Suehiro, Natália Lourenço Mari, Cristiane Suemi Shinobu Mesquita, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientadora), e-mail: vrssilva@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Ciências da Saúde - Farmácia

Palavras-chave: Câncer do colo do útero, Metaloproteinase 2 da Matriz, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Resumo:

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum e a quarta causa mais frequente de morte por câncer entre as mulheres no mundo. A metástase é a principal causa de mortalidade nas pacientes, sendo que no microambiente tumoral, a clivagem proteolítica é um importante mediador deste processo. Diante disso, as metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham um papel fundamental nesta remodelação através da degradação das proteínas da matriz extracelular (MEC). Dentre as MMPs mais estudadas está a MMP-2, responsável por degradar principalmente o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, sendo esta a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células cancerígenas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão da MMP-2 em linhagem celular de câncer cervical humano (HeLa) através da metodologia de PCR quantitativo em tempo real via transcriptase reversa (RT-qPCR). Para isso, foi realizada a confecção de *primers* específicos para o gene MMP-2, para posterior avaliação da sua expressão através de RT-qPCR. Os *primers* confeccionados foram eficientes, visto que houve amplificação do gene selecionado, e foi possível a construção da curva de eficiência. Houve expressão de MMP-2 nas células, cujo valor de *Ct* obtido foi de 28,32. Assim, a metodologia foi eficaz para avaliar a expressão de MMP-2 em células HeLa, e estudos posteriores são necessários para melhor verificar o envolvimento deste na patogenia do câncer de colo de útero.

Introdução

O câncer do colo do útero ou câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo, com exceção do câncer de pele não melanoma. No ano de 2020, foram estimados 604.127 novos casos e

341.831 mortes por este câncer em todo o mundo. O principal fator de risco para o seu desenvolvimento é a infecção persistente por um ou mais genótipos de alto risco do *Papillomavírus* humano (HPV) (SUNG *et al.*, 2021).

As metaloproteinases de matriz (MMP) da família de enzimas dependentes do zinco desempenham um papel fundamental na remodelação do microambiente tumoral através da degradação das proteínas da matriz extracelular (MEC), promovendo a invasão de células neoplásicas e a colonização de tecidos distantes, estimulando a infiltração dos vasos sanguíneos e a liberação de fatores de crescimento (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Dentre as MMPs existentes, a MMP-2, também conhecida com gelatinase A, exerce um papel importante por ser responsável em degradar principalmente o colágeno tipo IV durante o processo de invasão das células tumorais (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

A técnica de PCR em tempo real proporciona uma detecção precisa e sensível de marcadores genéticos de doenças, como no câncer, permitindo a replicação *in vitro* do DNA de interesse de forma extremamente rápida. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão da MMP-2 em linhagem celular de câncer cervical humano (HeLa) através de técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), no laboratório de Citologia Clínica da UEM.

Materiais e métodos

Linhagem celular, condições de cultivo e manutenção

Foi realizada a reativação da linhagem celular de câncer cervical HeLa (HPV-18 positiva). Após, as células foram mantidas em frascos plásticos descartáveis com tampa de rosca e dispositivo para a entrada de CO₂, em estufa a 37°C umidificada e com 5% de CO₂. A linhagem celular foi mantida em meio de crescimento adequado, (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina e 2,5ug/mL de anfotericina B. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam, aproximadamente, 80% de confluência, utilizando, para tanto, tripsina e tendo sido previamente lavadas, uma vez, com solução de PBS.

Levantamento de dados e confecção dos primers para a execução da técnica

Foi realizado um levantamento de dados para obtenção da sequência gênica da MMP-2 utilizando a plataforma *GenBank*. Após o levantamento, a sequência de iniciadores (*primers*) foi confeccionada, através dos *softwares* *IDT* e *Primer 3* para a montagem das sequências de *primers Forward* e *Reverse*. Foram analisadas através do *Clustal Omega*, da plataforma disponível no site do *IDT Tools*, e a ferramenta *BLAST*, disponível no site do *PubMed*, a fim de verificar a afinidade da região pelo alvo, bem como os parâmetros ideais para a reação.

Extração do material genético

A extração genômica de RNA foi realizada utilizando *kit* de extração *QIAamp DNA/RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)* seguindo o manual de instruções do fabricante. A qualidade e quantificação do material genético purificado foram realizadas em espectrofotômetro (*NanoDrops 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA*).

Transcriptase Reversa

O DNA complementar (cDNA) para expressão da MMP-2 foi obtido por meio da transcriptase reversa pelo *kit iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad)* seguindo manual de instruções do fabricante.

Expressão de MMP-2

Os níveis de RNAm da MMP-2 foram determinados por RT-qPCR utilizando o equipamento *QuantStudio™ 5 System (Applied Biosystems)*. O volume final da reação foi de 20 μ L e continha 5 μ L de cDNA e 15 μ L do *MIX PowerUp SYBR Green (Thermo Fisher Scientific Inc.)* com os *primers*. As condições de ciclagem de amplificação foram: 95°C por 10 min (estágio *Hold*), quarenta ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min (estágio PCR); e estágio *Curva de Melt* (95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s). Uma curva de *Melting* foi construída para cada par de *primers* para confirmar a especificidade do produto.

Após verificar atividade dos *primers*, foi realizada a construção da curva de eficiência. O teste de eficiência foi realizado com concentrações de cDNA variando de 100 a 750 ng. Para a expressão de MMP-2 foi utilizada a concentração de 6 μ M de cada par de *primers* e 550 ng de cDNA da amostra.

Resultados e Discussão

Foram confeccionados 6 pares de *primers* para o gene MMP-2, bem como para os genes endógenos GAPDH e PPIA, com o objetivo de selecionar o melhor par de *primers* de acordo com os parâmetros. Após avaliação dos parâmetros de reação e afinidade ao gene, o par de *primers* que apresentou melhor desempenho nas análises realizadas foi selecionado para o estudo (MMP-2 - *Forward* - AAAAGTCCGAATCTCTGCCC - *reverse* - GGTTCTTTGCTGTTACTTTGG).

A partir da obtenção dos *primers*, foi realizada a elaboração da curva de eficiência, de maneira a garantir a avaliação da expressão de MMP-2. Assim, foram obtidos valores de *slope* de -2,895 e R² 0,94, e a partir desses resultados verificou-se que os *primers* confeccionados foram efetivos, uma vez que foi possível observar o produto amplificado e também, construir a curva de eficiência para o alvo objeto do estudo.

Então, foi observada a expressão de MMP-2 nas células HeLa, cujo valor de *Ct* obtido foi de 28,32, indicando que houve expressão de MMP-2 nestas. Esses dados estão de acordo com a literatura que mostra que as MMPs estão envolvidas em processos de degradação da matriz extracelular e da

membrana basal, de modo que são superexpressas nos tumores e estão envolvidas em processos de invasão e metástase, e assim, podem ser um importante biomarcador de prognóstico, detecção e acompanhamento de lesões malignas, bem como no tratamento do câncer (LI *et al.*, 2017).

Conclusões

Os *primers* confeccionados para o estudo foram eficientes, visto que houve amplificação do gene selecionado e foi possível a construção da curva de eficiência, permitindo avaliar a expressão de MMP-2 em células HeLa. Estudos posteriores são necessários para melhor verificar o envolvimento deste marcador na patogenia do câncer de colo de útero.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro do projeto, ao Laboratório de Citologia Clínica por permitir a realização do estudo, e aos pesquisadores do laboratório por todo auxílio.

Referências

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, London, v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

LI, H. *et al.* The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncology letters**, Athens, v. 14, n. 5, p. 5865-5870, 2017.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for thirty-six cancers in one hundred eighty-five countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Kennesaw, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.