

ESTUDO DE GENES RELEVANTES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DA CARCINOGENESE CERVICAL E ATUAÇÃO COMO POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS

Geovanna Gobbi Szabo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Roberta Gabrielly Borges Araújo, Ana Beatriz Camillo Santos, Marcos Elias da Silva Almeida, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Cristiane Suemi Shinobu Mesquita, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientadora), e-mail: ra122224@uem.br

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, biomarcadores, PCR em Tempo Real

Resumo:

A infecção persistente por um ou mais genótipos do papilomavírus humano (HPV) de alto risco é o principal fator para o desenvolvimento da carcinogênese cervical. A expressão contínua das oncoproteínas virais, E6 e E7, podem contribuir para a transformação celular e progressão tumoral. O estudo de oncogenes expressos em níveis alterados neste processo é importante, pois estes podem atuar como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, e ainda, como possíveis alvos para terapia. Através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), é possível analisar e quantificar estes alvos moleculares. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico sobre possíveis genes que possam desempenhar um papel importante no processo de carcinogênese cervical, bem como realizar a confecção de primers de genes relevantes para a realização da técnica de qPCR. O levantamento bibliográfico foi realizado na base de dados MEDLINE (Pubmed), e, após avaliação dos resultados foram selecionados os genes para confecção dos primers. Foi possível observar que a literatura mostra uma grande diversidade de genes envolvidos na carcinogênese cervical, bem como estes podem participar de diferentes etapas do processo, como na via de morte celular, metástase/ invasão e angiogênese. Dentre eles, os genes HDAC10 e EGFR são relevantes por participarem no processo de metástase e angiogênese, e por isso foram escolhidos para confecção dos primers para futura avaliação da sua expressão através de qPCR.

Introdução

O câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil, com exceção do câncer de pele não melanoma, com uma estimativa de 16.710 novos casos, para o triênio de 2020-2022 (INCA; Brasil, 2020). O principal fator de risco para o seu desenvolvimento é a infecção persistente por

um ou mais genótipos de alto risco do papilomavírus humano (HPV), onde a expressão de oncoproteínas virais, como a E6 e E7, afetam diretamente a proliferação e diferenciação celular, promovendo a instabilidade do genoma e acúmulo de defeitos mitóticos em células infectadas, o que contribui para a transformação celular e progressão tumoral (LITWIN et al., 2017).

Proteínas e oncogênes que podem estar expressos em níveis alterados na carcinogênese cervical são importantes, uma vez que podem atuar como biomarcadores de diagnóstico, prognóstico, acompanhamento da lesão maligna e ainda, como possível alvo para terapias (LITWIN et al., 2017). Nesse sentido, a partir de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), é possível analisar e quantificar com grande sensibilidade e especificidade, alvos relevantes envolvidos neste processo (VIANA et al., 2020).

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico sobre possíveis genes que possam desempenhar um papel importante na carcinogênese cervical, bem como realizar a confecção de primers de genes relevantes para a realização de qPCR, em estudos futuros do Laboratório de Citologia Clínica e Infecções Sexualmente Transmissíveis, da Universidade Estadual de Maringá (LabCito/ UEM).

Materiais e Métodos

Levantamento bibliográfico

Foi realizado um levantamento bibliográfico para estudo e avaliação de genes relevantes envolvidos no processo de carcinogênese cervical. A busca dos artigos científicos foi feita na base de dados MEDLINE (Pubmed), com os seguintes Mesh Terms: "Uterine Cervical Neoplasms" AND "Biomarkers, Tumor". Ainda, foram definidos os seguintes critérios de inclusão: artigos completos disponíveis de forma gratuita, publicados nos últimos 10 anos e escritos em língua inglesa.

A partir da leitura dos artigos, foi realizada uma análise para avaliar os genes mais promissores para confecção dos primers, para execução da técnica de qPCR, em estudos futuros do LabCito/UEM.

Confecção e avaliação dos primers

Após o levantamento de dados no GenBank para os genes selecionados, a sequência de iniciadores (primers) foi confeccionada através dos softwares IDT, Primer 3 e Primer-BLAST para a montagem das sequências de primers Forward e Reverse. Em seguida, estas 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.

Os parâmetros considerados ideais para a reação foram: temperatura de Melt próxima a 60°C, tamanho do amplicon entre 70 a 110 pb, comprimento dos primers de 19 a 25 pb, Delta G para formação de dímeros entre -7 a 7 kcal/moles, quantidade de GC (citosina e guanina) de 45 a 50% e a temperatura para formação de hairpin de menor valor possível.

Resultados e Discussão

A partir do levantamento bibliográfico, foram encontrados 191 artigos. Destes, após leitura dos títulos e resumos foram selecionados 46 artigos científicos de interesse.

Através da leitura dos artigos foi possível observar que há uma grande diversidade de genes envolvidos no processo de carcinogênese cervical, com muitos ainda pouco conhecidos, e estes podem estar envolvidos em várias etapas do processo de carcinogênese, como na via de morte celular, processo de metástase/ invasão e angiogênese. Também, podem estar superexpressos na presença do câncer cervical ou de suas lesões precursoras, bem como, serem pouco detectados nos casos positivos.

A partir deste estudo, dois genes alvos foram escolhidos para a confecção de primers, que poderão ser usados em estudos posteriores no LabCito, o gene HDAC10, que suprime a expressão da MMP2 e -9, proteínas envolvidas no processo de metástase, sendo conhecidas por facilitar a invasão de células cancerosas e degradarem constituintes da matriz extracelular (SONG et al., 2013), e o gene EGFR, uma glicoproteína transmembranar pertencente ao receptor de tirosina quinase tipo I, que por se ligar ao fator de crescimento epidérmico (EGF) ou ligante do fator de crescimento transformador γ (TGF), leva à uma mudança conformacional, ativando uma série de vias de transdução de sinal e, eventualmente, induzindo anormalidade de células tumorais incluindo proliferação, infiltração, metástase, angiogênese e inibição de apoptose (WEI et al., 2018).

Então, foram confeccionados 4 pares de primers para o gene HDAC10 e 2 pares de primers para o gene EGFR através dos softwares IDT, Primer 3 e Primer-BLAST, com o objetivo de selecionar o melhor par de acordo com os parâmetros ideais. Após avaliação dos parâmetros de reação pelo IDT Tools e afinidade, especificidade e similaridade ao gene alvo por meio da ferramenta Clustal Omega e BLAST, os pares de primers que apresentaram melhor desempenho nas análises estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Primers selecionados para os genes HDAC10 e EGFR e parâmetros avaliados.

Gene	Sequência de primers (pb)	Hairpin (°C)	Gc (%)	Melt temp (°C)	Self dimer (kcal/mole)	Hetero dimer (kcal/mole)	Amplicon (pb)
HDAC 10 Set 4 ^F	GTT GGG ATG GGA AAC GCT GAA (20 pb)	7.1	55	57.9	-3.61	-6.12	110
HDAC 10 Set 4 ^R	GCT GAG TCA AAT CCT GCC GAA (20 pb)	10.4	55	57.6	-3.61	-6.12	

EGFR Set 2 ^F	AAG GCA GCC ACC AAT TAT GC (20pb)	30.4	50	56.2	-6.21	-6.21	74
EGFR Set 2 ^R	ATT TGG CTT GGC TTC TTG (20pb)	23.5	50	56.2	-3.14	-6.21	

F: Forward Primer; R: Reverse Primer

Conclusões

Foi possível observar que a literatura apresenta uma grande diversidade de genes envolvidos na carcinogênese cervical, e estes podem participar de diferentes etapas do processo, como na via de morte celular, metástase/ invasão e angiogênese. Os genes HDAC10 e EGFR são de extrema relevância por participarem no processo de metástase e angiogênese, e por isso foram escolhidos para confecção dos primers para futura avaliação da sua expressão através de qPCR.

Agradecimentos

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

Referências

- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Brasil. Estimativa 2020: incidência de câncer de colo uterino no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>>. Acesso em: 18 ago. 2022.
- LITWIN, Tamara R. et al. Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*, v. 9, n. 8, p. 206, 2017.
- SONG, Chenlin et al. Histone deacetylase (HDAC) 10 suppresses cervical cancer metastasis through inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 39, p. 28021-28033, 2013.
- VIANA, Magda Rogéria Pereira et al. Molecular detection of HPV and FT-IR spectroscopy analysis in women with normal cervical cytology. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 29, p. 101592, 2020.
- WEI, H. et al. Analysis of gene mutation associated with tyrosine kinase inhibitor sensitivity of epidermal growth factor receptor in cervical cancer patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 22, n. 19, p. 6280-6287, 2018.