

OBTENÇÃO DE PRIMERS DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE MORTE DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA

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

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia

Palavras-chave: câncer de mama; apoptose; PCR em tempo real

RESUMO

Mundialmente, o câncer de mama (CM) é a malignidade mais frequente nas mulheres, e é responsável por alta taxa de mortalidade. Assim, o estudo da expressão de genes relacionados à via de morte de células malignas é de extrema importância, pois pode auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos no processo da carcinogênese, bem como, na possibilidade de obtenção de novos fármacos para tratamento das pacientes. O objetivo desse trabalho foi realizar uma busca de genes relacionados à via de morte celular em linhagens de células tumorais de mama, bem como confeccionar primers, para futura avaliação da expressão destes. O levantamento bibliográfico foi realizado na base de dados MEDLINE (Pubmed), e, após análise dos artigos, foram selecionados os genes para confecção dos primers. Foi possível observar que os artigos contemplam uma grande diversidade de genes e que a principal via de morte relatada foi a via da apoptose. Dentre eles, os genes PI3KCA e ENO1 foram identificados como de extrema relevância por participarem da regulação de processos fisiológicos celulares, e por atuarem também na via de morte da apoptose, por isso foram selecionados para a confecção dos primers, para futura avaliação da sua expressão, através do PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a malignidade mais frequente entre as mulheres no mundo, com exceção dos cânceres de pele não melanoma, com estimativa de 2,3 milhões (24,5%) de novos casos. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer para o triênio 2023 a 2025, sendo que nas mulheres, exceto o câncer de pele não melanoma, o mais incidente será o CM com 74 mil (20,3%) (INCA, 2022).

O CM ocorre quando as células malignas crescem de forma desordenada na mama e comumente começam com uma hiperproliferação ductal e mais tarde evoluem para tumores benignos ou para carcinomas que podem ser metastáticos devido a vários fatores carcinogênicos. É uma doença heterogênea e seu desenvolvimento envolve

vários fatores, como predisposição genética, idade avançada, características reprodutivas, hábitos de vida e influência ambiental, de modo que aproximadamente 10% de todos os casos estão relacionados à predisposição genética e/ou associados a um histórico familiar, com variações por etnia e entre países (WINTERS, 2017).

O tratamento do CM pode ser locorregional e/ou sistêmico, visto que a decisão de escolha é influenciada pelas características histológicas e moleculares das células tumorais. Entretanto, apesar das opções de tratamento existentes, nestes são observados muitos efeitos adversos, além da resistência e comorbidades que algumas pacientes podem apresentar (WAKS e WINER, 2019).

Assim, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese e morte celular é de extrema importância para auxiliar na descoberta de novas opções e abordagens para o tratamento deste câncer. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico de genes relacionados à via de morte celular em linhagens de células tumorais de mama e confeccionar primers para futura avaliação da expressão destes, através do PCR em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

Levantamento bibliográfico

Foi realizado um levantamento bibliográfico de genes relacionados à via de morte celular em linhagens de células tumorais de mama. A busca dos artigos científicos foi feita na base de dados MEDLINE (Pubmed), com os seguintes Mesh Terms: “Breast Neoplasms” OR “Breast Cancer” AND “Apoptosis” OR “Necroptosis” AND “Biomarkers, tumor”. Para a pesquisa, foram incluídos artigos publicados nos últimos 5 anos, em língua inglesa e com resumo disponível. Além disso, foram considerados estudos *in vitro*, realizados em linhagens de células tumorais de mama, que investigaram possíveis genes com envolvimento na via de morte celular, através da metodologia de biologia molecular, PCR em tempo real. Foram excluídos artigos que não contemplavam o objetivo do estudo, revisões bibliográficas ou sistemáticas e meta-análise, e estudos *in vivo*.

A partir da leitura dos artigos, foi realizada uma análise para identificar os genes mais promissores para confecção dos primers, para avaliação de sua expressão através técnica de PCR em tempo real, em estudos futuros do Laboratório de Citologia Clínica e Infecções Sexualmente Transmissíveis (LabCito) da Universidade Estadual de Maringá.

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

O levantamento bibliográfico foi realizado a partir da ferramenta de base de dados MEDLINE (PubMed). A partir dos Mesh Terms definidos, foram recuperados 1699 artigos. Destes, 575 foram publicados nos últimos 5 anos, em língua inglesa e apresentaram resumo disponível. Após verificação dos títulos e resumos, 186 publicações foram selecionadas para leitura do texto completo. Por fim, 53 artigos atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos, e foram analisados para a escolha de possíveis genes de relevância, com envolvimento na via de morte celular, em linhagens de células tumorais de mama.

Através da leitura dos artigos foi possível observar que estes contemplam uma grande diversidade de genes importantes, e que a principal via de morte estudada foi a via da apoptose.

A partir deste estudo, dois genes alvos foram escolhidos para a confecção de primers, a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) que compreende uma família de enzimas transdutoras de sinal intracelular, que eventualmente atua na regulação de eventos fisiológicos, ou seja, regula processos como proliferação, crescimento celular e apoptose. Mutações somáticas identificadas nos genes PIK3CA são amplamente encontradas no CM e a sinalização PI3K/AKT está implicada na sua patogênese, sendo relacionada com o aumento da sobrevivência celular (XUE, 2021). Outro gene escolhido foi o alfa-enolase (ENO1), uma enzima glicolítica que catalisa a conversão do ácido 2-fosfoglicérico em ácido fosfoenolpirúvico durante a glicólise, e sua função glicolítica desregula a energia celular, estimulando a proliferação tumoral e inibindo a apoptose das células cancerígenas (HUANG, 2022).

Assim, foram confeccionados 12 pares de primers para o gene PI3KCA e 12 pares de primers para o gene ENO1 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 foram: PI3KCA— Forward— CAATCGGTGACTGTGTGGGA —Reverse— CACCTTTCAAGCCGCCTTTG; e ENO1 -Forward -TGCCCTGGTTAGCAAGAACT - Reverse -TGGCGTTTCGCACCAAACTTA. As características dos primers atingiram todos parâmetros considerados ideais para a reação. A temperatura de Melt variou entre 56.8 a 57.6, Delta G para formação de dímeros entre -6.75 a -3.61 kcal/moles e a quantidade de GC (citosina e guanina) acima de 47.6%, gerando um produto amplificado entre 87 e 107 pares de base.

CONCLUSÕES

Foi possível observar que a literatura apresenta uma grande diversidade de genes envolvidos na via de morte de células tumorais da mama. Os genes PI3KCA e ENO1 são de extrema relevância por participarem da regulação de processos fisiológicos celulares, e também por atuarem na via de morte da apoptose, principal via relatada nos artigos, e por isso, foram escolhidos para confecção dos primers para futura avaliação da sua expressão através do PCR em tempo real.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq 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

HUANG, Chen Kai *et al.* ENO1 and Cancer. **Molecular Therapy-Oncolytics**, 2022. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/oncology/fulltext/S2372-7705\(22\)00004-3](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/oncology/fulltext/S2372-7705(22)00004-3). Acesso em: 17 jun. 2023

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA. **A mulher e o câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/centrais-de-conteudo/exposicoes/a-mulher-e-o-cancer-demama-no-brasil>. Acesso em: 17 jun. 2023

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast cancer treatment: a review. **Jama**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019. Disponível em: [file:///C:/Users/TechCenter/Downloads/CANCER%20DE%20MAMA%20-%20REVISAO%20SOBRE%20TRATAMENTO%20JAMA%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/TechCenter/Downloads/CANCER%20DE%20MAMA%20-%20REVISAO%20SOBRE%20TRATAMENTO%20JAMA%20(1).pdf). Acesso em: 17 jun. 2023

WINTERS, Stella *et al.* Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 151, p. 1-32, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/320378249_Breast_Cancer_Epidemiology_Prevention_and_Screening. Acesso em: 17 jun. 2023

XUE, Chen *et al.* Crosstalk between circRNAs and the PI3K/AKT signaling pathway in cancer progression. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 400, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00788-w>. Acesso em: 17 jun. 2023