

## **PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-qPCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE RECK EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

Maria Eduarda Medeiros Dall Evedove (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isabelly Vitória da Silva Gonçalves, Ana Beatriz Camillo Santos, Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Raquel Pantarotto Souza Padovan, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador). 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:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Genes supressores de tumor; Neoplasias da mama.

### **RESUMO**

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres no Brasil, com 704 mil novos casos estimados entre 2023 e 2025. Essa neoplasia também é a principal causa de morte por câncer na população feminina. Avanços na compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese possibilitam a descoberta de novos alvos para auxiliar no diagnóstico/prognóstico e tratamento desta doença. Neste contexto, pode-se destacar o gene RECK, importante supressor tumoral, que tem mostrado potencial como biomarcador para o câncer de mama. Assim, o objetivo deste trabalho foi confeccionar *primers* para analisar a expressão de RECK, bem como padronizar a técnica de transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) para avaliação deste em células tumorais de mama. Inicialmente 25 *primers* foram desenhados, envolvendo cinco variantes para este gene, destes, apenas os da variante 2 foram totalmente validados, atendendo aos critérios estabelecidos e mostrando exclusividade para o gene RECK. Os níveis de expressão do gene RECK foram determinados por RT-qPCR e confirmada a efetividade do par de *primers* escolhido, uma vez que houve amplificação do gene de interesse. Por fim, houve padronização da técnica de RT-qPCR, no laboratório de Citologia Clínica (LabCito/UEM), para futuras avaliações da expressão do gene RECK em células de câncer de mama expostas a diversos novos tratamentos.

### **INTRODUÇÃO**

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres e a principal causa de morte relacionada ao câncer nessa população. No Brasil, estima-se 704 mil novos casos entre 2023 e 2025, com maior concentração nas regiões Sul e Sudeste (INCA, 2023).

As opções de tratamento para o câncer de mama incluem terapias locais, como cirurgia e radioterapia, e terapias sistêmicas, como hormonoterapia, quimioterapia e terapias alvo. Apesar de eficazes, esses tratamentos podem causar efeitos colaterais significativos, bem como, algumas pacientes podem desenvolver resistência, limitando sua eficácia (BEN-DROR *et al.*, 2022). Além disso, os agentes antineoplásicos nem sempre conseguem controlar o crescimento do tumor de forma efetiva. No entanto, avanços recentes na compreensão dos mecanismos moleculares do câncer têm levado à identificação de novos alvos terapêuticos, como exemplo o gene RECK (CARDEAL *et al.*, 2012).

O gene RECK é essencial na inibição da invasão tumoral, metástase e angiogênese. Pesquisas indicam que os níveis de RECK são reduzidos em vários tipos de câncer. A presença de níveis normais ou elevados de RECK em tumores está associada à diminuição do potencial invasivo e à melhora do prognóstico (CARDEAL *et al.*, 2012). Técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR), podem ser utilizadas para avaliar a expressão de RECK, fazendo dele um biomarcador importante no prognóstico e tratamento do câncer de mama.

Assim, o objetivo do projeto foi confeccionar *primers* para analisar a expressão de RECK, bem como padronizar a técnica de transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) para avaliação deste em células tumorais de mama.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Linhagem celular*

A linhagem celular utilizada nos testes foi: MCF-7 (linhagem celular tumoral de mama derivada de um carcinoma ductal invasivo e positiva para receptores de estrogênio e progesterona). As células MCF-7 foram cultivadas em condições adequadas para sua manutenção.

### *Confecção e avaliação dos primers*

Foi efetuada uma pesquisa bibliográfica no GenBank referente ao gene RECK humano (Gene ID: 8434) visando a seleção de *primers* para a técnica de RT-qPCR. Os *softwares* IDT e Primer 3 foram empregados para a elaboração dos *primers*, estabelecendo as sequências *Forward* (F) e *Reverse* (R). Com base nas

informações reunidas, as sequências foram analisadas em relação aos parâmetros de reação e afinidade pelo gene alvo utilizando as plataformas Clustal Omega, IDT Tools e a ferramenta BLAST, disponíveis no site PubMed.

Os parâmetros considerados ideais para a reação foram: Temperatura de Melt ( $T_m$ ) 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 (Guanina e Citosina) de 45 a 50% e a temperatura para formação de hairpin a menor possível. Os *primers* selecionados foram adquiridos comercialmente (*Thermo Fischer*).

#### *Extração do material genético e expressão de RECK*

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit de extração RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) seguindo as orientações do fabricante. O controle de qualidade, que envolveu avaliações de quantidade, pureza e integridade, foi executado com um espectrofotômetro (NanoDrops 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, EUA). O RNA mensageiro (RNAm) foi convertido em DNA complementar (cDNA) utilizando a transcriptase reversa com o KIT iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR- BIORAD), conforme as orientações do fabricante.

A amplificação do gene RECK foi avaliada utilizando o equipamento QuantStudio 5 (Applied Biosystems).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após conduzir investigações no PubMed, foram descobertas cinco variantes do gene RECK, que serviram de base para o desenho dos *primers*. Para cada variante, foram elaborados cinco conjuntos de *primers*, resultando em um total de 25 *primers* potenciais.

Após a avaliação quanto aos parâmetros de qualidade, as variantes 3, 4 e 5 foram eliminadas, uma vez que os *primers* desenvolvidos não satisfizeram os critérios definidos e apresentaram elevada similaridade com outros genes, o que poderia resultar em ligações cruzadas indesejadas. Entre as variantes 1 e 2, somente os dois conjuntos da variante 2 foram completamente aprovados, demonstrando exclusividade em relação ao gene RECK na análise BLAST e atendendo a todos os critérios estabelecidos de maneira adequada. Sendo assim, o par de *primer* adquirido comercialmente (*Thermo Fischer*) foi: gene RECK - *Forward* – AATGCTCCTCCACCTCACTC - *Reverse* – TGTGGCGAATAGAGGTGACA.

Os níveis de expressão do gene RECK foram determinados por RT-qPCR e a partir desse teste inicial, foi possível verificar a efetividade dos *primers* confeccionados,

uma vez que se observou presença de produto amplificado a partir do valor de Ct obtido.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o par de *primers* confeccionado para avaliar a expressão do gene RECK foi eficiente, uma vez que houve amplificação do gene de interesse. Por fim, houve padronização da técnica de RT-qPCR, no laboratório de Citologia Clínica (LabCito/UEM) para futuras avaliações da expressão deste gene em células de câncer de mama expostas a diversos novos tratamentos.

## 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

BEN-DROR, J.; SHALAMOV, M.; SONNENBLICK, A. The history of early breast cancer treatment. **Genes (Basel)**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 960, 27 maio 2022. Disponível em <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/6/960>. Acesso em: 22 ago. 2024.

CARDEAL, L. B. et al. RECK gene and its potential as a therapeutic target in cancer. **Molecular Cancer**, v. 11, n. 1, p. 55, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. **Rio de Janeiro: INCA**, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br>. Acesso em: 9 ago. 2024.