

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES BCL-2 E BAX EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RT-PCR

Julia Rissatti de Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Geovanna Gobbi Szabo, 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: Neoplasias da mama; Proteína X Associada a BCL-2; Genes BCL-2

RESUMO

O câncer de mama (CM) é mundialmente o tipo de câncer mais incidente em mulheres, excetuando-se os cânceres de pele não melanoma. Sabe-se que parte do crescimento tumoral é resultante da inibição da apoptose. Nesse contexto, as proteínas da família BCL-2 são classificadas como anti e pró-apoptóticas, como a BCL-2 e BAX, respectivamente. A amplificação gênica através das técnicas de biologia molecular tem sido cada vez mais utilizada, com destaque para a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a expressão dos genes BCL-2 e BAX em células de CM, bem como confeccionar *primers* para detecção da expressão destes por RT-qPCR. A metodologia incluiu um levantamento bibliográfico na base de dados Medline (PubMed), seguido do desenvolvimento de *primers* específicos para os genes BCL-2 e BAX. Os resultados indicaram que a regulação positiva de BAX e a redução de BCL-2 estão fortemente associadas ao aumento da apoptose celular em linhagens tumorais de CM. Adicionalmente, os *primers* desenvolvidos apresentaram alta especificidade, sendo eficazes para a detecção dos genes-alvo. Conclui-se que o conhecimento aprofundado das vias apoptóticas pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas terapias contra o CM, especialmente na indução seletiva de apoptose em células cancerígenas.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais prevalente entre mulheres, com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos estimados globalmente em 2020 (IARC, 2020) e 73.610 novos casos anuais no Brasil entre 2023 e 2025 (INCA, 2022).

O CM é uma doença complexa e as células tumorais usam diferentes vias para escapar da morte induzida pela terapia e adquirir resistência às drogas. Diante disto, é evidente a necessidade de compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese e morte celular para auxiliar na descoberta de novas opções e abordagens para o tratamento deste câncer.

Admite-se que parte do crescimento tumoral seja resultante da inibição da morte celular programada, a apoptose. Tal fenômeno é basicamente regulado pelo equilíbrio entre moléculas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Nesse contexto, a família BCL-2 (proteína 2 do linfoma de células B) compreende um conjunto de genes codificadores de proteínas da membrana mitocondrial externa que bloqueia a morte apoptótica de algumas células. As proteínas membros dessa família são classificadas como anti e pró-apoptóticas, como a BCL-2 e BAX (Proteína X Associada a BCL-2), respectivamente (Manne et al, 2021).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a expressão dos genes BCL-2 e BAX em células de CM, bem como confeccionar *primers* para detecção da expressão destes por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Levantamento Bibliográfico

Foi realizado um levantamento bibliográfico abrangente na base de dados Medline (PubMed), com o objetivo de identificar estudos que avaliaram a expressão dos genes BCL-2 e BAX em células de CM utilizando a técnica de RT-qPCR. Foram considerados os artigos publicados nos últimos 5 anos (janeiro 2019 a janeiro 2024), em língua inglesa e com resumo disponível.

Confeção e Avaliação dos Primers

A seleção das sequências gênicas dos genes BCL-2 e BAX foi realizada a partir do GenBank. Utilizou-se os softwares IDT e Primer3 para o desenho dos *primers*, considerando parâmetros como temperatura de Melt, comprimento dos *primers* e a proporção de guanina e citosina (GC).

A qualidade dos *primers* foi avaliada através de análises adicionais de alinhamento e especificidade utilizando as ferramentas Clustal Omega e BLAST, para garantir a precisão do pareamento com as sequências gênicas-alvo. Os *primers* que melhor

atenderam aos critérios estabelecidos serão adquiridos para uso em estudos futuros para avaliação destes genes por RT-qPCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento bibliográfico foi realizado utilizando a base de dados Medline (PubMed). A partir dos Mesh Terms definidos ("Breast Neoplasms" AND "Genes, BCL-2" OR "BCL-2-Associated X Protein"), 827 artigos foram recuperados. Desses, 132 artigos, publicados nos últimos 5 anos, em língua inglesa e com resumos disponíveis, foram considerados para análise. Após a verificação dos títulos e resumos 42 atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos. Esses artigos foram analisados para verificar o comportamento e expressão dos genes BAX e BCL-2 em células de CM após algum tratamento.

A revisão dos artigos revelou que a regulação da apoptose é crucial para o tratamento das células cancerígenas. Os genes BAX e BCL-2 desempenham papéis centrais na regulação da apoptose, com BAX atuando como pró-apoptótico e BCL-2 como anti-apoptótico. A maioria dos estudos analisados mostrou que tratamentos que promovem a regulação positiva de BAX e a redução de BCL-2 favorecem a indução da apoptose celular. A relação BAX/BCL-2 foi consistentemente aumentada, o que sugere um efeito positivo na indução da morte celular programada (Aborehab et al., 2021; Manne et al., 2021).

Com base nos dados levantados, foram desenvolvidos pares de *primers* para os genes BCL-2 e BAX utilizando softwares IDT, Primer 3 e Primer-BLAST. A seleção dos *primers* foi feita de acordo com parâmetros de afinidade, especificidade e similaridade com o gene-alvo, utilizando as ferramentas Clustal Omega e BLAST.

Os *primers* que apresentaram melhor desempenho foram:

BCL-2 – *Forward:* CTGGATGTTCTGTGCCTGTAA, *Reverse:* GAAGAGCAGACGGATGGAAA; com temperaturas de Melt 62.1 e 61.8°C, Delta G para formação de Homo dímeros -3.61 e -3.14 kcal/mole, Delta G para formação de Hetero dímeros -5.13 kcal/mole e conteúdo de GC 47.8% e 50%, com amplificação de 82 pares de bases.

BAX – *Forward:* CGCCCTTTTCTACTTTGCCA, *Reverse:* CCAATGTCCAGCCCATGATG; com temperaturas de Melt 62.9 e 63.1°C, Delta G para formação de Homo dímeros -5.38 e -3.61 kcal/mole, Delta G para formação de Hetero dímeros -9.28 kcal/mole e conteúdo de GC 50% e 55%, com amplificação de 92 pares de bases.

CONCLUSÕES

Os resultados destacam a importância dos genes BCL-2 e BAX na regulação da apoptose em células tumorais de CM. A modulação positiva de BAX e a redução de BCL-2 são cruciais para a indução de morte celular. Os *primers* desenvolvidos são específicos e promissores para futuros estudos. A compreensão das vias apoptóticas relacionadas a esses genes pode impulsionar novas abordagens terapêuticas no combate ao CM.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a Universidade Estadual de Maringá pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABOREHAB, N. M.; ELNAGAR, M. R.; WALY, N. E. Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 2, p. e22638, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33002289/>. Acesso em: 29 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ 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-de-mama-no-brasil>. Acesso em: 30 ago. 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Breast Cancer Awareness Month 2021**. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2021/>. Acesso em: 30 ago. 2024.

MANNE, R. K. et al. FBXL20 promotes breast cancer malignancy by inhibiting apoptosis through degradation of PUMA and BAX. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 4, p. 101253, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34587475/>. Acesso em: 30 ago. 2024.