



Padronização do método PCR Quantitativo em Tempo Real para análise da expressão do gene Receptor da Leptina no Carcinoma Epidermóide de Boca

Gustavo Romualdo de Sá, Eliane Macedo Sobrinho Santos, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Ludmilla Regina de Souza, Talita Antunes Guimarães, Andre Lútz Sena Guimarães, Lucyana Conceição Farias

Introdução

A carcinogênese de boca é um processo complexo, onde se evidencia a ocorrência de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas que possibilitam a transformação de células biologicamente normais em células genética e funcionalmente alteradas, no que se refere a desregulações da proliferação celular e invasividade nos tecidos adjacentes e/ou à distância [1,2]. Apesar dos esforços para identificar marcadores moleculares relacionados à etiopatogênese, à progressão, prognóstico e sobrevida de indivíduos acometidos pelo CEB, não há um conhecimento preciso sobre o assunto. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à carcinogênese de boca, destacando seu desenvolvimento e progressão, é um alvo de grande interesse dos estudiosos de Patologia Bucal. Estudos tem buscado investigar os aspectos genéticos e moleculares envolvidos na progressão do carcinoma epidermóide de boca, com um enfoque na expressão de genes relacionados à angiogênese aos aspectos clinicopatológicos que envolvem, principalmente, lesões bucais potencialmente cancerizáveis e o CEB [3-5]. Nesse sentido, estudos preliminares realizados por este grupo de pesquisa (dados não publicados) identificaram uma possível interação entre genes envolvidos no mecanismo da angiogênese e na sinalização da leptina no CEB. No entanto, há uma escassez de estudos que possam ser utilizados como referência para a análise quantitativa da expressão gênica da Leptina (*LEP*) ou do seu receptor (*LEPR*).

Nas últimas décadas o desenvolvimento da biologia molecular e da genética permitiu o estabelecimento de novas técnicas aplicadas à investigação biológica, entre elas destaca-se o método PCR Quantitativo em Tempo Real (Polymerase chain reaction: amplificação em cadeia da polimerase) [6]. Esta técnica é uma das formas eficazes para realizar a analisar quantitativamente a expressão de um determinado gene, a partir da utilização de amostra de RNA transcrito reversamente para um DNA complementar (cDNA), seguido pelo anelamento dessa molécula a iniciadores (*primers*) marcados com fluoróforos.

Neste contexto faz-se necessária a utilização de técnicas adequadas para a construção de *primers* e sua padronização, que sejam realmente efetivas na identificação das alterações na expressão gênica que ocorrem no carcinoma epidermóide de boca. O presente trabalho teve por objetivo padronizar o método PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) para análise da expressão do gene *LEPR* no carcinoma epidermóide de boca.

Material e métodos

A. Desenho do primer *LepR*

As sequências de nucleotídeos utilizadas para desenhar o primer foram obtidas no banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), tendo como molde sequências de RNA mensageiro (mRNA) do receptor da leptina humana (*transcript variant 2*). Em seguida, utilizou-se uma ferramenta de bioinformática (<https://genome.ucsc.edu/>) para determinar as regiões de junção exon-exon, na molécula do cDNA, complementar ao mRNA do *LEPR*. Para desenhar os oligonucleotídeos para o qRT-PCR, utilizou-se o programa específico para tal finalidade, o *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems); neste programa, as condições de anelamento, temperatura de dissociação, porcentagem de grupos CG são verificadas. Após obter os pares de oligonucleotídeos, eles foram submetidos a uma ferramenta contida no banco de dados NCBI, chamada Blast, onde é possível verificar a similaridade de anelamento com o gene alvo e com outros genes. Desta forma, para as reações de qRT-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1.

B. Padronização do primer *LEPR* e demais parâmetros do método qRT-PCR

O método *qRT-PCR* requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência, uma delas é a concentração dos oligonucleotídeos iniciadores. Foram determinadas as concentrações dos iniciadores (Forward-Reverse). E como molde da reação utilizou-se 100 ng de um *pool* de todas as amostras de cDNA do tecido adiposo humano; sendo este o tecido humano que sabidamente expressa o gene *LEPR*. Todas as reações foram



feitas em triplicata, com controles negativos e positivos para cada combinação de iniciadores. O gene utilizado como normalizador dos experimentos foi o β -Actina e as reações foram realizadas no equipamento StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems), utilizando o fluoróforo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A molécula do fluoróforo se liga à dupla fita de cDNA a cada ciclo de amplificação.

C. Curva de eficiência de amplificação do qRT-PCR

Após a determinação da concentração dos oligonucleotídeos, utilizou-se esta concentração inicial de 100ng para realizar uma curva padrão, a fim de verificar a eficiência de amplificação da reação. O parâmetro paralelismo entre as curvas dos genes alvo e endógeno (slope) de uma curva padrão é utilizado para calcular a eficiência de amplificação da reação, conforme equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. A curva padrão é obtida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação Ct (cycle threshold) sobre o log da quantidade inicial de cDNA. Um coeficiente angular da curva padrão de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência. São consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno sejam muito próximas, com tolerância de $\pm 10\%$ de variação [7]. Desta forma, para obter a curva de eficiência de amplificação da reação de PCR quantitativa foram realizadas reações utilizando um pool de cDNA do tecido adiposo humano em diluições seriadas de 1:10. Foram realizadas 5 diluições. As reações foram realizadas em triplicata e os ciclos de amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão. Ao término das amplificações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação (*Melt curve*) para que a especificidade das reações fosse garantida.

Resultados

A. Características dos primers *LepR* e padronização do qRT-PCR

Depois de desenhados os primers, alguns parâmetros foram conferidos no *Primer Express*. O primer *LepR* forward, com uma extensão de 21 pb, apresentou temperatura de melting igual a 58,2 e 48% de GC. O primer *LepR* reverse apresentou a mesma tm e 50% de GC.

A concentração determinada, tanto para genes referência quanto para genes alvo, foi de 250 nM para ambos os iniciadores (250/250). Estas concentrações foram definidas por fornecerem valores satisfatórios de Ct (Cycle threshold: ciclo de amplificação acima do limiar). Além disso, foram analisadas as curvas de dissociação, e demonstrou-se a especificidade da amplificação, sendo as temperaturas as esperadas para cada gene (Figura 1). Também se verificou, nesta curva, a ausência de estruturas secundárias, como dímeros e hairpins.

B. Curva de eficiência de amplificação da Real time – PCR Quantitativa

Os valores de slope para o *LepR* foi de -3,21, com eficiência de 104,9%. Os valores de slope e eficiência para o gene endógeno foram -3,55 e 91,38 respectivamente. Os valores de Ct foram corrigidos pela eficiência ajustando o threshold. Na Figura 2 estão detalhadas outras características da curva de eficiência, mostrando que no presente trabalho, tanto o *LepR* quanto o β -actina obtiveram resultados de eficiência dentro dos limites estabelecidos, podendo por tanto, serem analisados pelo método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Como desejado, as reações que não continham cDNA, ou seja, as reações controle, não apresentaram nenhum tipo de amplificação. A β -actina foi escolhida como controle endógeno pelo fato de ser expressa de maneira constante e abundante nas células de mamíferos.

Discussão

Primer, ou iniciador, é uma pequena cadeia de nucleotídeos, em que, a partir de sua extremidade 3', a enzima DNA polimerase iniciará a incorporação de nucleotídeos, tomando como base uma fita de DNA molde (a qual o primer se acopla), formando uma nova fita de DNA. Primers são sequências iniciadoras do processo de síntese e correspondem a curtas cadeias de nucleotídeos complementares à região inicial (primer forward) da primeira fita molde e à região final (primer reverse) da segunda fita molde da sequência que se deseja amplificar, dita sequência alvo. O primer forward sintetiza o DNA em direção ao primer reverse e vice-versa. Primers são produzidos *in vivo* ou *in vitro*. *In vivo*, os primers são produzidos por uma RNA polimerase especial chamada Primase [8]. Primers são utilizados para reações de PCR e para sequenciamento. O desenho do primer é uma das mais importantes etapas para que se tenha uma reação de PCR bem sucedida [9]. No presente trabalho o primer *LepR* cumpriu com os requisitos estabelecidos para desempenhar sua função para a análise da expressão gênica, mostrando-se eficiente para prosseguir com a condução dos trabalhos de forma confiável e reprodutível.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Todos os valores de eficiência obtidos, para a padronização do método *qRT-PCR* para a análise da expressão do gene *LEPR*, estão dentro do intervalo de 90% a 110%; os primers *lepR* (alvo) e *B-actina* (endógeno) delineados e testados experimentalmente, podem ser utilizados nos experimentos de investigação de alterações genéticas do carcinoma epidermóide de boca, relacionadas à sinalização da leptina; sendo este o primeiro passo para buscar esclarecimentos sobre o papel da leptina e seus receptores no estabelecimento e progressão das neoplasias de boca.

Referências

- [1] JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics*. 2002 Jun;3(6):415-28.
- [2] RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006 Jan 31;174(3):341-8.
- [3] SEETHALAKSHMI, C. Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) - Role of Genetics: A Literature Review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2013 Aug;7(8):1824-6.
- [4] CHOI, S.; MYERS, J.N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*. 2008 Jan;87(1):14-32.
- [5] SUGERMAN, P.B.; JOSEPH, B.K.; SAVAGE, N.W. Review article: The role of oncogenes, tumour suppressor genes and growth factors in oral squamous cell carcinoma: a case of apoptosis versus proliferation. *Oral diseases*. 1995 Sep;1(3):172-88.
- [6] SAUNDERS, N.A. Real-time PCR In: *Methods Mol Biol* 266: 191-211, 2004.
- [7] LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, v.25, p.402–408, 2001.
- [8] SILVA, F. H. Módulo: *Biologia Molecular*. I Escola Brasileira de Inteligência Artificial e Bioinformática - InBio - São Carlos-UFScar, 20018
- [9] ALKAMI Biosystems. *Alkami Quick Guide for PCR*. United States of America: Guanabara Koogan, 1999.

Tabela 1. Sequências de primers utilizadas na amplificação por PCR

Gene	Sequências de primers (5' – 3')	Amplicon (pb)
LepR	F: CGTTAAAGCTCTCGTGGCATT	78
	R: AATCCTCTAAGGCACATCCCAG	
β-actina	F: TGCCGACAGGATGCAGAAG	76
	R: CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	

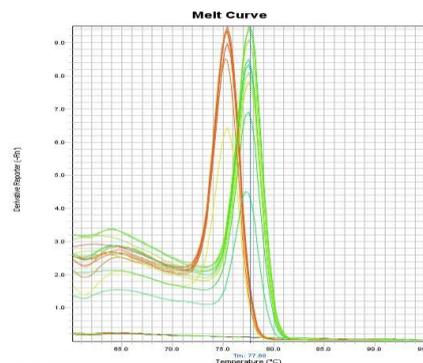


Figura 1. Curva de dissociação, em duplicata, para os genes alvo (*LepR*) e de referência (*β-Actina*).

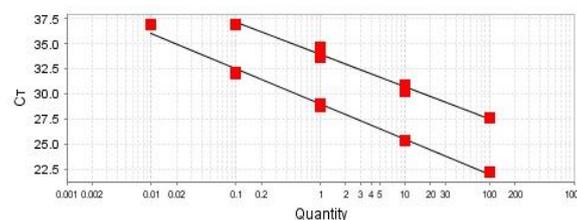


Figura 2. Curva de eficiência obtidos para os genes de referência *β-Actina* (slope=-3,55, $r^2=0,99$) e alvo *LepR* (slope=-3,21, $r^2=0,99$).