

CB. Investigação do impacto do silenciamento de HJURP na sobrevivência de linhagens celulares tumorais de diferentes tecidos

Daniel Gomes de Sousa¹, Geovana Navegante¹, Mateus Priolo Grejo¹, Pedro Vinícios de Oliveira Baracat¹, Valeria Valente¹.

¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr), UNESP.

Introdução: Já foi demonstrado que a proteína HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) mostra uma forte relação entre seus altos índices de expressão e a progressão tumoral mais agressiva, para cânceres de diferentes origens. A técnica de silenciamento gênico transitório via transfecção com moléculas de siRNAs é uma poderosa ferramenta já utilizada em estudos do grupo, onde notou-se que o *knockdown* de HJURP em linhagens de glioma afetou negativamente a proliferação e formação de colônias, enquanto linhagens de fibroblasto não-tumorais não foram significativamente afetadas. **Objetivo:** Traçar o perfil de expressão de HJURP, em nível de mRNA e proteína, em linhagens tumorais e não-tumoral de diferentes tecidos, seguido de seu silenciamento gênico e análise dos efeitos causados, observando a proliferação celular e a taxa de senescência após o silenciamento. **Metodologia:** Todas as linhagens (MDA-MB-231, A549, HSC3 e HDFn) foram cultivadas em DMEM devidamente suplementado com soro fetal bovino, exceto a linhagem não-tumoral HDFn, onde adicionou-se também uma solução de aminoácidos não essenciais à 1% v/v. Para qRT-PCR, foi feita a extração do RNA, a transcrição reversa e a reação de amplificação em condições padrão. A extração de proteínas totais foi feita em tampão de lise RIPA e o *western blot* foi realizado em condições padrão. O silenciamento gênico foi feito com Lipofectamina RNAi MAX (Thermo Scientific), sendo verificado sua eficácia por qRT-PCR e *western blot*. **Resultados e Discussão:** Determinadas as linhagens a serem utilizadas, seguiu-se para detecção dos níveis normais do mRNA de HJURP, para averiguar a elegibilidade de cada uma para os ensaios seguintes. Considerando HDFn como condição controle, HJURP estava aumentada em 61 vezes para A549, 107 vezes para MDA-MD-231 e 65 vezes para HSC3. Ao realizar novas triplicatas com maior massa celular, os resultados foram significativamente diferentes. Levantou-se a hipótese da alta confluência celular inibir a proliferação da linhagem saudável, levando a diminuição da expressão de HJURP, muito envolvida na progressão celular. Portanto, os ensaios estão sendo reavaliados e padronizados para uma condição adequada ao estudo, em relação à quantidade de células plaqueadas e à detecção de HJURP na linhagem controle, que revelou expressão muito baixa deste gene. Já para o *western blot*, considerando HDFn como condição controle, obteve-se uma expressão proteica de 1,82 vezes para A549, 0,98 vezes para MDA-MB-231 e 0,96 vezes para HSC3. O silenciamento gênico já foi realizado para as linhagens A549 e MDA-MD-231, atingindo eficiências de silenciamento de 34% e 3% aproximadamente. **Conclusão:** É notório que os dados produzidos até o momento não são conclusivos para identificar o papel de HJURP na sobrevivência tumoral, uma vez que as condições de silenciamento e detecção de HJURP estão sendo padronizadas. Portanto, serão realizadas novas repetições do experimento, como também melhorias nos processos de extração e análise.

Apoio financeiro: Processo nº 2022/09066-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq – PIBIC (PROPe Unesp Nº 04/2022).