

Mayumi Zanotta Oyama<sup>1</sup> ; Guido Lenz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biofísica – UFRGS, Porto Alegre, RS  
oyama.mayumi@gmail.com

## INTRODUÇÃO

- ▶ Em 2006, Takahashi e Yamanaka demonstraram que células fetais e adultas de camundongo tiveram o seu estado diferenciado alterado pela expressão de quatro fatores de transcrição (Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc), reprogramando uma pequena fração destas em células pluripotentes induzidas (iPS).
- ▶ Entretanto, uma das características fundamentais das iPS é a formação de teratomas, crescimentos malignos caracterizados pela presença de células dos três folhetos embrionários, que impedem o uso clínico dessas células.
- ▶ **Oct4** parece ser o mais potente dos fatores de reprogramação, pois sua ausência impossibilita a reprogramação e, por outro lado, sua superexpressão, de forma isolada, pode produzir reprogramação celular. Além disso, a redução da expressão de Oct4 aumentou a sensibilidade das células tumorais após o tratamento com cisplatina.

## METODOLOGIA

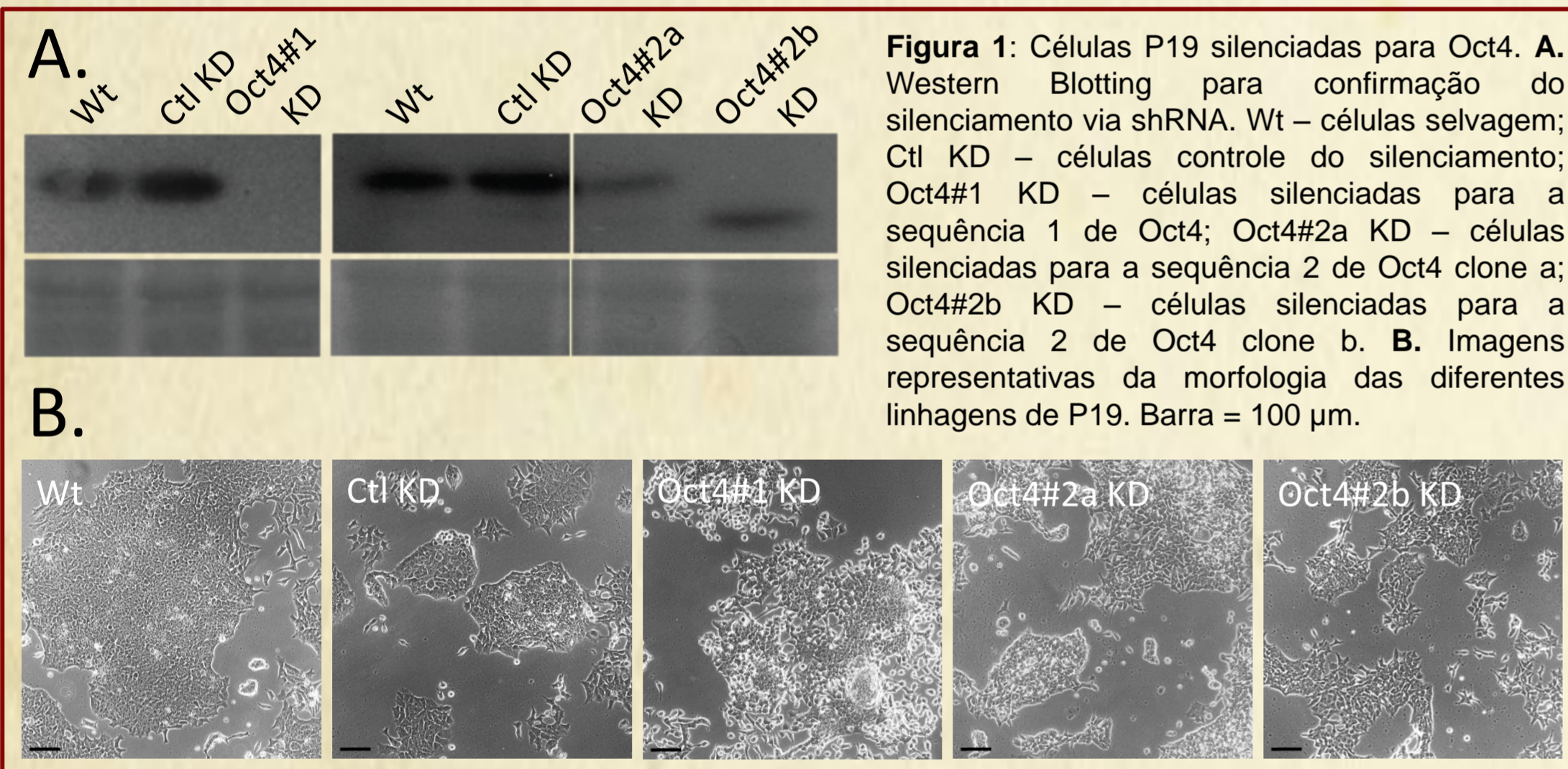
- ▶ Células da linhagem P19 (teratocarcinoma de camundongo semelhante às iPS)
- ▶ Silenciamento por shRNA
- ▶ Western Blot
- ▶ *Cumulative Population Doubling* (CPD)
- ▶ Ensaio Clonogênico

## OBJETIVO

Analisar a sensibilidade de células da linhagem de teratocarcinoma de camundongo (P19) silenciada para Oct4 após o tratamento com cisplatina (CDDP), etoposídeo (VP-16) e combinação.

## RESULTADOS

Células P19 foram silenciadas via shRNA para Oct4, utilizando duas sequências diferentes Oct4#1 e Oct4#2. A confirmação do silenciamento foi realizada via Western Blotting sendo que a segunda sequência gerou dois clones com expressão reduzida (Oct4#2a) ou ausente (Oct4#2b) (**Figura 1A**). Além disso, podemos observar que a morfologia das células não apresentou alterações (**Figura 1B**).

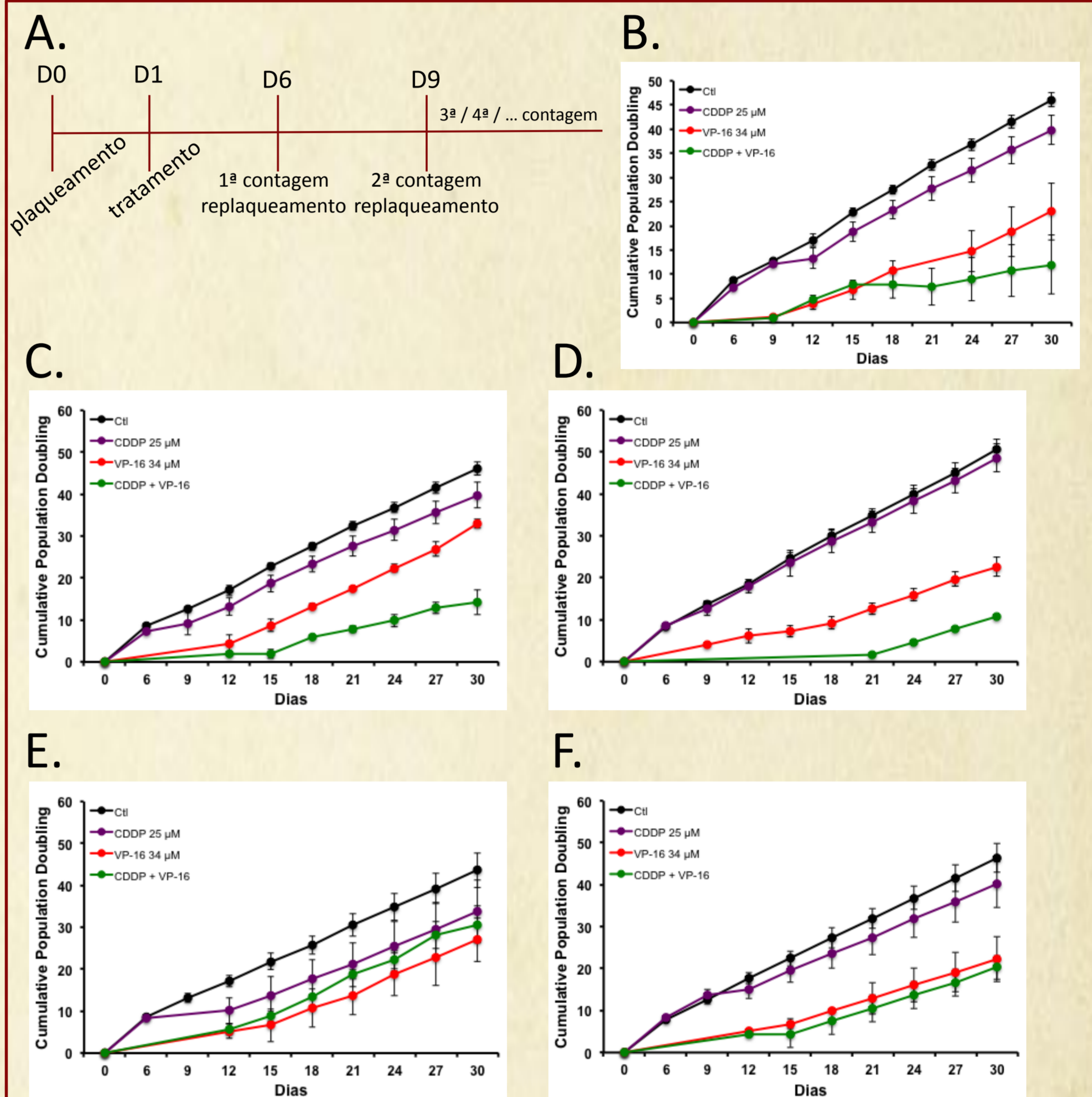


Avaliamos a proliferação e sensibilidade ao tratamento com CDDP, VP-16 ou a combinação das células controle (selvagem – Wt; e controle de silenciamento – Ctl KD) e a células silenciadas (Oct4#1 KD, Oct4#2a KD e Oct4#2b KD) pelos métodos de Cumulative Population Doubling (**Figura 2**) e Ensaio Clonogênico (**Figura 3**).

O CPD é o resultado da soma dos valores de PD obtidos por dia (**Figura 2A**). Os resultados do CPD demonstraram que a redução da expressão de Oct4 não alterou a sensibilidade à CDDP. Tanto o tratamento com VP-16 quanto a combinação teve efeito em retardar o crescimento tanto nos controles quanto nas células silenciadas (**Figura 2B-F**). Entretanto, OCT4#1 KD apresentou uma recuperação mais lenta após o tratamento com a combinação (**Figura 2D**).

Análise da capacidade de formar colônias demonstrou que poucas células conseguiram sobreviver ao tratamento e formar colônias após o tratamento (**Figura 3A e B**). Observamos também que as silenciadas Oct4#2a e Oct4#2b controle apresentaram menor eficiência em formar colônias (**Figura 3C**).

Os dados demonstram que apesar de poucas células conseguirem sobreviver ao tratamento e gerar colônias (**Figura 3**) elas são capazes de voltar a proliferar tanto quanto ao tratamento controle em relação ao tratamento com CDDP. O tratamento com VP-16 e combinação conseguiu retardar a proliferação (**Figura 2**).



**Figura 2:** Análise da proliferação e sensibilidade à Cisplatina (CDDP 25 µM), ao Etoposídeo (VP-16 34 µM) ou a combinação via Cumulative Population Doubling (CPD). **A.** Esquema do experimento de proliferação. Células foram plaqueadas e 24 h após tratadas com as doses indicadas nos gráficos. Depois de 5 dias, retirou-se o tratamento e foi realizada a primeira contagem e replaqueadas. **B.** CPD das células Wt. **C.** CPD das células controle de silenciamento – Ctl KD. **D.** CPD das células Oct4#1. **E.** CPD das células Oct4#2a. **F.** CPD das células Oct4#2b.

