

SALÃO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XXIX SIC

UFRGS
PROPESQ



múltipla 
UNIVERSIDADE
inovadora  inspiradora

Evento	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2017
Local	Campus do Vale
Título	ESTUDO DA INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA RESISTÊNCIA À TERAPIA DO CÂNCER
Autor	LUIZA CHEROBINI PEREIRA
Orientador	GUIDO LENZ

ESTUDO DA INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA RESISTÊNCIA À TERAPIA DO CÂNCER

Luiza Cherobini Pereira, Guido Lenz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Um dos maiores desafios no estudo do câncer atualmente é o desenvolvimento de resistência a tratamentos, que está fortemente relacionada à heterogeneidade tumoral. Nesse contexto, análises de células únicas têm surgido como uma estratégia para observar variações no comportamento de células individualmente. Com isso, o objetivo desse trabalho é produzir células que emitem fluorescência verde através da expressão de GFP para que seja possível a análise de crescimento e resistência de colônias derivadas de células únicas em populações celulares mais densas. Para isso, foi necessário um vetor lentiviral, que foi produzido utilizando um sistema de terceira geração. Para a transdução, foi preparado um mix contendo os plasmídeos Rev, RRE, VSV-G e o plasmídeo de interesse contendo os genes responsáveis pela expressão de GFP, mas sem marcadores de seleção. A proporção utilizada para esses plasmídeos foi 2:1,5:4, respectivamente. Para a transfecção em células empacotadoras HEK-293T foi usado o polímero catiônico Polyethylenimine (PEI) que se liga ao DNA formando um complexo capaz de transfectar células de mamíferos. Após 48h, o sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado, adicionado a células de glioblastoma da linhagem A172 e centrifugado por 45min com polibreno para ocorrer a transformação. As células foram mantidas em meio DMEM Low com 10% de soro fetal bovino, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Para a clonagem, foram plaqueadas 8 células por poço em uma placa de 96 poços com o intuito de gerar colônias de células únicas expressando o marcador. Ao final, obteve-se uma colônia onde todas as células expressavam GFP. A fim de comparar a velocidade do crescimento das células transformadas ao de células selvagens, foram plaqueadas baixas densidades de células – para que se formassem colônias de células únicas – e foram feitas imagens utilizando o citômetro de células aderidas MiniMax 300 acoplado à plataforma de detecção Spectra Max I3. Em seguida, o número de células por colônia foi contado utilizando o software ImageJ. Esse dado foi utilizado para o cálculo de duplicação populacional (PopulationDoubling – PD) ao longo do tempo, representado pela fórmula $PD = (\ln N(T_f) - \ln N(T_o)) / \ln 2$, sendo que $N(T_f)$ corresponde ao número final de células da colônia e $N(T_o)$, ao número de células da colônia na data anterior. Para as células de glioma selvagem, foram plaqueadas 214 células por poço e foram feitas imagens e trocas de meio no 8º, 11º e 15º dia após o plaqueamento. Para as células transformadas, também foram plaqueadas 214 células por poço e as imagens e trocas de meio foram feitas no 1º, 4º e 7º dia. A partir dessas análises, foi possível observar que em ambos os tipos celulares, selvagem e transformada, a velocidade de crescimento foi igual. Entretanto, a variância entre colônias é menor em células transformadas. Acredita-se que isso se deve ao pequeno número de gerações gerado desde a clonagem. Posteriormente, essa hipótese será testada e então serão realizados plaqueamentos combinando células transformadas e não transformadas na proporção de 1:1000 e imagens serão feitas periodicamente para que se possa aferir as características de crescimento das células transformadas quando na presença de maiores densidades celulares. Também serão feitos diferentes regimes de tratamento com quimioterápicos com a finalidade de avaliar a resistência populacional.