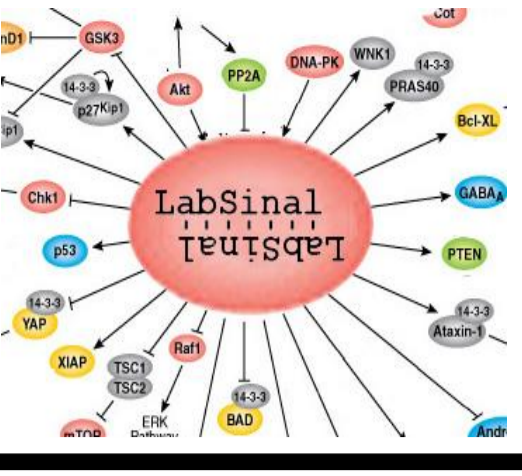


Avaliação do Silenciamento de XIAP e da Superexpressão de p53 no Mecanismo de Autofagia em Gliomas

Hütten, MO, Silva, AO; Lenz, G

Laboratório de Sinalização Celular, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



INTRODUÇÃO

Gliomas são o subtipo mais comum de tumores do SNC e caracterizam-se por ser muito agressivos, altamente invasivos e neurologicamente destrutivos, sendo o Glioblastoma multiforme (GBM) a forma mais maligna. Mesmo com a utilização de diversos tratamentos, como quimioterapia e radioterapia, o prognóstico de sobrevivência dos pacientes é de 12 a 18 meses.

A proteína XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), superexpressa em muitos tumores, contribui para a malignidade dos GBM's por ter ação anti-apoptótica através da inibição direta das caspases 3, 7 e 9.

p53 é uma proteína supressora tumoral responsável pelo controle e manutenção da homeostase celular. Esta atua como um sensor de dano ao DNA ou de oncogenes e, a partir daí, regula diversos mecanismos celulares como ciclo celular, apoptose, senescência, autofagia, dentre outros.

Autofagia é um processo fisiológico celular de degradação e reciclagem de proteínas e organelas que, em cânceres, desencadeia mecanismos distintos com atividades opostas, podendo atuar tanto como supressora tumoral, ao levar à morte autofágica, quanto ajudando células tumorais a sobreviverem sob condições adversas.

OBJETIVO

Avaliar, na linhagem de glioma U87, os efeitos do silenciamento de XIAP combinado com a superexpressão de p53, na proliferação celular e na autofagia.

RESULTADOS

Transfecção das linhagens de glioma U87wt e U87Xi (controle GFP)

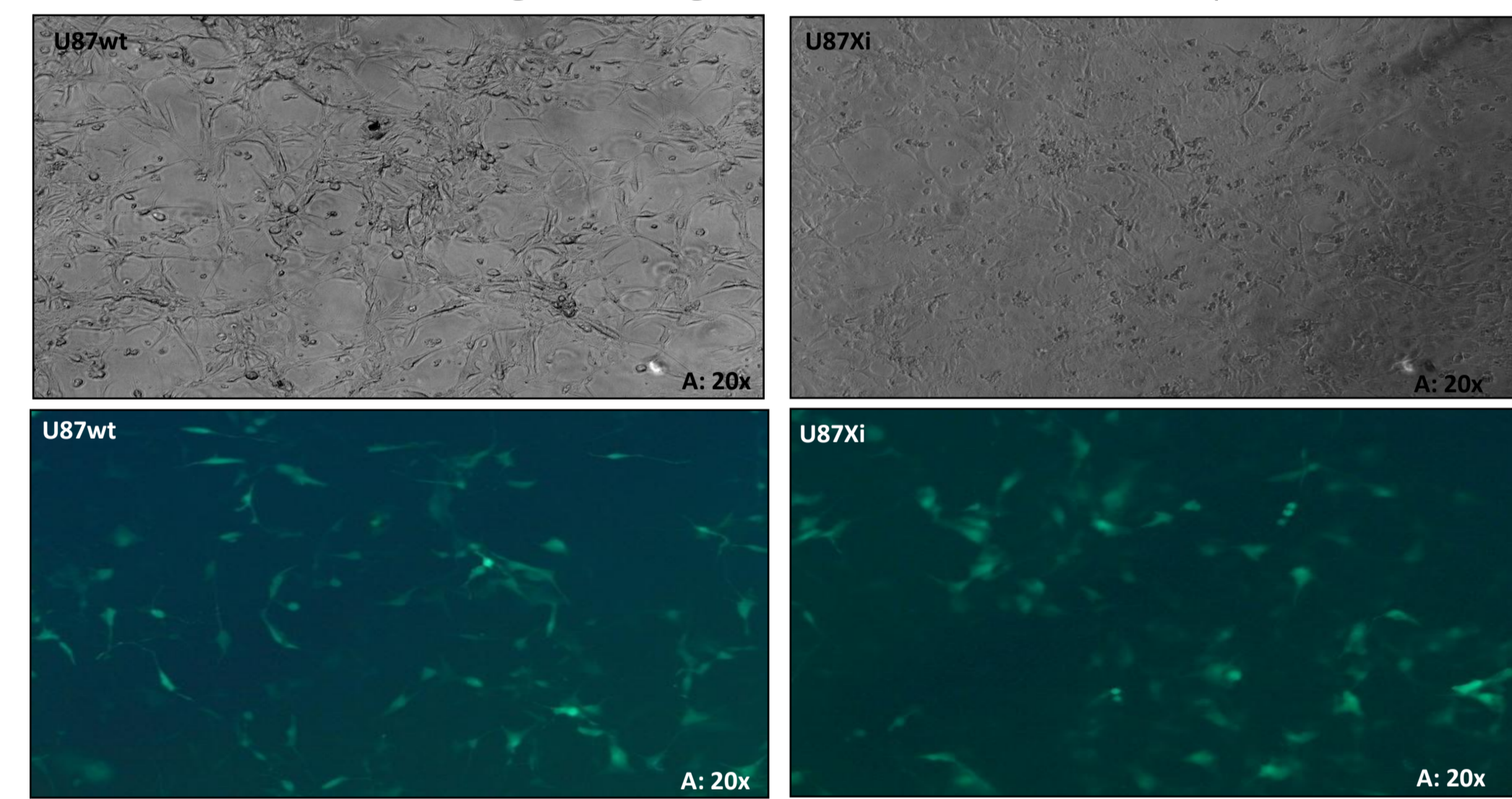


FIGURA 1 – Eficiência de transfecção equivalente das linhagem U87 selvagem e silenciada para XIAP. Fotos de microscopia de fluorescência mostram culturas de U87wt à esquerda e de U87Xi à direita após 48h de transfecção. Fotos em luz visível e luz UV mostram níveis semelhantes de transfecção em ambas as linhagens.

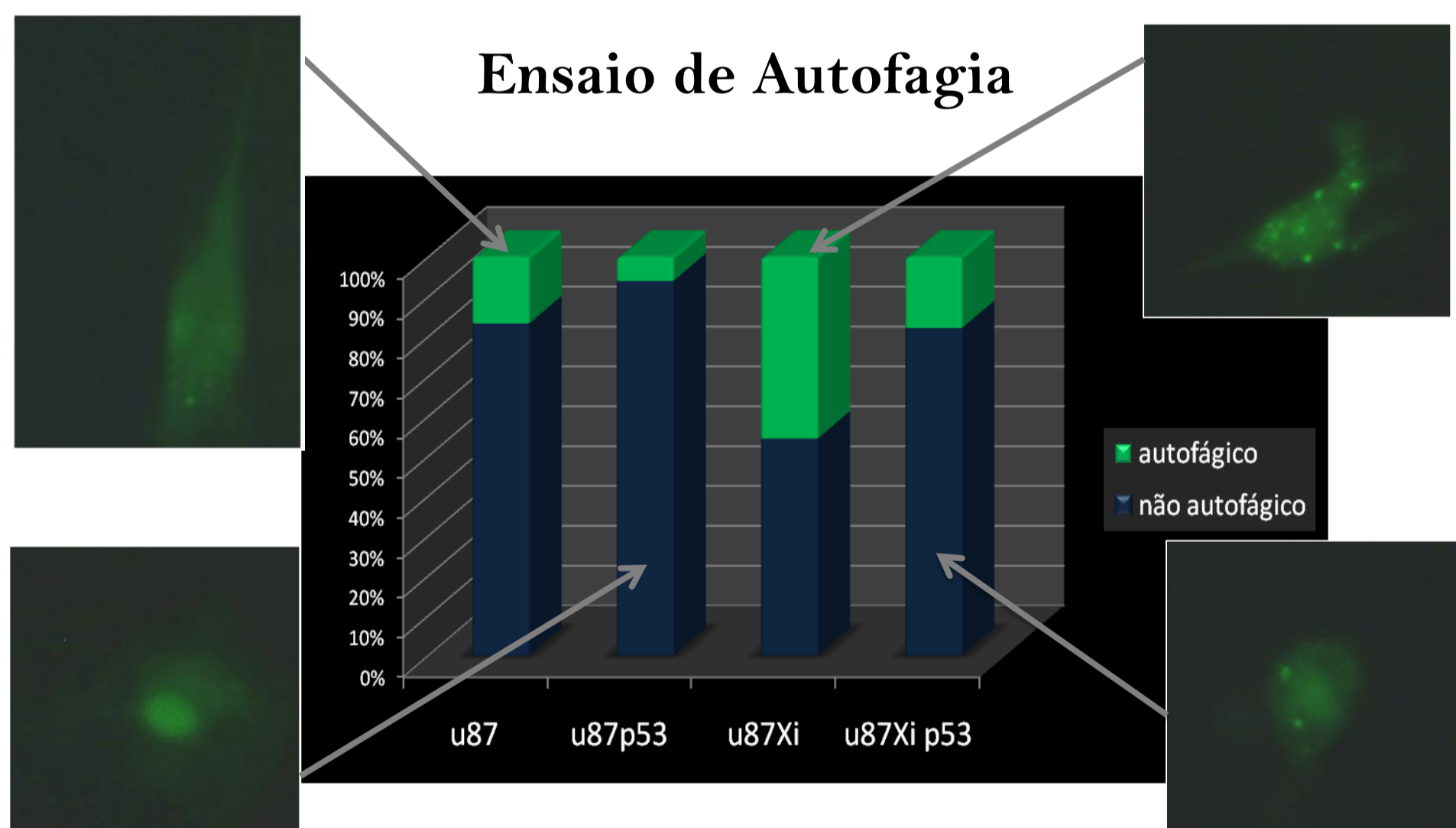


Figura 3 – Silenciamento de XIAP aumenta o número de células com autofagia. A presença de mais de 5 autofagossomos marcados em cada célula foi considerado positivo para autofagia. Ambas as linhagens, após superexpressão de p53, apresentam redução no processo autofágico. Fotos de microscopia de fluorescência. Dados em porcentagem. (n=1)

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens Celulares – Foram utilizadas linhagens de GBM U87, na sua forma selvagem (wt) e silenciada para XIAP (Xi) através de RNAi. Células foram mantidas em meio DMEM Low Glicose, suplementado com 10% SFB, a 37°C e 5% CO₂.

Transfecção – Lipofectamina LTX foi usada na cotransfecção de pLC3-GFP (Autophagy Marker Light Chain 3 fusionada com a proteína fluorescente verde) com pCMVp53, e também na cotransfecção de pEGFP-N1 com pCMVp53. O controle da transfecção foi feito usando apenas pGFP-N1.

Population Doubling (PD) – Foram plaqueadas 5 x 10⁴ células/poço em placas de 24 poços. 24h depois, as células foram transfectadas e, nos dias 2, 5, 7 e 10 após a transfecção, o Population Doubling foi determinado a partir da fórmula PD=[log N(t)*logN(to)]/log 2, onde N(t) é o número de final de células por poço no tempo de passagem, e N(to) é o número inicial de células semeadas. Os valores obtidos foram inseridos em um gráfico de PD cumulativo contra o tempo de cultura.

Western Blot – Extrato protéico foi submetido a SDS-PAGE, transferência para membrana de PVDF, bloqueio com MTTBS (5%) por 1h e incubação overnight a 4°C com anticorpos para Bcl-xL (1:1000; Cell Signaling), XIAP (1:1000; Cell Signaling) e p53 (1:500; Santa Cruz).

Ensaio de Autofagia - Após 24h de transfecção com plasmídeo contendo LC3-GFP, foram contadas 100 células GFP positivas por poço, através de microscopia de fluorescência. A presença de mais de 5 autofagossomos marcados com GFP por célula foi considerada positiva.

Ensaio de Population Doubling Cumulativo (PD)

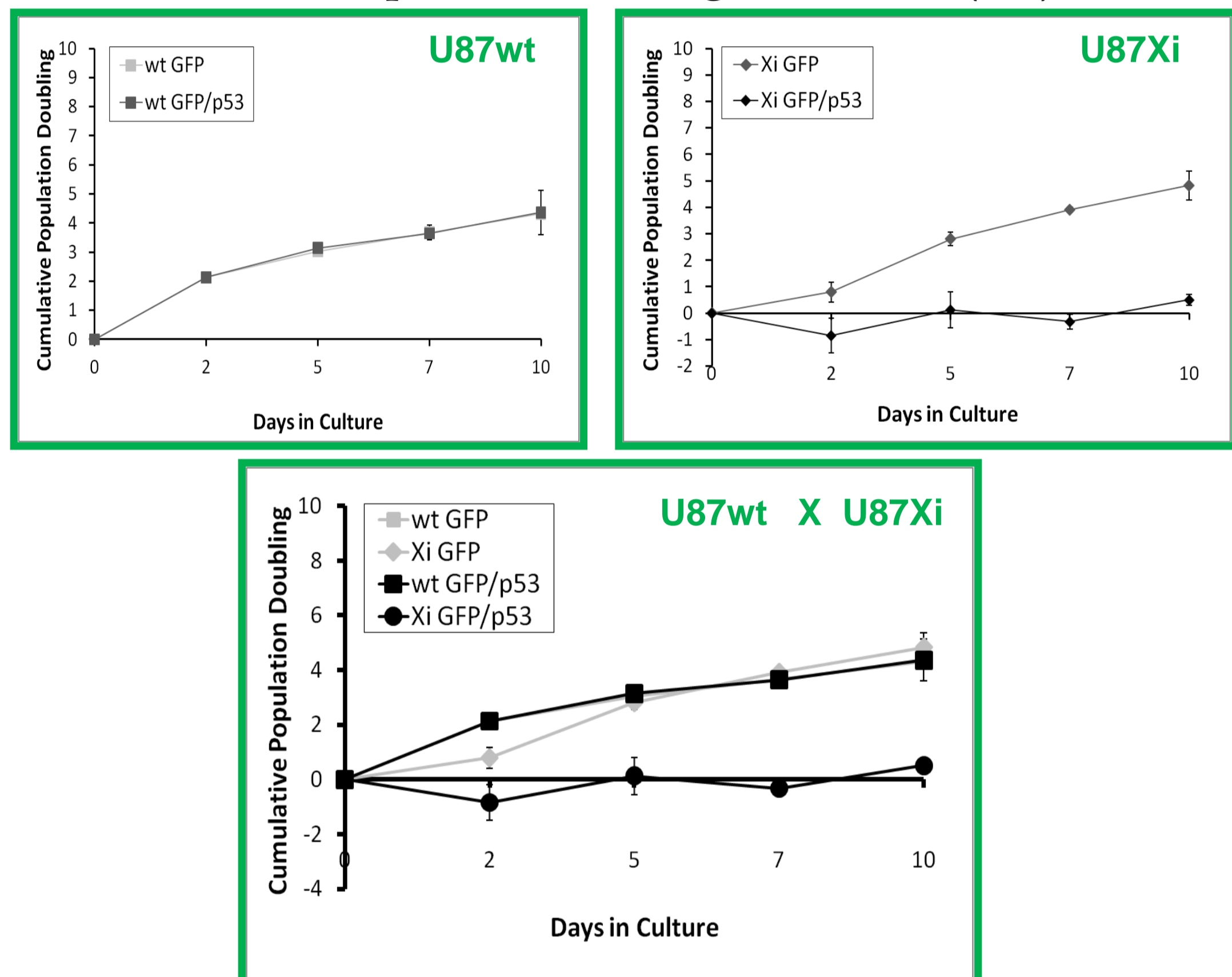


FIGURA 2 – Silenciamento do XIAP combinado com superexpressão de p53 reduz as taxas de proliferação celular. Todos os dados foram expressos com média ± desvio padrão. (n=5)

Western Blot

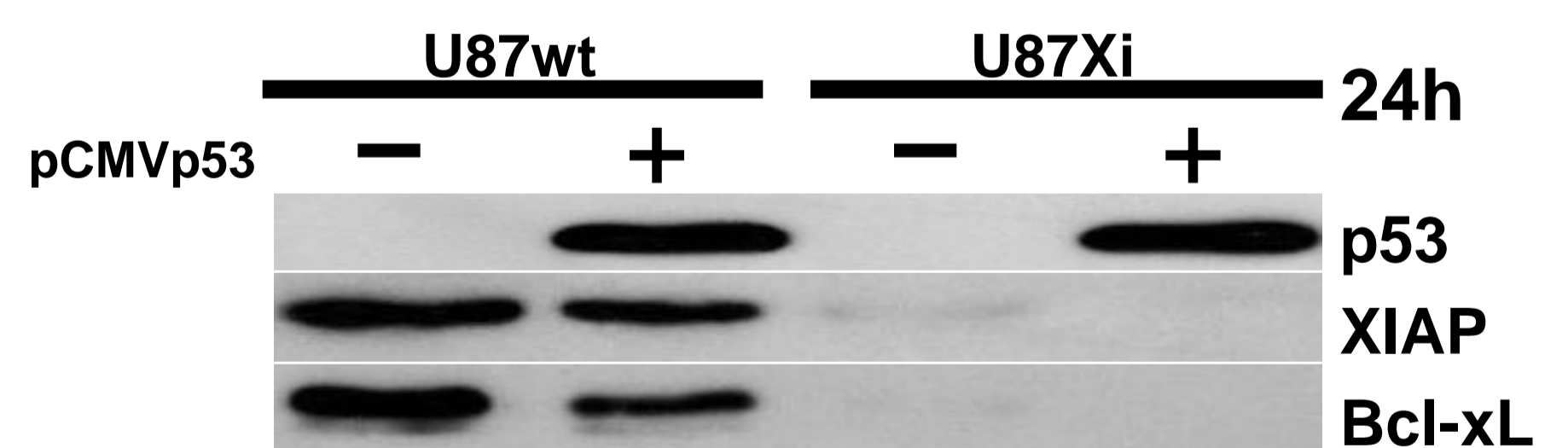


FIGURA 4 – Silenciamento de XIAP reduz os níveis de Bcl-xL. Na linhagem wt os níveis de Bcl-xL se mantiveram elevados, mesmo após superexpressão de p53; já na linhagem Xi, independentemente dos níveis de p53, houve uma redução nos níveis de Bcl-xL. Perfil protéico analisado após 24h (n=2)

DISCUSSÃO

Os resultados da figura 1 mostram que a transfecção foi realizada com sucesso em ambas as linhagens, comprovando a eficiência da metodologia aplicada.

Ao analisar os dados de proliferação celular nos gráficos de Population Doubling foi possível constatar que as células U87wt mantiveram uma taxa de proliferação semelhante, mesmo após a superexpressão de p53. Contrastando com esse resultado, na linhagem silenciada para XIAP, após a superexpressão de p53, ocorre uma diminuição evidente na taxa de proliferação, indicando que o tratamento combinado é mais eficiente na prevenção da expansão tumoral, independente do mecanismo pelo qual isso ocorra (figura 2).

O ensaio de autofagia, através da constatação de autofagossomos marcados pela proteína fluorescente verde, mostra que em U87 silenciada para XIAP ocorre um aumento no número de células marcadas positivamente quando comparado com a linhagem selvagem (U87wt).

Ao superexpressar p53 em ambas as linhagens, o efeito de redução no número de células marcadas foi o mesmo, porém mais evidente na Xi, que apresentou uma redução de 50% para 20% de células marcadas (figura 3). O perfil de expressão protéica, mostrado na figura 4, deixa evidente o silenciamento de XIAP e superexpressão de p53, e um dos efeitos dessa intervenção foi a redução dos níveis de Bcl-xL na linhagem Xi, independente de p53. Isso justifica o aumento no número de células autofágicas em Xi comparada com a wt, uma vez que proteínas da família da Bcl-2 inibem o processo de iniciação da autofagia (S Luo et al. 2010).

Assim, pode ser que a redução de Bcl-xL facilite a indução do processo de autofagia, o que não acontece na linhagem wt, já que esta mantém altos níveis de Bcl-xL. A redução no número de células autofágicas ao superexpressar p53 acontece pelo fato de que p53 pode estar direcionando as células tumorais para processos antiproliferativos (Agarwal ML, 1998);