

INFLUÊNCIA DO SILENCIAMENTO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA PROLIFERAÇÃO, MORTE E RESISTÊNCIA A QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS DE GLIOMA.

INTRODUÇÃO

A reprogramação celular, descrita em 2006 por Shinya Yamanaka, é o processo no qual uma célula já especializada se torna novamente indiferenciada (pluripotente), por meio da expressão forçada e transitória de fatores de transcrição específicos. Essas células, denominadas células pluripotentes induzidas (IPS), são similares às células tronco embrionárias. Esses fatores de transcrição, usados para reprogramar as células, estão relacionados com a manutenção da pluripotencialidade das células tronco e acredita-se que eles estejam diretamente ligados com a progressão e agressividade tumoral. O objetivo deste trabalho é estudar o efeito do silenciamento, mediado por shRNA, de fatores de reprogramação celular específicos (c-myc, nanog, sox-2, klf4 e oct-4) na proliferação, morte e resistência ao tratamento com quimioterápicos em gliomas.

METODOLOGIA

O silenciamento foi mediado pela inserção de um vetor viral contendo a sequência de shRNA específica para os fatores de interesse. A confirmação da transdução foi realizada por meio de seleção com puromicina. As linhagens celulares de glioma C6 (rato), selvagem e silenciadas para fatores de reprogramação específicos, foram mantidas em condições padrão. Para avaliar possíveis diferenças no crescimento, morte e resistência das linhagens de glioma selvagens e silenciadas, foram realizados ensaios de proliferação celular com os quimioterápicos Doxorrubina na concentração 10 nM e Cisplatina na concentração 1 µM, ensaio clonogênico para avaliar o número e tamanho das colônias formadas com o quimioterápico Temozolomida na concentração 30 µM e ensaio de migração celular (*scratch-wound*). A análise do número e área das colônias foi feita utilizando os programas Image J e Image Pro-Plus, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

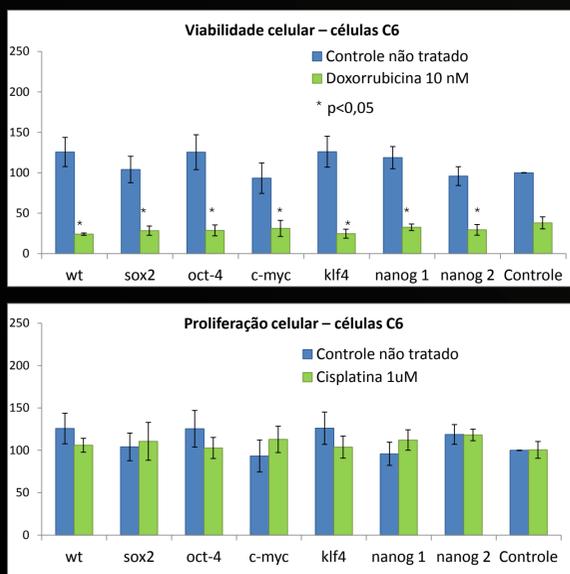


Figura 1: Ensaios de viabilidade celular (MTT). Média de crescimento da linhagem C6 wt, controle e silenciada para fatores de transcrição específicos, após tratamento com Cisplatina 1 µM e Doxorrubina 10 nM, em comparação com a respectiva linhagem não tratada. Dados expressos em média erro padrão. (n = 5)

O tratamento com Doxorrubina 10 nM, causou uma diminuição significativa da viabilidade celular nos clones silenciados para sox2, oct-4, c-myc, klf4 e para os dois clones de nanog (p<0,05, em comparação com suas respectivas linhagens não tratadas). O tratamento com Cisplatina 1 µM não mostrou diferenças significativas de viabilidade.

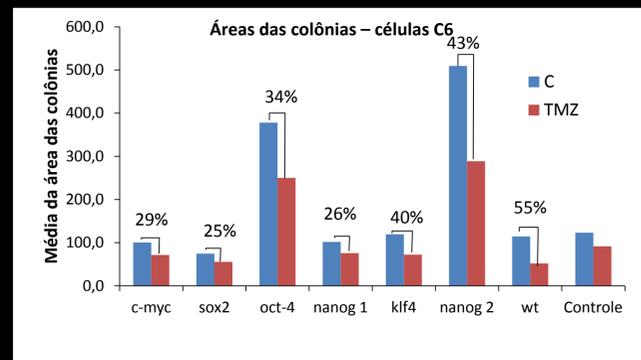
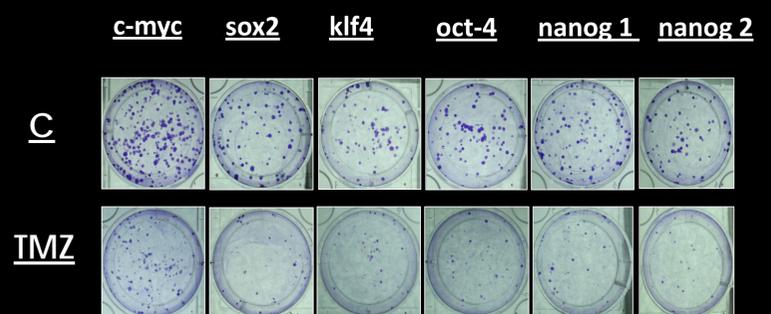
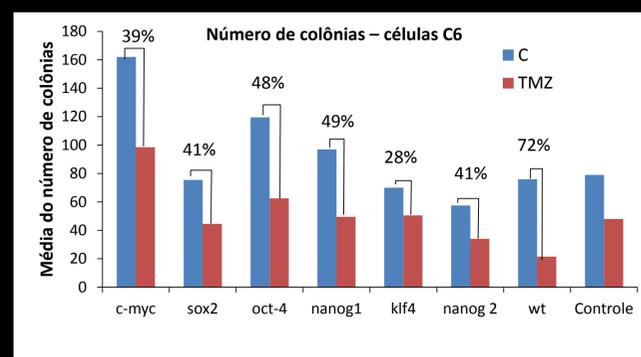


Figura 2: Ensaios de formação de colônias. Média do número e da área das colônias formadas das linhagens wt, controle e silenciadas, após o tratamento com Temozolomida 30 µM (TMZ). (n = 2)



O tratamento com Temozolomida 30 µM (TMZ), por 7 dias, houve a diminuição do número de colônias formadas para todos os clones silenciados, em comparação com sua respectiva linhagem não tratada, porém essa diminuição não se mostrou significativa quando comparada com a linhagem selvagem. O tratamento com Temozolomida 30 µM também se mostrou eficaz na diminuição da área das colônias formadas nos clones silenciados quando comparados com suas respectivas linhagens não tratadas, porém essa diminuição não se mostra significativa quando comparada com a linhagem wt.

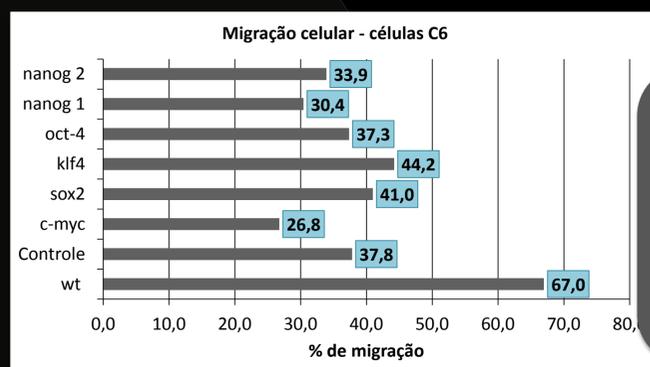


Figura 3: Ensaios de migração celular (*scratch-wound*). Porcentagem de migração celular da linhagem C6 wt, controle e clones silenciados para fatores de transcrição, em comparação com sua respectiva linhagem (t = 28h). n = 2

Há diferenças na capacidade de migração celular das dos clones silenciados em comparação com a linhagem wt, para um tempo de 28 horas.

PERSPECTIVAS

Concluir a confirmação do silenciamento. Experimentos in vivo para avaliar diferenças no crescimento tumoral. Ensaios complementares de migração e ensaios de proliferação celular. Análise estatística.