

19.005 - A REGULAÇÃO NEGATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE NF- κ B1 INDUZ A DIMINUIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA RENAL. Ikegami, A., Teixeira, L.F.S., Bellini, M.H., Departamento de Biotecnologia, IPEN/CNEN, São Paulo/SP.

Introdução: O carcinoma de células renais (CCR) representa 3% dos tumores malignos humanos e, aproximadamente, 90% das neoplasias malignas renais. A alta letalidade do CCR está relacionada à sua quimiorresistência e radiorresistência, à elevada expressão de fatores angiogênicos e à sua alta capacidade proliferativa. Estudos indicam que o fator de transcrição NF- κ B1 apresenta um papel importante, tanto na viabilidade, quanto na proliferação do CCR.

Objetivos: Avaliar o fenótipo da linhagem celular de adenocarcinoma renal murino (Renca) após a regulação negativa do gene NF- κ B1.

Métodos: Células Renca foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Foram submetidas ao silenciamento gênico mediante a utilização da técnica de RNA de interferência - short hairpin RNA - (shRNA). O vetor pLKO.1 (Renca-Mock) foi usado para clonar duas sequências de shRNA do gene NF- κ B1; o vetor vazio SHC001 foi utilizado como controle. A efetividade da técnica foi avaliada por Western Blotting. A atividade proliferativa foi verificada pela análise do ciclo celular por citometria de fluxo e pelo tempo de dobramento das células. O ensaio de citometria de fluxo foi realizado com 1x10⁶ células previamente fixadas em álcool 75%. Foi adicionado iodeto de propídeo e incubou-se por 20 minutos antes da leitura. Para o dobramento celular 5x10³ células foram semeadas em placas de 24 poços, em quadruplicata. Após 24 horas o meio foi trocado para RPMI puro e após 24 horas retornado para RPMI 10% SFB. As células foram tripsinizadas e contadas com azul de tripan em Câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 horas. As análises estatísticas foram feitas por teste t de Student, utilizando o GraphPad Prism versão 5.0.

Resultados: Os resultados do Western Blotting confirmaram a redução dos níveis proteicos em ambos os clones: Renca-sh2 2,09 vezes (P<0,05 vs Renca-pLKO.1) e Renca-sh4 6,90 vezes (P<0,001 vs Renca-pLKO.1). Na análise do ciclo celular verificou-se redução da fase S: a Renca-pLKO.1 apresentou 12,94 ± 0,52% das suas células em S, enquanto a Renca-sh2 apresentou 11,38 ± 0,07% (P<0,05 vs Renca-pLKO.1) e a Renca-sh4 11,25 ± 0,50% (P<0,05 vs Renca-pLKO.1). Os dados do ensaio de dobramento celular corroboraram com os resultados do ciclo celular. O tempo de dobramento do controle Renca-pLKO.1 foi de 22,14 horas; da Renca-sh2 foi de 28,70 horas (P<0,0001 vs Renca-pLKO.1) e da Renca-sh4 de 27,01 horas (P<0,0001 vs Renca-pLKO.1).

Conclusão: A técnica de RNA de interferência short hairpin RNA possibilitou significativa redução da expressão do gene NF- κ B1. Essa diminuição causou uma atenuação na taxa de proliferação celular, impactando especificamente a fase S do ciclo celular, podendo ser um alvo terapêutico para o tratamento do CCR.

Suporte financeiro: FAPESP (2014/19265-7), CNEN