

Avaliação da capacidade clonogênica, migratória e invasiva de linhagem celular de carcinoma renal após o silenciamento do gene NF- κ B1

Luiz Felipe Teixeira da Silva e Maria Helena Bellini
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) apresenta alta letalidade. O CCR apresenta desregulação de várias vias intracelulares responsáveis pelo controle da proliferação, migração e clonogenicidade celular. O fator de transcrição NF- κ B1 apresenta um papel crítico na proliferação tumoral, migração, angiogênese e invasão celular. [1]

OBJETIVO

Avaliar a capacidade clonogênica, migratória e invasiva da linhagem de adenocarcinoma renal murino após a regulação negativa do gene NFKB-1.

METODOLOGIA

Células Renca foram submetidas ao silenciamento gênico mediante a utilização do RNA de interferência - *short hairpin RNA* - (shRNA). A efetividade da técnica foi avaliada por Western Blotting. O ensaio de clonogenicidade foi realizado semeando-se 1×10^2 células em placas de 60mm. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ e após dez dias, coradas com Rodamina B 2% em Formaldeído 4%. No ensaio de migração celular foram utilizadas 4×10^5 células por poço em placas de 6 poços e após uma confluência de 100% foi feita uma risca na placa com o auxílio de uma ponteira (P1000), gerando uma descontinuidade na camada celular. Fotos foram tiradas de uma mesma área da ferida nos tempos 0h, 24h e 48h. No ensaio de invasão 1×10^5 células foram semeadas em câmaras de transwell contendo meio RPMI sem SFB. Na parte inferior do transwell foi adicionado meio RPMI com SFB que

funcionou como quimioatrativo. Após a incubação, as células foram fixadas com formaldeído 3.7% e metanol 100% e coradas com Giemsa 1%. Foram tiradas fotos de cinco campos aleatórios da câmara para a quantificação das células. As análises estatísticas foram feitas por teste ANOVA seguido de Bonferroni's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$) (GraphPad Prism® versão 5).

RESULTADOS

Os resultados do Western Blotting confirmaram a redução dos níveis proteicos em ambos os clones (Figura 1): Renca-sh2 – 2,09 vezes ($P < 0,05$ vs Renca-Mock) e Renca-sh4 – 6,90 vezes ($P < 0,001$ vs Renca-Mock).

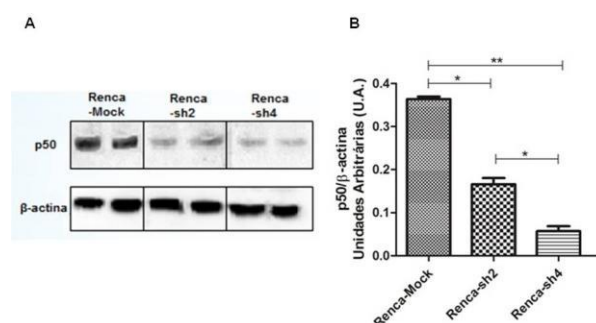


Figura1 – Western Blotting da p50 normalizado por β -actina dos grupos controle e com baixa expressão da p50. (A) A técnica de RNA de interferência causou redução do nível proteico da p50 dos grupos Renca-sh2 (* $P < 0,05$) e Renca-sh4 (** $P < 0,001$) em relação ao grupo controle Renca-Mock.

Observou-se diminuição significativa da capacidade de formação de colônias nos clones Renca-sh2 e Renca-sh4 comparado

ao controle (Figura 2). A eficiência de formação de colônias foi: Renca-sh2 – $47,37 \pm 6,39\%$ ($P < 0,001$ vs Renca-Mock), Renca-sh4 – $70,78 \pm 2,76\%$ ($P < 0,001$ vs Renca-Mock).

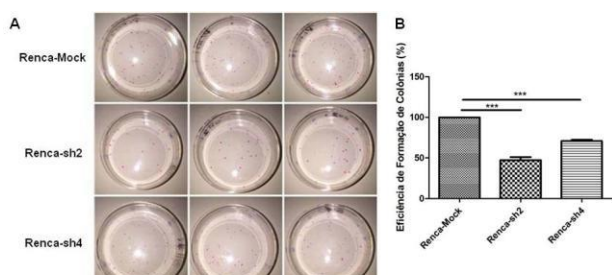


Figura 2 – Ensaio de clonogenicidade. (A) Placas com os clones após a coloração com Rodamina B. (B) Gráfico de Eficiência de formação de colônias. Houve diferença significativa entre Renca-Mock e os clones Renca-sh2 e Renca-sh4. (***) $P < 0,0001$.

Os clones Renca-sh2 e Renca-sh4 apresentaram uma diminuição significativa da capacidade de migração quando comparados ao controle (Figura 3). Renca-Mock – $16,12 \pm 1,59\%$, Renca-sh2 – $8,57 \pm 2,14\%$ ($P < 0,05$ vs Renca-Mock) e Renca-sh4 – $8,67 \pm 0,94\%$ ($P < 0,01$ vs Renca-Mock).

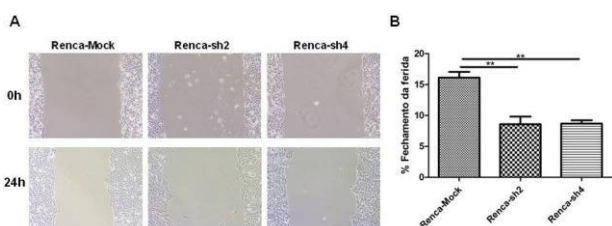
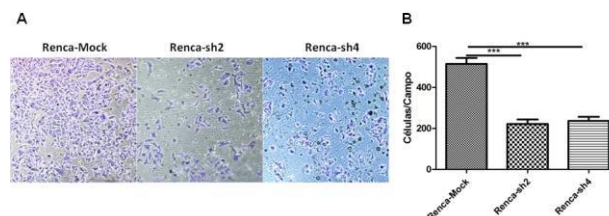


Figura 3 – Ensaio de Migração Celular. (A) Fotos representativas das células durante o fechamento da ferida. As fotos foram obtidas no microscópio invertido Nikon Eclipse T100 (10X). (B) Porcentagem de fechamento da ferida em 24h. Houve diferença significativa entre Renca-Mock e os clones Renca-sh2 e Renca-sh4.

(células/campo) dos clones silenciados (Figura 4). Renca-Mock – $514,10 \pm 92,38$, Renca-sh2 – $221,50 \pm 68,70$ ($P < 0,0001$ vs Renca-Mock), Renca-sh4 – $236,20 \pm 65,63$ ($P < 0,0001$ vs Renca-Mock).



Observou-se ainda, a diminuição significativa na capacidade invasiva

Figura 4 – Ensaio de Invasão. (A) Células após coloração com Giemsa 1%. As fotos foram obtidas no microscópio invertido Nikon Eclipse T100 (10X). (B) Análise quantitativa da migração celular. Houve diferença significativa entre Renca-Mock e os clones Renca-sh2 e Renca-sh4 (***) $P < 0,0001$.

CONCLUSÕES

A técnica de RNA de interferência – shRNA promoveu uma diminuição significativa tanto nos níveis de RNA quanto os níveis proteicos da p50. Tanto o clone 2, quanto o 4, apresentaram redução significativa na capacidade de sobrevivência, de migração e de invasão. Portanto, os resultados indicam que o bloqueio da p50 é uma possível estratégia terapêutica para o CCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]BRAGA, M.S. *et al* Involvement of the NF- κ B/p50/Bcl-3 complex in response to antiangiogenic therapy in a mouse model of metastatic renal cell carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2014).

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPESP e CNPq