

19.007 - A REGULAÇÃO NEGATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE NF- κ B1 INDUZ O RETARDAMENTO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO E REDUÇÃO DA CLONOGENICIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA RENAL. ¹Teixeira, L.F.S., ¹Ikegami, A., ¹Bellini, M.H. - ¹Departamento de Biotecnologia, IPEN/CNEN, São Paulo/SP

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.

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

Métodos: 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 PCR em tempo real (PCT-RT) e 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 test t ($p < 0,05$) (GraphPad Prism® versão 5).

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 $12,94 \pm 0,52\%$ das suas células em S, enquanto a Renca-Sh2 apresentou $11,38 \pm 0,07\%$ ($P < 0,05$ vs Renca-pLKO.1) e a Renca-Sh4 $11,25 \pm 0,50\%$ ($P < 0,05$ vs Renca-pLKO.1). Observou-se diminuição significativa da capacidade de formação de colônias nos clones Renca-Sh2 e Renca-Sh4 comparado ao controle. A eficiência de formação de colônias foi: Renca-pLKO.1 – $69 \pm 4,04\%$, Renca-Sh2 – $33 \pm 6,08\%$ ($P < 0,01$ vs Renca-pLKO.1), Renca-Sh4 – $54 \pm 8,72\%$ ($P < 0,05$ vs Renca-pLKO.1). Os clones Renca-Sh2 e Renca-Sh4 apresentaram uma diminuição significativa da capacidade de migração quando comparados ao comparada ao controle. Renca-pLKO.1 – $16,12 \pm 1,59\%$, Renca-Sh2 – $8,57 \pm 2,14\%$ ($P < 0,05$ vs Renca-pLKO.1) e Renca-Sh4 – $8,67 \pm 0,94\%$ ($P < 0,01$ vs Renca-pLKO.1). Observou-se ainda, a diminuição significativa na capacidade invasiva (células/campo) dos clones silenciados. Renca-pLKO.1 – $514,10 \pm 92,38$, Renca-Sh2 – $221,50 \pm 68,70$ ($P < 0,0001$ vs Renca-pLKO.1), Renca-Sh4 – $236,20 \pm 65,63$ ($P < 0,0001$ vs Renca-pLKO.1).

Conclusão: A técnica de RNA de interferência – shRNA promoveu uma diminuição significativa tanto nos níveis de RNA quanto os níveis proteicos da p50. Ambos os clones 2 e 4 apresentaram redução significativa na capacidade de sobrevivência (capacidade de formar colônias), migratória e invasiva. Os resultados indicam que o bloqueio da p50 é uma possível estratégia terapêutica para o CCR.

Apoio Financeiro: FAPESP (2014/19265-7), CNPQ