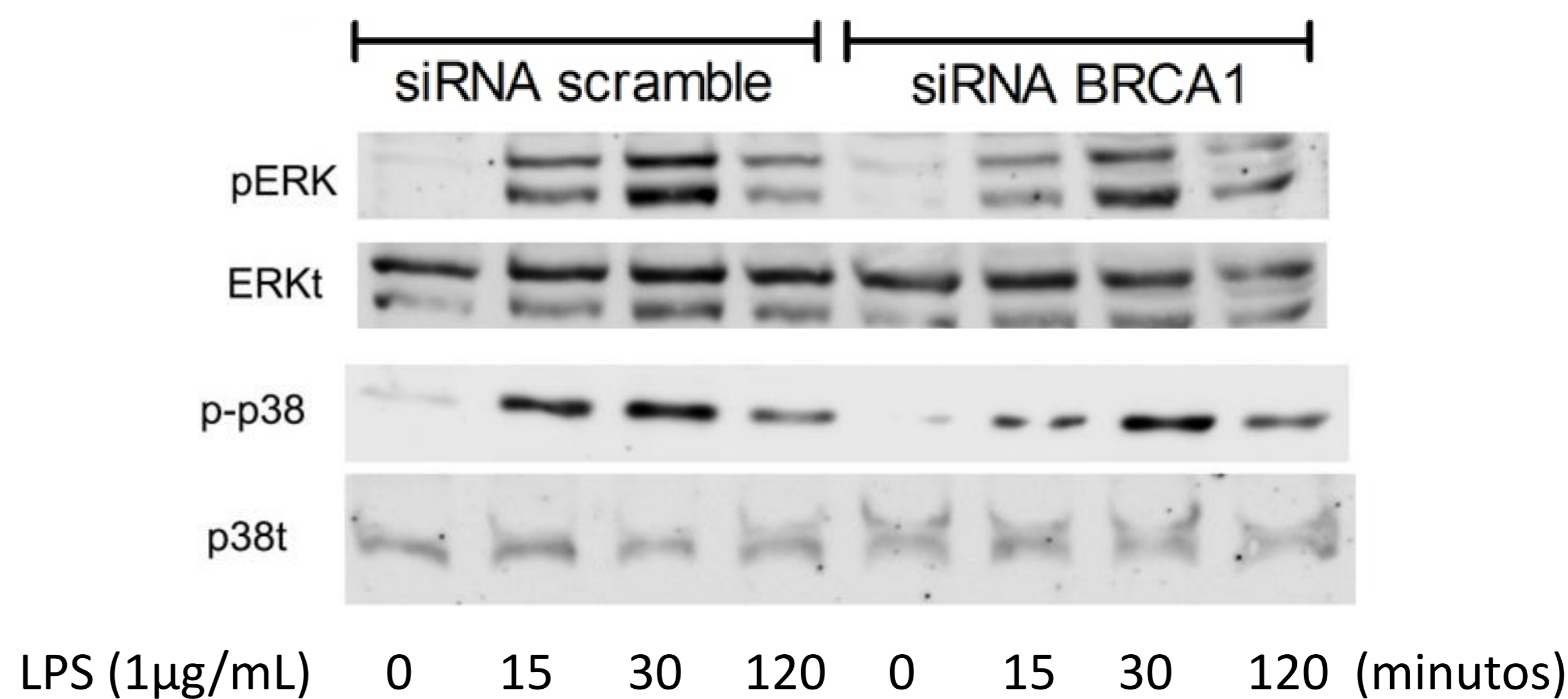
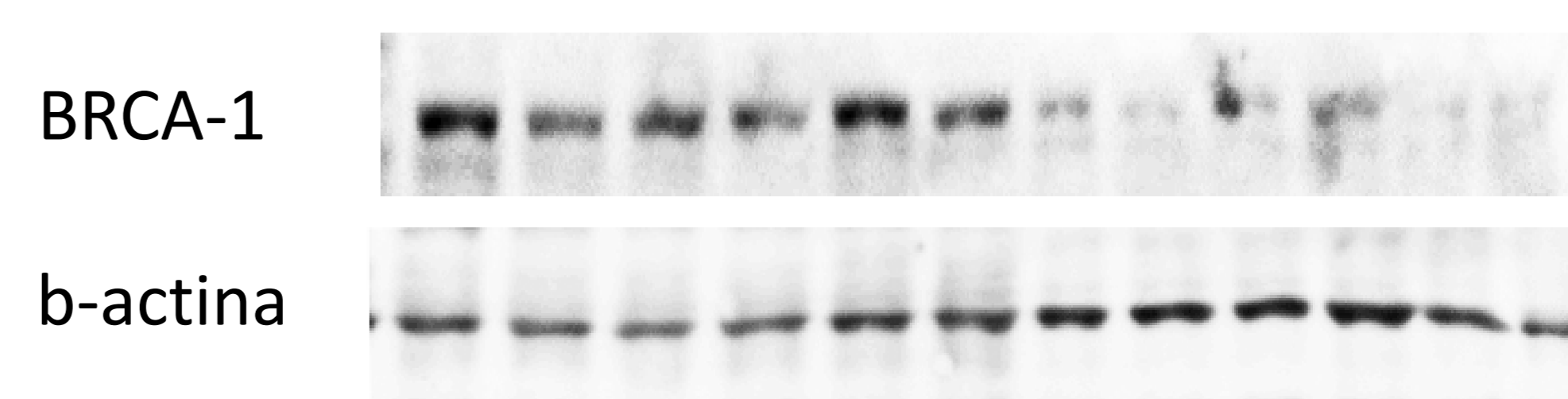
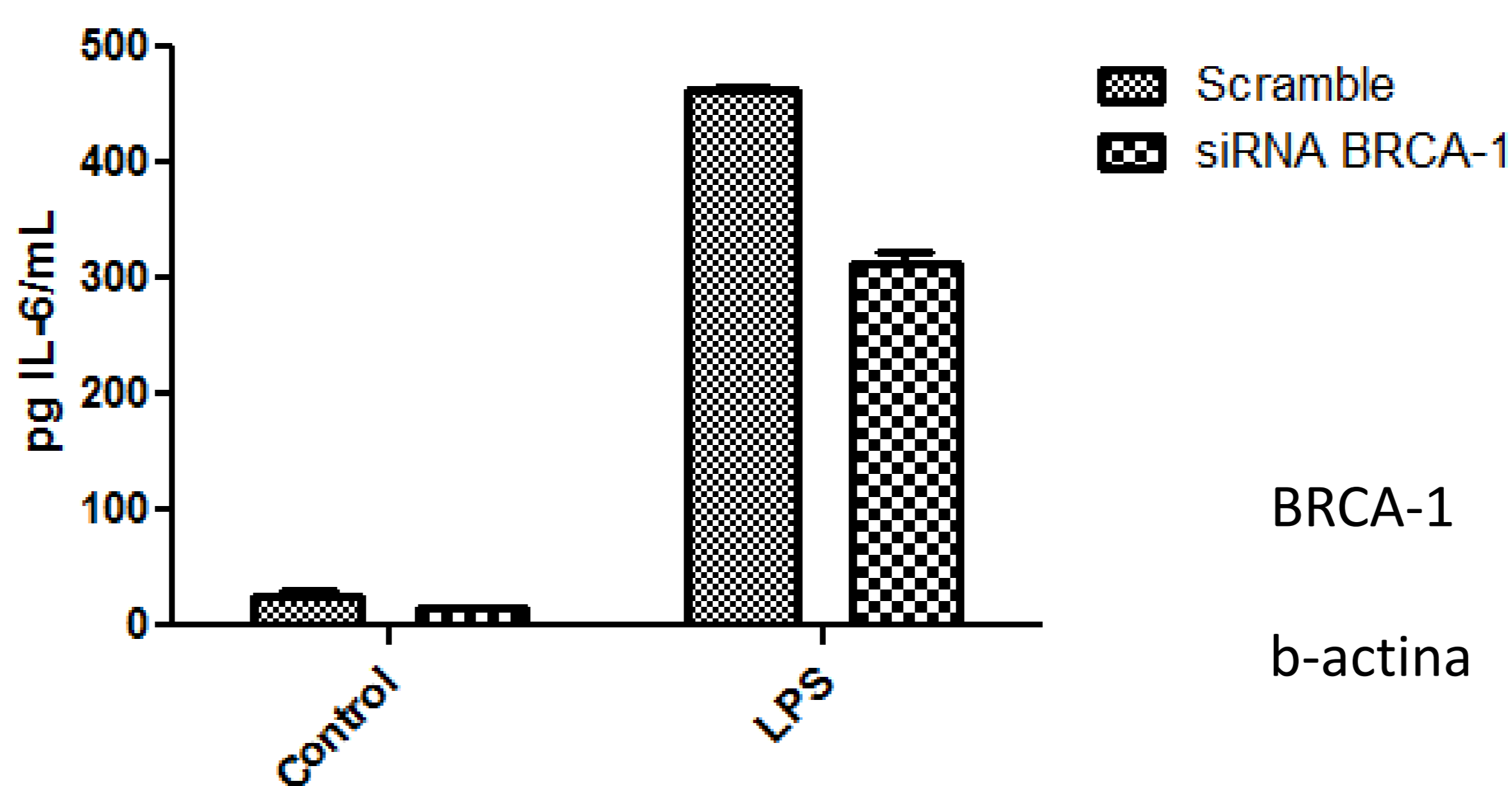
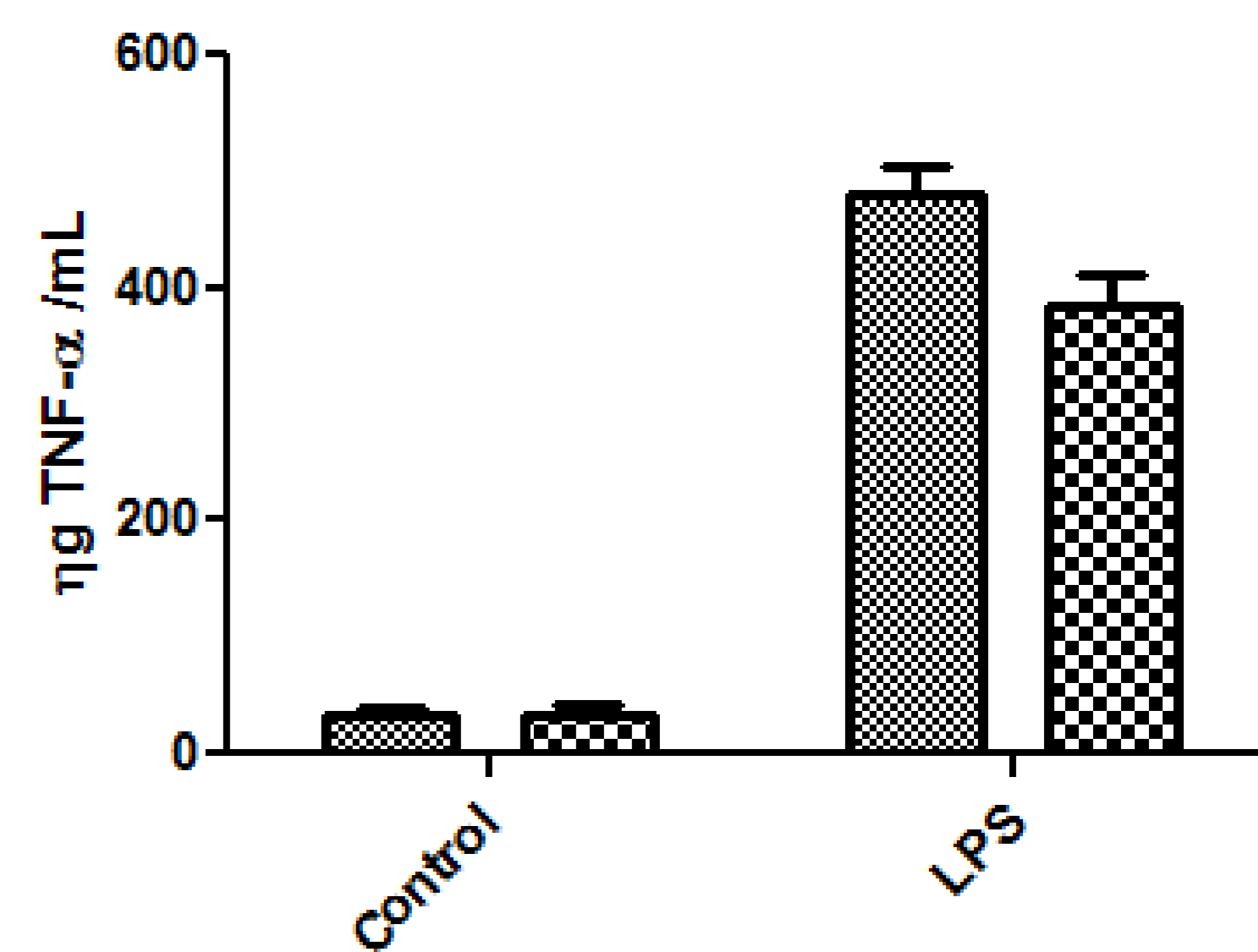
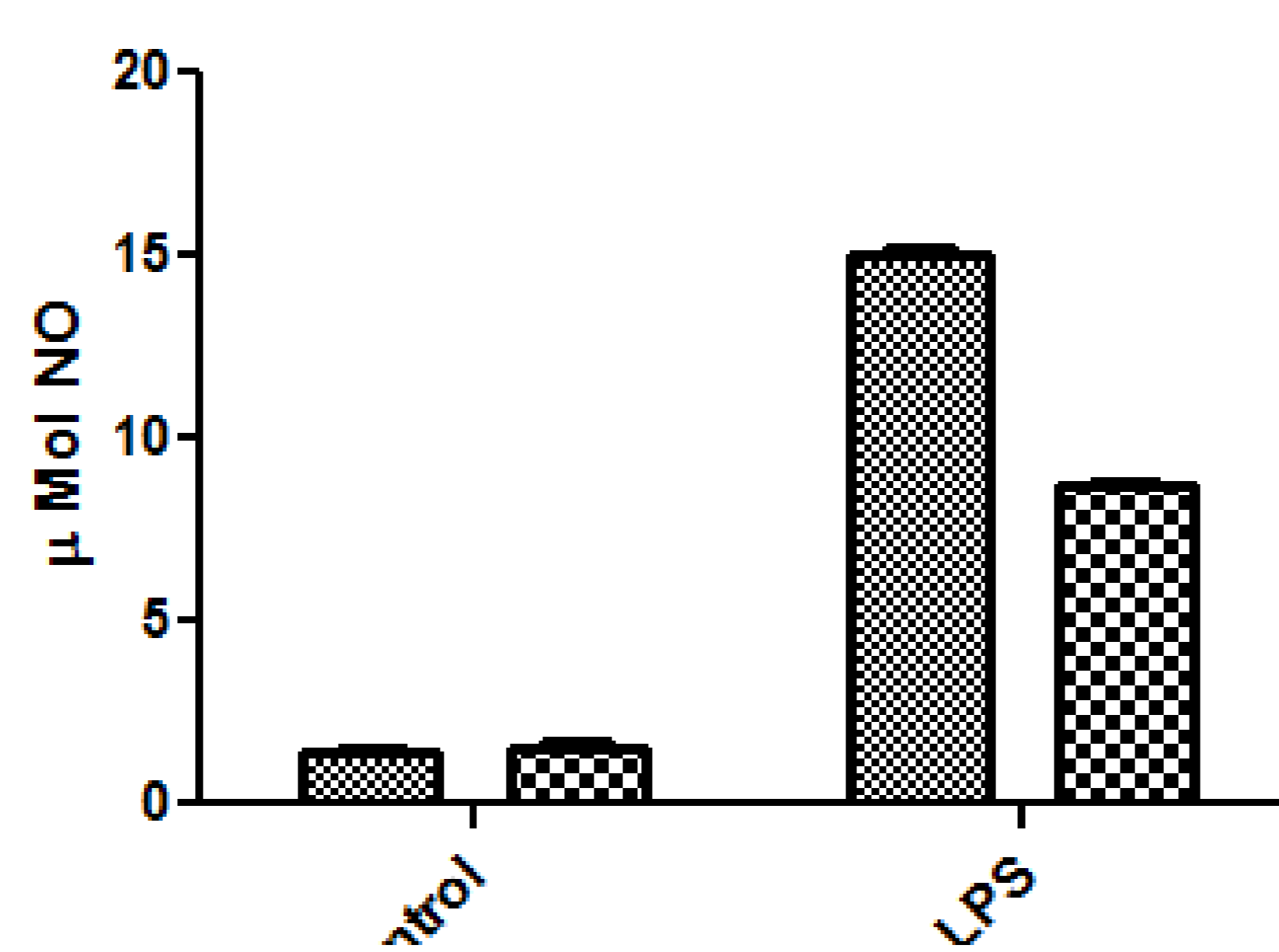
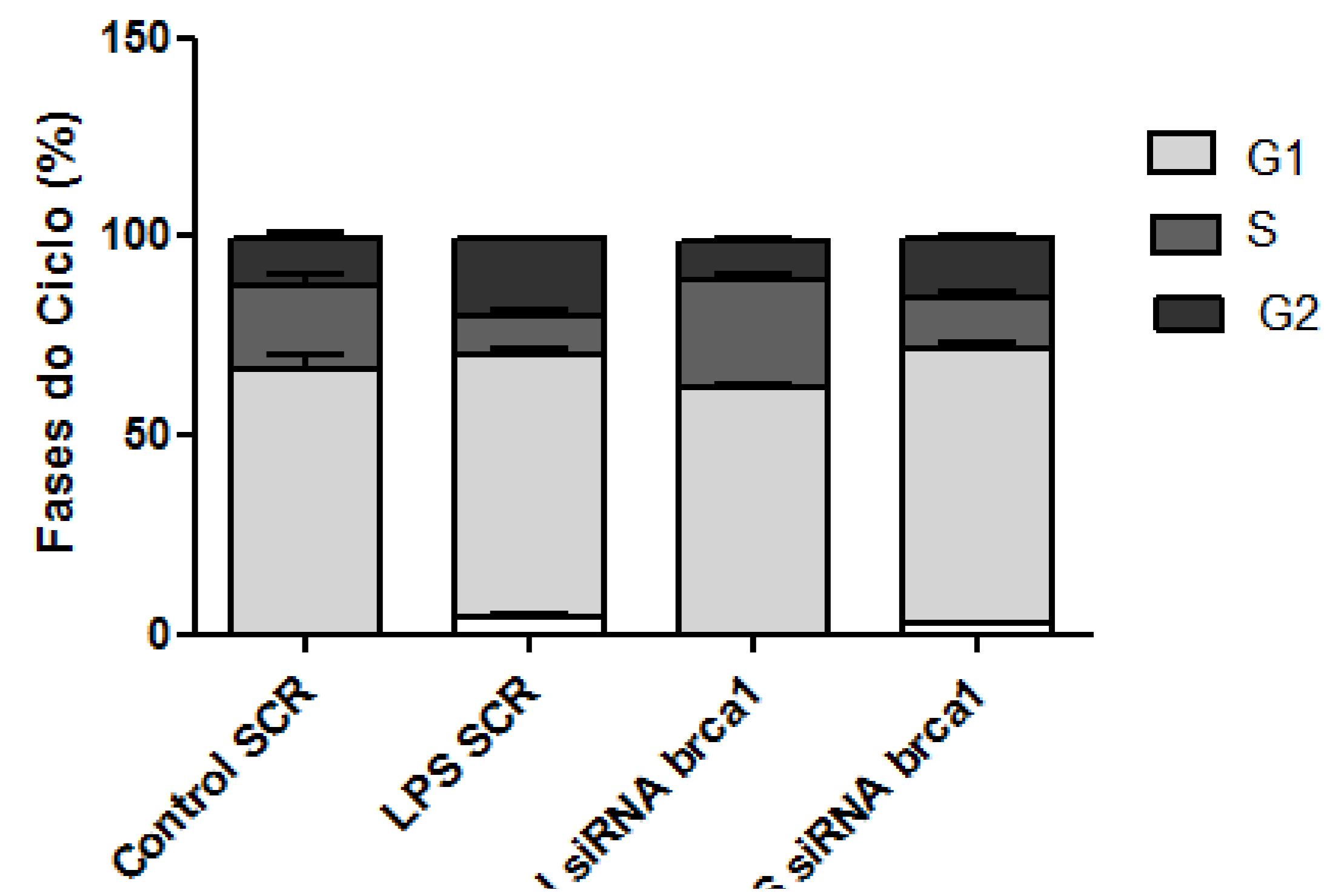
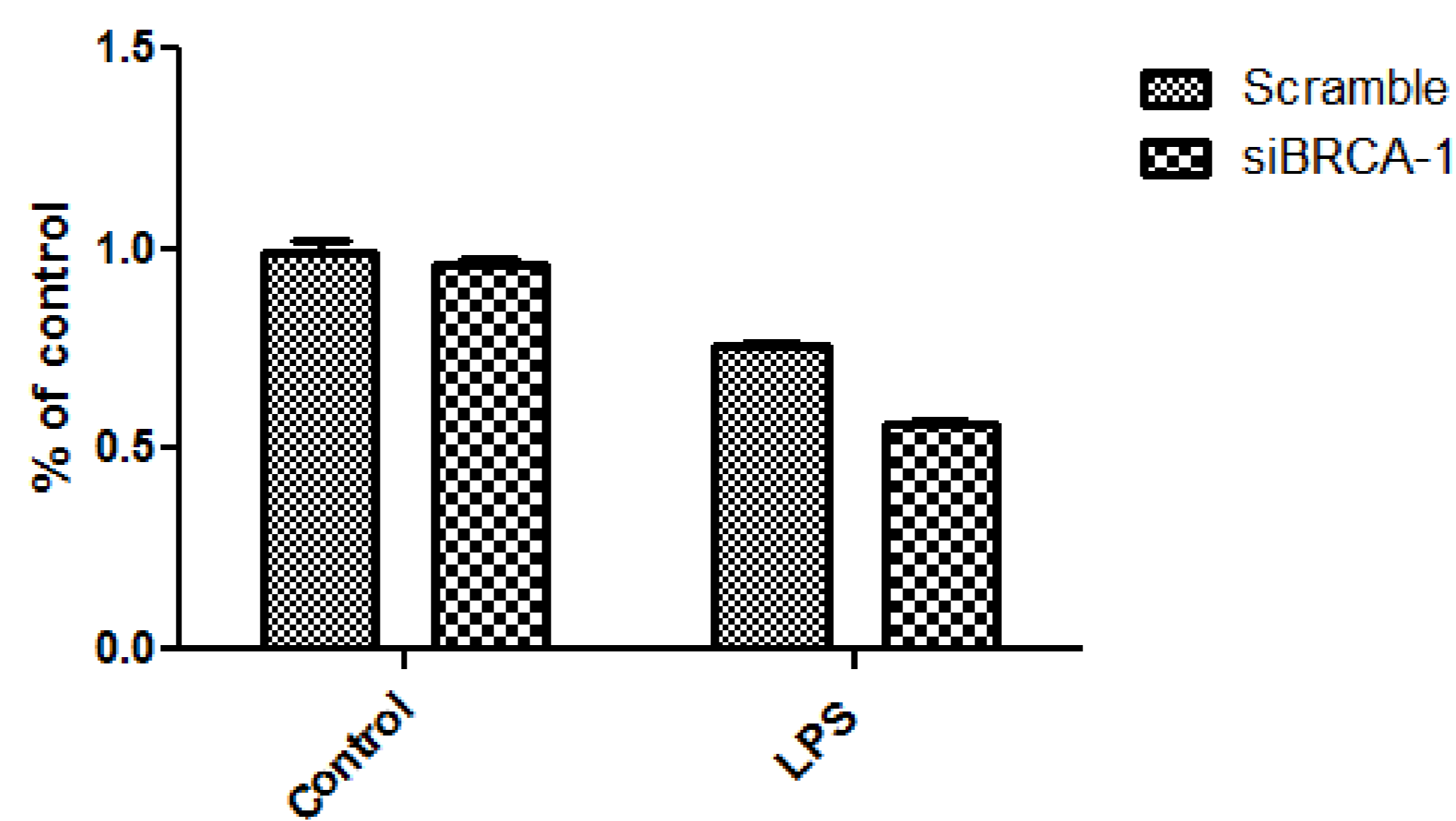


Interferência da proteína BRCA-1 durante a ativação de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Resultados



Conclusão

Ainda que limitados, nossos resultados mostram que a proteína BRCA-1 pode ser importante na ativação de macrófagos, possivelmente atenuando situações inflamatórias quando sua expressão é diminuída.

Introdução

BRCA1 é uma proteína nuclear essencial para a estabilidade genômica e atua diretamente no reparo do DNA dependente de recombinação homóloga. Mutações germinativas em BRCA1 se mostram determinantes no desenvolvimento do câncer de mama precoce em mulheres. Trabalhos recentes mostram sua participação em diferentes respostas patológicas não relacionadas diretamente com reparo de DNA. Sua estrutura favorece a interação com fatores de transcrição, como ATF, p53, STAT-1 e NF-κB. Apesar das evidências, são poucos os achados referentes ao papel desta proteína sobre atividades inflamatórias, sabendo que mutações germinativas nesta proteína poderiam também influenciar processos inflamatórios de pessoas que apresentam a mutação, já que estes eventos são dependentes da geração de radicais livres que danificam biomoléculas, inclusive o DNA.

Nossa objetivo

Analisar a interferência da proteína BRCA1 (presença ou sub-expressão), na ativação de macrófagos quando estimulados por LPS.

Como?

Macrófagos da linhagem RAW 264.7) foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. A expressão de BRCA-1 foi silenciada utilizando RNA interferente por 24h. Após o silenciamento, as células foram estimuladas com LPS (1µg/mL) por tempos curtos (0, 15, 30 e 120 minutos) e por 24h. No tratamento de 24h foram quantificados os seguintes parâmetros: viabilidade celular pela técnica de SRB, análise de ciclo celular por citometria de fluxo e, a partir do sobrenadante, foram quantificados níveis de TNF-α e interleucina-6 por ELISA e óxido nítrico através da reação de Griess. Nos estímulos de tempos curtos com LPS foram quantificadas as atividades do fator de transcrição NF-κB bem como das MAPK's (ERK1/2 e p-p38) bem como a validação do silenciamento pela técnica de western blot.

Resultados

O estímulo por LPS causou diminuição da viabilidade celular e aumento da liberação das citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico no meio de cultura. Houve aumento do imunocntéudo de ERK1/2 p-38 e da subunidade p-65 do NF-κB fosforiladas, revelando uma situação inflamatória dependente de LPS. As células com a expressão de BRCA-1 diminuída, quando estimuladas por LPS, apresentaram uma queda de viabilidade celular mais acentuada. Os parâmetros inflamatórios foram aumentados no meio de cultura, porém o aumento foi menos evidente quando comparado às células estimuladas sem o RNA de interferência. Não houve acúmulo significativo de células tratadas na fração sub-G0 quando analisadas por citometria de fluxo, porém o silenciamento causou bloqueio do ciclo celular na fase S, tanto das células controle quanto das tratadas com LPS.