



SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA XXVIII SIC

paz no plural



Evento	Salão UFRGS 2016: SIC - XXVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2016
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Efeito do silenciamento gênico de Oct4 após tratamento com cisplatina e etoposídeo em teratocarcinomas
Autor	MAYUMI ZANOTTA OYAMA
Orientador	GUIDO LENZ

Efeito do silenciamento gênico de Oct4 após tratamento com cisplatina e etoposídeo
em teratocarcinomas

Mayumi Zanotta Oyama, Guido Lenz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Em 2006, Takahashi e Yamanaka demonstraram que células fetais e adultas de camundongo tiveram o seu estado diferenciado alterado pela expressão de quatro fatores de transcrição (Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc), reprogramando uma pequena fração destas em células pluripotentes induzidas (iPSCs). Entretanto, uma das características fundamentais das iPSCs é a formação de teratomas, crescimentos malignos caracterizados pela presença de células dos três folhetos embrionários, que impediriam o uso clínico dessas células.

Oct4 parece ser o mais potente dos fatores de reprogramação, pois sua ausência impossibilita a reprogramação e, por outro lado, sua superexpressão, de forma isolada, pode produzir reprogramação celular. Além disso, a redução da expressão de Oct4 aumentou a sensibilidade das células tumorais após o tratamento com cisplatina.

O objetivo desse trabalho é analisar a sensibilidade de células da linhagem de teratocarcinoma de camundongo (P19) silenciada para Oct4 após o tratamento com cisplatina (Cisp), etoposídeo (Etopo) ou a combinação desses dois quimioterápicos.

Células P19 foram silenciadas via shRNA para Oct4. Após a confirmação do silenciamento, avaliamos a proliferação das células controle (selvagem – wt; e controle de silenciamento – GFPi) e a células silenciadas (B10 e B9 – duas sequências diferentes de shRNA) pelo método de *Cumulative Population Doubling*. 500 ou 2500 células foram plaqueadas, após 24 horas tratadas com Cisp 25 µM, Etopo µM ou combinação por 5 dias. No dia 6, células que apresentavam alta confluência foram dissociadas e contadas em hemocítometro, já as células que apresentavam baixa confluência tiveram o meio trocado. Dez µl de células foram replaqueadas e contadas sempre que atingiam 70 % de confluência por até 30 dias. Os valores obtidos por dia foram colocados na fórmula $PD = (\text{LOG}(N_i) - \text{LOG}(N_f)) / \text{LOG}(2)$, sendo N_i o valor inicial de células e N_f o valor total de células obtidas após cada dia de contagem. O *Cumulative Population Doubling* (CPD) é o resultado da soma dos valores de PD obtidos por dia. Além disso, também analisamos a capacidade das células formar clones, em que 50 células plaqueadas, após 24 h foram tratadas da mesma forma que o CPD. Após 5 dias, o meio foi trocado e no dia posterior, fixadas e coradas com cristal violeta. Após, o número de colônias foi contado.

Os resultados do CPD demonstraram que a redução da expressão de Oct4 não alterou a sensibilidade à Cisp. Tanto o tratamento com Etopo quanto a combinação teve efeito em retardar o crescimento tanto nos controles quanto nas células silenciadas. Entretanto, uma das sequências de shRNA apresentou uma recuperação mais rápida (8 dias) após o tratamento com Etopo e combinação, enquanto que as linhagens controles precisaram em torno de 12 a 16 dias para recuperar o crescimento.

Os resultados do clonogênico mostraram que a mesma sequência que conseguiu se recuperar mais rápido apresentou uma maior eficiência na formação de colônias no tratamento controle. Nenhuma linhagem apresentou colônias após o tratamento com Cisp, Etopo ou a combinação.

A próxima etapa desse trabalho é realizar o ensaio clonogênico e permitir que as células tratadas fiquem mais tempo com meio livre de drogas para visualizar o mesmo efeito do CPD e permitir observar a presença de clones resistentes.