

Squizani, S.¹, Henriques, J.A.P.¹

¹Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;
E-mail: squizani.samia@gmail.com

INTRODUÇÃO

A enzima *alkyladenine DNA glycosylase* – AAG, também chamada de MPG: *N-methylpurine-DNA glycosylase*, é uma glicosilase envolvida no sistema de Reparação de DNA por Excisão de Bases (BER) atuando na etapa inicial deste sistema. Trabalhos recentes mostram o envolvimento desta enzima na resposta de diferentes tipos de tumores frente à quimioterapia. No entanto, a influência da enzima AAG na sensibilidade de glioblastomas à terapia antitumoral ainda não está claramente definida. Neste contexto, o presente trabalho faz parte de um projeto internacional que está sendo realizado em colaboração entre as Instituições UFRGS e University of Surrey, UK e tem como objetivo investigar a influência de diferentes níveis de silenciamento do gene AAG na resposta de células de glioblastoma frente ao metilmetanossulfonato (MMS), agente alquilante que induz danos no DNA que são reparados pela enzima AAG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Painel de linhagens U87-MG

A partir da linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG *wild type*, foi gerado um painel de linhagens contendo diferentes níveis de expressão do gene AAG pela técnica de transdução por lentivírus. Para a seleção das células U87-MG transduzidas, as células foram expostas ao antibiótico puromicina 2 µg/mL. Esta etapa foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Guido Lenz (Laboratório de Sinalização Celular, UFRGS). Para a caracterização das células, primeiramente foi realizada a quantificação do percentual de células transduzidas, as linhagens foram analisadas quanto à presença do gene repórter GFP por citometria de fluxo. Para a avaliação dos níveis de expressão do gene AAG e então a confirmação do silenciamento no painel de linhagens U87-MG gerado, foi utilizada a técnica RT-qPCR utilizando o gene TBP como controle endógeno.

Ensaio de Redução de MTT

Para a avaliação da viabilidade, foi utilizado o protocolo padrão do Ensaio de Redução de MTT. Basicamente, a linhagem não transduzida U87-MG *wild-type (wt)* e as células transduzidas U87-MG NS (controle de silenciamento), U87-MG AAG1, U87-MG AAG2, U87-MG AAG3 e U87-MG AAG4 foram expostas a diferentes concentrações do agente metilmetanossulfonato (MMS) durante 1 h (em ausência de soro fetal bovino – SFB) ou 3 h (em presença de SFB). Após a exposição, as células foram incubadas com meio de cultura completo durante 72h. As células foram então lavadas e incubadas com o sal MTT (brometo de 3,4[4.5-dimetiltiazol-2-y1]-2,5-difeniltetrazolium) por 4 h. Após, os cristais de formazan, que são o produto da hidrólise do sal MTT, foram solubilizados em DMSO e então a absorbância foi analisada em 570 nm. A absorbância das culturas expostas ao controle negativo foi considerada como 100 % de viabilidade e àquelas dos demais grupos foram comparados com esta.

RESULTADOS

Confirmação do Silenciamento

As linhagens transduzidas apresentaram percentual de células GFP positivas acima de 93 %, com exceção da linhagem U87-MG AAG1 a qual apresentou 73,5 % de células GFP positivas. Além disso, todas as linhagens transduzidas com o plasmídeo de silenciamento mostraram níveis de expressão de AAG (mRNA) inferiores em relação à linhagem controle U87-MG NS (figura 1).

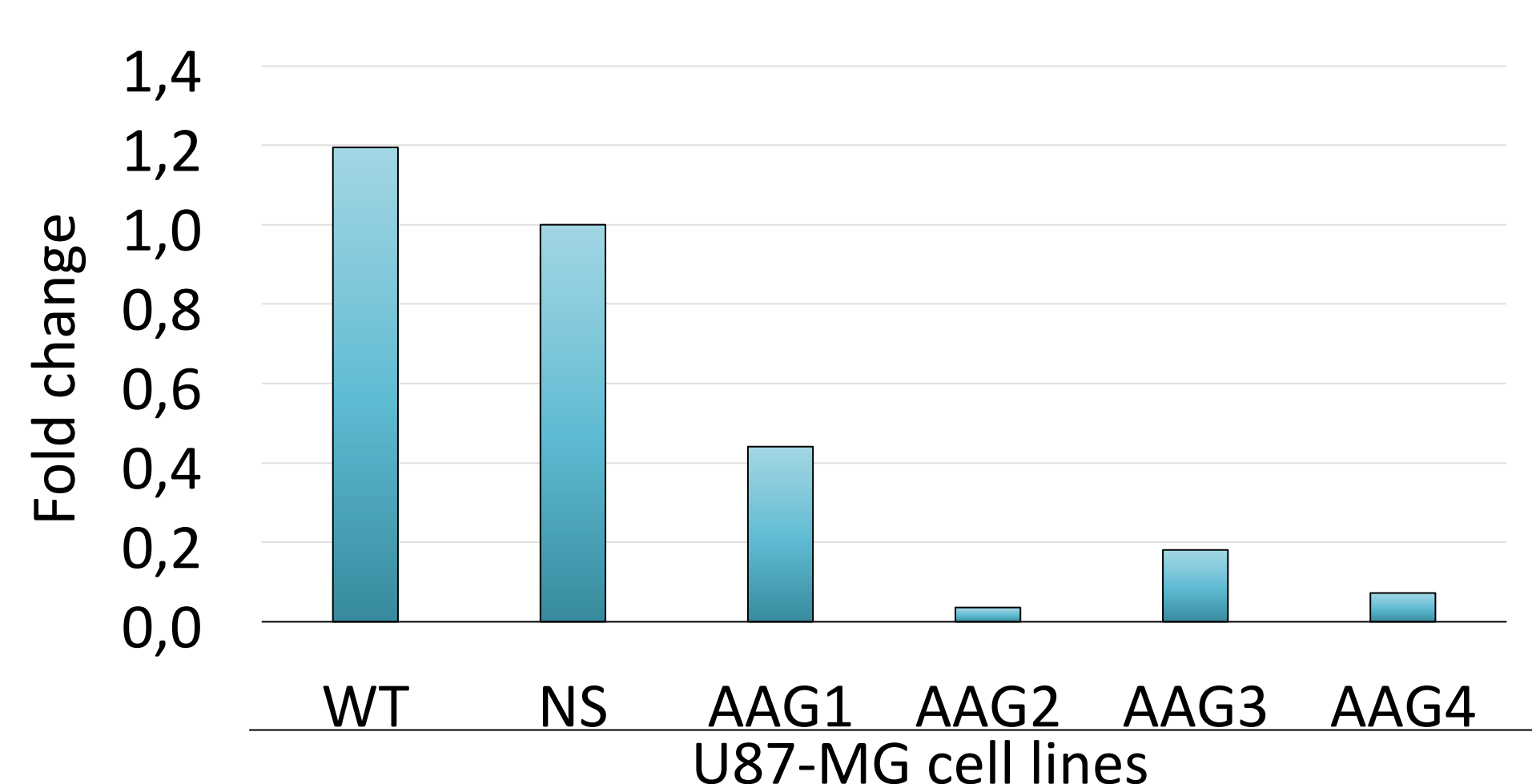


Figura 1. Expressão relativa do gene AAG

RESULTADOS (continuação)

Viabilidade celular

Os resultados preliminares obtidos mostraram que as linhagens contendo o gene AAG silenciado não mostraram diferença na sensibilidade frente ao agente MMS quando comparadas com as linhagens controle não silenciadas WT ou NS, tanto nos experimentos realizados com 1 h ou 3 h de exposição em ausência e em presença de SFB, respectivamente (figuras 2 e 3).

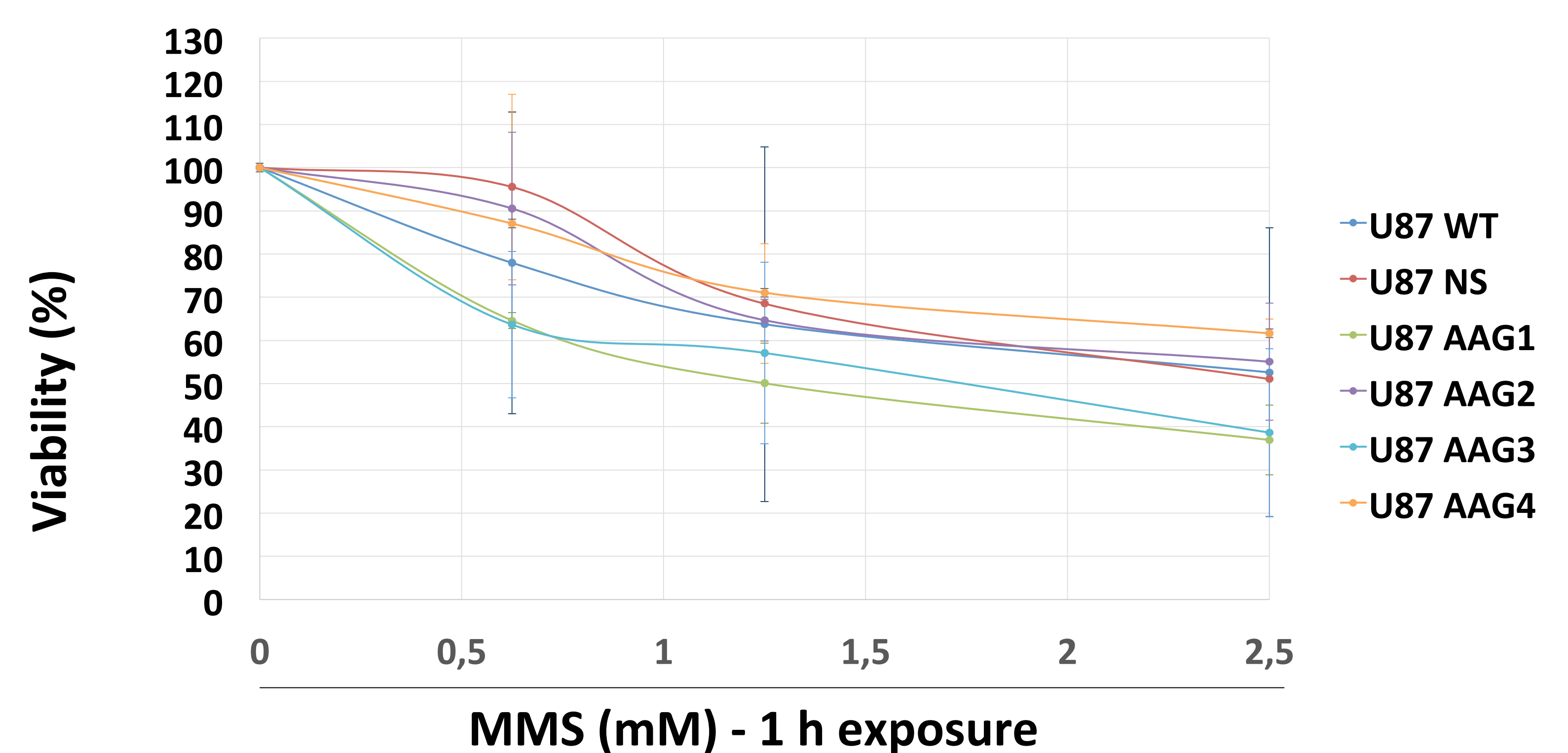


Figura 2. Viabilidade celular após a exposição por 1 h ao agente MMS

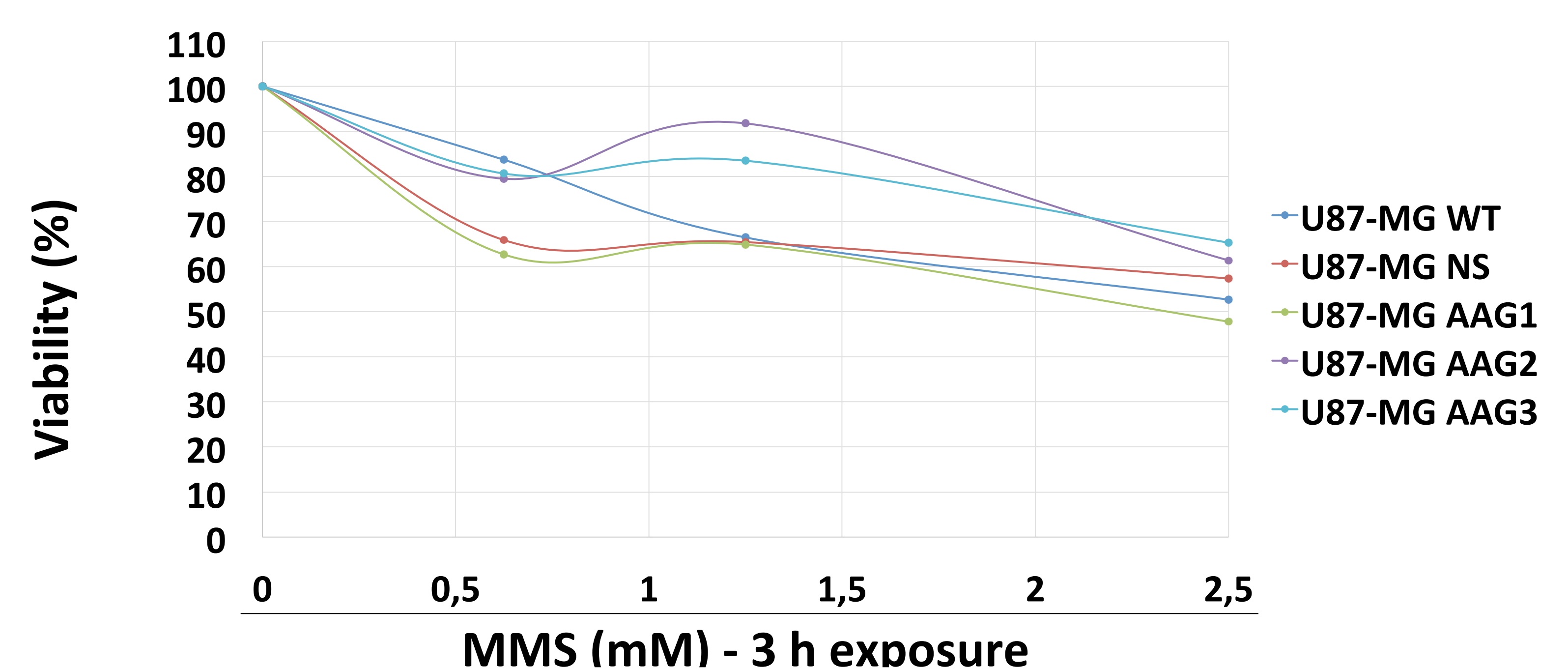


Figura 3. Viabilidade celular após a exposição por 3 h ao agente MMS

CONCLUSÃO

Os resultados preliminares obtidos até o momento sugerem que o silenciamento do gene AAG não influencia na sensibilidade da linhagem de glioblastoma frente ao agente alquilante MMS no protocolo utilizado. Estes resultados corroboram com resultados prévios obtidos pelo grupo com outra linhagem de glioblastoma (T98-G) (dados não mostrados). Assim, para melhor compreender a influência do gene AAG na resposta tumoral a agentes alquilantes, a sensibilidade do painel de linhagens gerado será também avaliada frente ao agente alquilante temozolomida.