

Papel do fator de transcrição NFkappaB em gliomas: Abordagem mista: “*in-silico*” e “*in-vitro*”

Luís Henrique Trentin de Souza, Alfeu Zanotto-Filho, Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin, Rafael Schröder, Rafael Calixto Bortolin, Ana Maria de Oliveira Batastini, Elizandra Braganhol, José Cláudio Fonseca Moreira

Introdução

O NFkappaB - Fator de transcrição nuclear kappa-B, é um importante fator na tumorigênese e quimiorresistência em diversas neoplasias. É responsável pela ativação de genes geralmente atribuídos à resposta inflamatória, estando relacionados com mecanismos de: evasão da apoptose, proliferação celular, invasão, metástase e angiogênese.

Na literatura, pouca informação consta a respeito deste fator em gliomas - Gliomas são tipos tumorais bastante agressivos, normalmente refratários a tratamentos e, em razão disso, apresentando uma baixa sobrevida de seus pacientes.

Este trabalho visa, por meio de modelos “*in-silico*” e “*in-vitro*”, elucidar o papel do NFkB em gliomas.

Materiais e Métodos

Tecnologias de Microarranjo (Microarray) de DNA atualmente são capazes de analisar boa parte do genoma humano, gerando grandes quantidades de informação em cada experimento, realizado em geral, visando analisar a expressão pontual de alguns genes. Este trabalho utiliza-se da informação gerada por tais experimentos, que, no caso, analisavam biópsias de Gliomas de alto e baixo grau em relação a astrócitos. Bem como um suporte de métodos tradicionais de bioquímica em um modelo “*in-vitro*”.

“*In-silico*”

Para servir de base à análise de transcrição, foi construído um diagrama de interação dos genes relacionados ao NFkB, com auxílio do STRING (<http://string.embl.de/>). Este modelo serve de base para a análise conjunta dos genes.

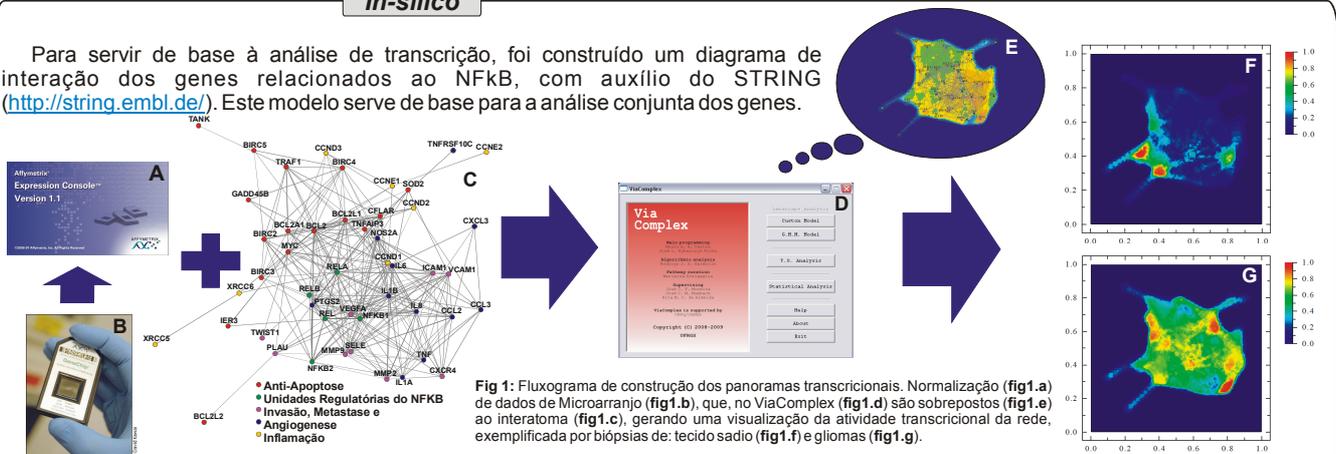


Fig 1: Fluxograma de construção dos panoramas transcricionais. Normalização (fig.1.a) de dados de Microarranjo (fig.1.b), que, no ViaComplex (fig.1.d) são sobrepostos (fig.1.e) ao interatoma (fig.1.c), gerando uma visualização da atividade transcricional da rede, exemplificada por biópsias de: tecido sadio (fig.1.f) e gliomas (fig.1.g).

Dados de Microarranjo de dois experimentos (GSE12657 N=25: 8 de alto grau, 12 de baixo e 5 de tecido sadio; GSE3185 N=18: 6 de Alto Grau e 12 de Baixo) foram obtidos da base online do Genome Expression Omnibus - GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Os dados brutos, na plataforma **gpl8300** (Affymetrix Gene Chip Human Genome U95_v2), foram então normalizados pelo Expression Console - software *ad-hoc* fornecido pela affymetrix (<http://www.affymetrix.com/>), usando o algoritmo padrão do software (MAS5).

Com auxílio de um software desenvolvido pelo grupo, o ViaComplex (<http://lief.if.ufrgs.br/pub/biossoftwares/viacomplex/>), é possível acrescentar a dimensão “transcrição” ao interatoma, produzindo um diagrama tridimensional: o “Panorama Transcricional da Rede”.

A análise em si observou a expressão diferencial entre astrócitos (controle) e gliomas de alto e baixo grau.

“*In-vitro*”

Linhagens celulares de Glioma (U138MG e C6 - quimiorresistente) e Astrócitos foram utilizadas nos experimentos:

Western Blot

As proteínas (20µg) foram separadas, em cada fração, por SDS-PAGE em acrilamida 10% (massa/volume), bisacrilamida 0.275% (m/v), e eletrotransferidas para membranas de Nitrocelulose que foram incubadas em TBS-T [20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20] contendo 1% (m/v) de leite em pó, por 1h. Então, incubadas por 12h com os anticorpos primários (p65, ANT e Laminina), após, lavados em TBS-T e novamente incubados, agora com anticorpo “IgG” ligado à peroxidase. O resultado foi quantificado pelo software Image-J.

Elisa

Determinou-se a atividade do NFkB utilizando 10µg de fração nuclear, utilizando o **p65 Elisa kit**, (Stressgen/Assays designs), seguindo o protocolo fornecido com o kit.

Resultados: “*in-silico*”

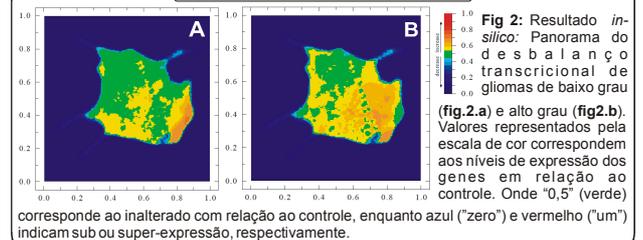


Fig 2: Resultado *in-silico*: Panorama do desbalanço transcricional de gliomas de baixo grau (fig.2.a) e alto grau (fig.2.b). Valores representados pela escala de cor correspondem aos níveis de expressão dos genes em relação ao controle. Onde “0,5” (verde) corresponde ao inalterado com relação ao controle, enquanto azul (“zero”) e vermelho (“um”) indicam sub ou super-expressão, respectivamente.

Resultados: “*in-vitro*”

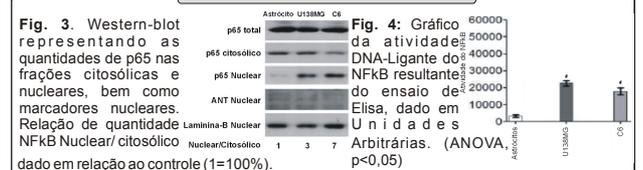


Fig. 3. Western-blot representando as quantidades de p65 nas frações citosólicas e nucleares, bem como marcadores nucleares. Relação de quantidade NFkB Nuclear/ citosólico

Fig. 4: Gráfico da atividade da DNA-Ligante do NFkB resultante do ensaio de Elisa, dado em Unidades Arbitrárias. (ANOVA, p<0,05)

Conclusão/Perspectivas

Há uma hiper-ativação do NFkB em Gliomas, que tem impacto nas rotas subsequentes a este, havendo um desbalanço nos mecanismos de manutenção de homeostase celular e tecidual. Este desbalanço é diretamente proporcional a agressividade do tumor, o que sugere correlação também com a resistência ao tratamento convencional.

Novas estratégias terapêuticas no tratamento de câncer devem buscar orientação por diagnóstico molecular, requerendo estudos que visem uma melhor compreensão dos desbalanços metabólicos em cada tipo tumoral.

Agradecimento

