

Avaliação da atividade de hidrólise e efeito dos nucleotídeos da adenina em cultura de células de carcinoma cervical

Aline Beckenkamp¹, Paola Mello¹, Danielle Bertodo¹, Eduardo C. Filippi-Chiela², Luciane N. Cali¹, Márcia R. Wink³, Alessandra N. Bruno⁴, Guido Lenz², Andréia Buffon¹.

¹ Laboratório de Bioquímica, Dept. Análises, Faculdade de Farmácia/ UFRGS
² Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Dept. de Biofísica/UFRGS
³ Laboratório de Biologia Celular, UFCSPA
⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo. A infecção pelo HPV e a supressão de mecanismos como apoptose e adesão celular, são fatores importantes na carcinogênese cervical, entretanto, o mecanismo pelo qual as células transformadas pelo HPV resistem a apoptose ainda não está claro. Estudos demonstram que os nucleotídeos da adenina podem ser citotóxicos para células tumorais, dependendo da concentração. Neste sentido, acredita-se que o ATP extracelular exerce efeitos de toxicidade mediados por apoptose, possivelmente via ativação de purinoreceptores P2X₇. Além disso, as ectonucleotidases têm sido descritas como enzimas importantes em patologias como o câncer.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade de hidrólise dos nucleotídeos da adenina e avaliar seus efeitos na proliferação e morte celular em cultura de linhagem celular de carcinoma cervical (HeLa, SiHa e C33A).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de células

Todas as linhagens celulares de carcinomas (SiHa, HeLa e C33A), foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂.

Determinação das atividades enzimáticas

Suspensões de células (20.000 células por well) foram semeadas em placas de 24 wells e após atingirem confluência, foram utilizadas para determinar as atividades ectonucleotidásicas em um meio contendo HEPES 50 mM, KCl 5,0 mM, NaCl 135 mM, e glicose 10 mM, pH 7,5, em um volume final de 200 µl. A reação foi iniciada pela adição de ATP, ADP e AMP (1 mM concentração final). A reação foi parada pela adição de ácido tricloroacético, sendo o Pi liberado medido colorimetricamente. A atividade enzimática foi expressa nmol Pi liberado/min/mg de proteína.

Dosagem de Proteína

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Comassie Blue, conforme descrito por Bradford (1976).

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de MTT (3-(4,5-dimethyl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). As células foram semeadas em placas de 96 wells (2.000 células por well), e após 48h de crescimento, foram expostas a ATP, ADP, AMP e adenosina em diferentes concentrações, por 2h e 24h. Controles negativos foram realizados com a adição de DMEM suplementado com 10% de SFB.

Após tratamento, as células foram incubadas com 0,25mg/mL de MTT por 3h a 37°C. Os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e quantificados a 560 e 630nm usando um multileitor de placas EnVision. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

Contagem celular

Após tratamento com ATP 5mM por 24, 48 e 72h, as células foram tripsinizadas e contadas em um hemocítmetro. Controles foram realizados com a adição de DMEM suplementado com SFB 10%. Foi realizado em paralelo, sob as mesmas condições, o teste de viabilidade celular (MTT).

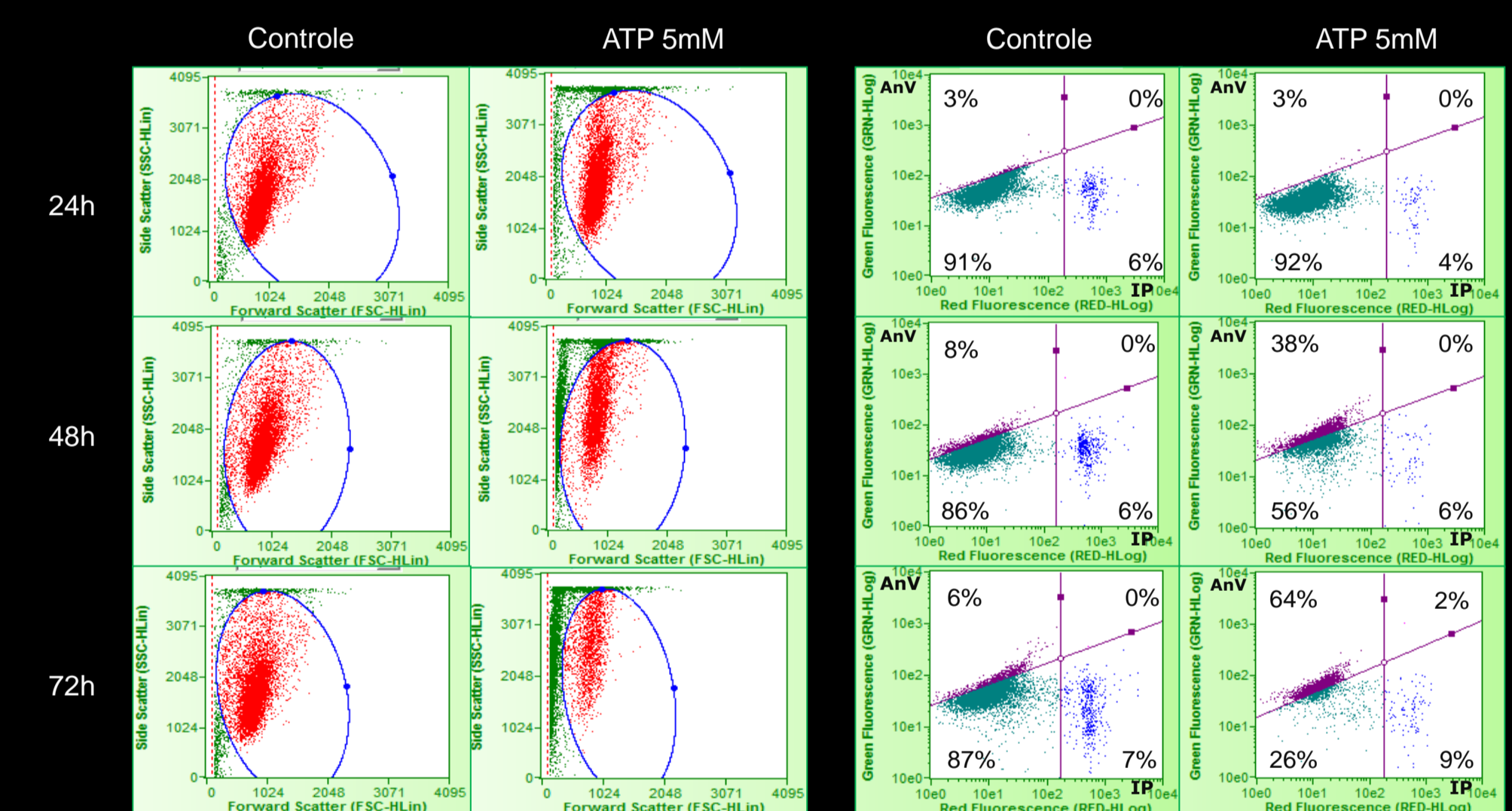
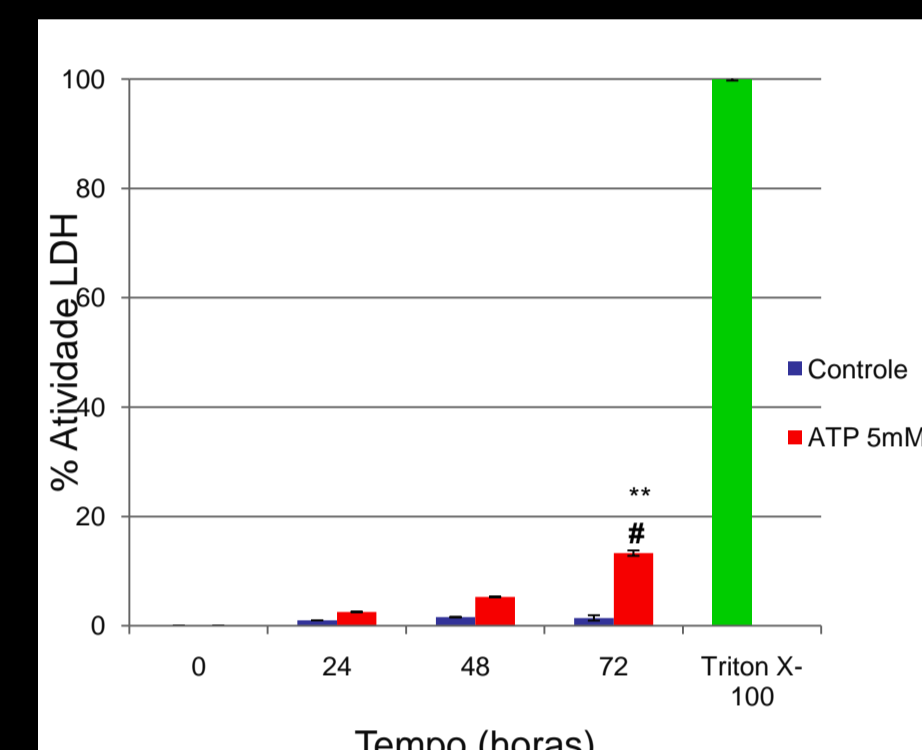
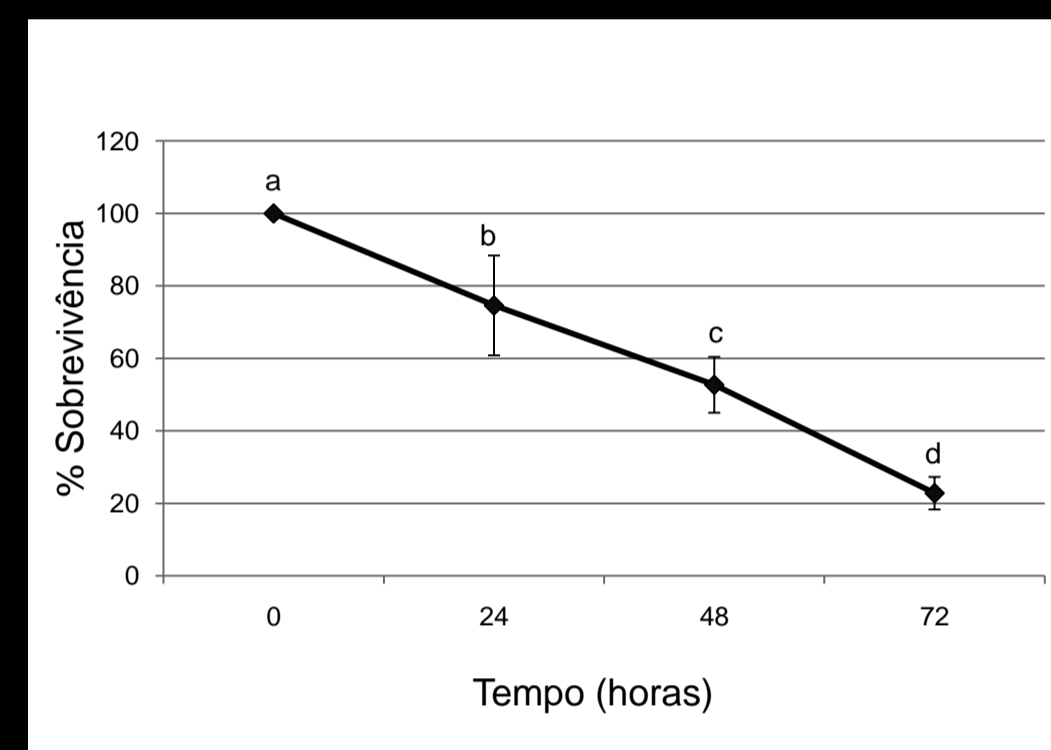
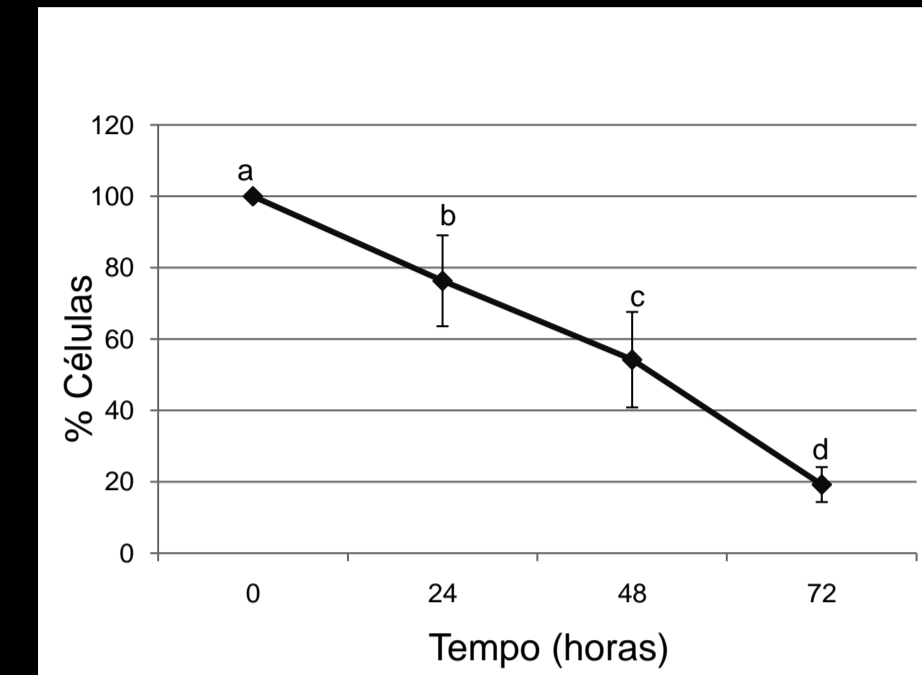
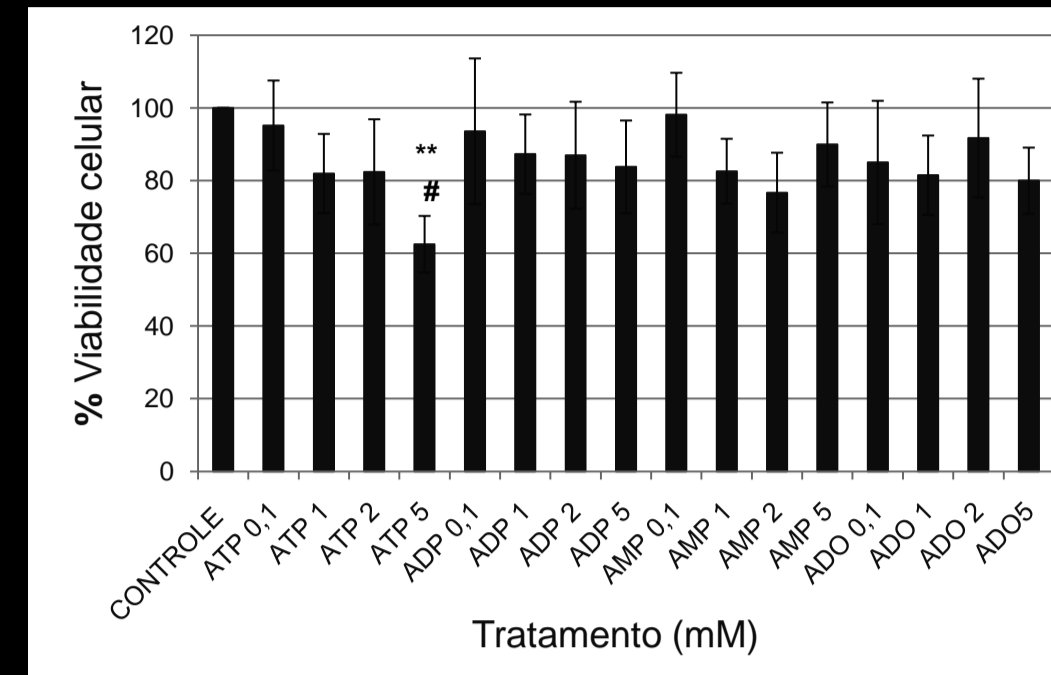
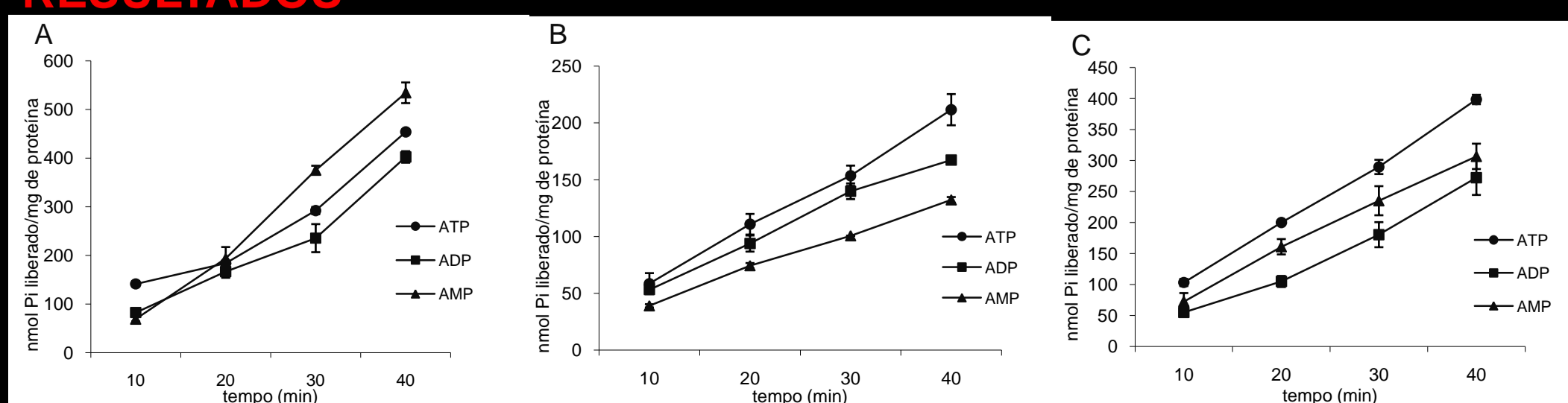
LDH (Lactato Desidrogenase)

A perda da integridade da membrana foi medida através de liberação de lactato desidrogenase (LDH), com o Kit Liquiform da Labtest Diagnóstica (Minas Gerais, Brasil). Resultados foram expressos como porcentagem de LDH liberada, sendo comparada com a atividade de células lisadas com 0,5% de Triton X-100.

Incorporação de Anexina V e Iodeto de Propídio (IP)

A externalização de fosfatidilserina (PS) foi determinada pelo método da Anexina V - FITC (Santa Cruz Biotecnologia, Inc.) de acordo com o protocolo do fabricante. Culturas de SiHa tratadas ou não com ATP 5mM por 24, 48 e 72h, foram tripsinizadas, centrifugadas por 6 minutos a 18.000 rpm e o sobrenadante descartado. O pellet foi suspenso com 150µL de tampão do kit e incubadas com anexina 0,75µL e IP 15µL/amostra por 15 min em temperatura ambiente no escuro e analisadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte, usando o software Guava EasyCyte para análise. Cisplatina foi usada como controle positivo para apoptose e Triton X-100 foi usado como controle positivo para necrose.

RESULTADOS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos com as linhagens SiHa, HeLa e C33A demonstram que as mesmas apresentam atividades de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, sendo lineares até 40 min de incubação e cátion dependentes (Mg²⁺ 4mM) (Resultados não mostrados).

Em relação aos efeitos dos nucleotídeos da adenina, resultados com a linhagem SiHa, demonstram uma redução significativa na proliferação celular quando as células foram tratadas com ATP 5 mM por 24 horas (37%). Não foi observada nenhuma redução significativa na proliferação celular durante um período de incubação de 2 horas.

Com base nos resultados obtidos para a viabilidade celular após tratamento com ATP 5mM, em 24 horas, investigamos o efeito deste nucleotídeo após 24, 48 e 72 horas, através da contagem celular e MTT.

Houve uma redução significativa no número de células nos tempos 48h e 72h, que foi proporcional ao tempo de tratamento com ATP 5mM (46% e 81%, respectivamente).

Uma vez que a LDH foi liberada de forma significativa apenas após 72h de tratamento, provavelmente necrose não seja o principal mecanismo pelo qual o ATP induz citotoxicidade na linhagem SiHa. Isto foi confirmado pela incorporação de anexina V e IP, que mostraram que o ATP provoca a morte celular principalmente por apoptose (coloração positiva - anexina), mas não por necrose (coloração com IP).

Considerando que os nucleotídeos da adenina exibem efeitos citotóxicos em células de câncer cervical (SiHa), tais como demonstrado neste estudo pelo ATP, estes podem ser considerados compostos importantes para a modulação do desenvolvimento desta neoplasia e podem apresentar uma aplicação futura como alternativa na terapia anti-câncer.

APOIO:

