

ANÁLISE DO EFEITO SINÉRGICO DO ATP E DO LPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE GLIOMAS

CARLUS AUGUSTU TAVARES DO COUTO¹; ELITA FERREIRA DA SILVEIRA²;
TIARA FURTADO²; KENNIA GALDINO²; NATHALIA STARK²; ELIZANDRA
BRAGANHOL³

^{1, 2, 3}Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, BR

¹carlusatc@gmail.com

³elizbraganhol@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Gliomas são os tumores cerebrais mais comuns e devastadores do sistema nervoso central (DAI E HOLLAND, 2001). A presença de um microambiente tumoral inflamatório parece estar relacionada com a capacidade proliferativa e invasiva, típicas desse tipo de tumor (DEMUTH et al, 2004). Os mecanismos que correlacionam imunidade inata, inflamação e câncer ainda são pouco claros, porém estudos indicam que a produção de citocinas por células imunes ativadas e a ativação de toll-like receptors (TLR) presentes nas células tumorais podem estabelecer uma comunicação entre os diferentes sistemas. Tem-se relacionado o aumento da malignidade bem como a resistência a radio/quimioterapia ao aumento da expressão de TLRs (CHEN et al, 2008). Estudos sugerem que o TLR-4, subtipo de TLR que é ativado classicamente por LPS, desempenha função importante na atividade proliferativa dos gliomas (HOELZINGER et al, 2007). Diferentes vias de sinalização, incluindo o sistema purinérgico, orquestram o funcionamento do sistema imune, os nucleotídeos extracelulares atuam como sinalizadores endógenos de injúrias exercendo efeitos sobre a resposta inflamatória (ZHANG et al, 2008). O ATP é liberado do meio intracelular para o meio extracelular em resposta a um dano e rapidamente alerta o sistema imune para a injúria celular (BOURS et al, 2006). O ATP está envolvido em diversas funções do sistema imune como produção de citocinas e recrutamento de células imunes para os sítios de injúria (VENTURA et al, 1991). A adenosina também é considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações contrárias as do ATP, mediando uma resposta anti-inflamatória e imunossupressora, importante para proteger os tumores do ataque imune (BOURS et al, 2006). Além disso, o ATP e a adenosina modulam positivamente o crescimento tumoral, estando envolvidos em processos de morte, proliferação celular e angiogênese. Os efeitos biológicos dos nucleosídeos e nucleotídeos são exercidos através da sensibilização de purinoreceptores (BURNSTOCK, 1976). As concentrações dos nucleotídeos no compartimento extracelular são controladas por ectoenzimas que catalisam a sua interconversão. As ectonucleotidases, através de reações sucessivas, constituem uma cascata enzimática altamente eficiente, hábil em controlar a concentração e o tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no espaço extracelular (ZIMMERMANN, 2001). Nesse trabalho objetivamos a análise do efeito de 2 concentrações de ATP e LPS, em conjunto ou isoladamente, na proliferação de gliomas, representados pela linhagem celular C6, glioma de rato.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura das linhagens celulares

Linhagem de glioma de rato (C6) obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera umidificada/5% de CO₂.

2.2 Tratamento das culturas

As células de glioma C6 foram semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de 15x10³ células/poço, quando posteriormente submetidas a contagem celular por meio de câmara de Neubauer, quando para quantificação por sulfarodamina B foram semeadas 1x10³ células por poço em placas de 96 poços, em ambas as situações as células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 5% de SFB. Após 24 h de incubação as células foram submetidas a um protocolo de redução de SFB a 0,5% com o objetivo de manutenção das células em fase G0 do ciclo celular. Decorridas 24 h, foi efetuado o tratamento com ATP (1 e 3 mM) e LPS (1 e 10 ng/mL) isoladamente ou em combinação por 72 h.

2.3 Contagem celular

Após encerrado o tratamento, as células foram soltas com 100 µL de tripsina por poço. A placa retornou para a incubadora por 5 minutos, após tal período foi adicionado 200 µL de meio DMEM /5% SFB para neutralizar o efeito da tripsina. Assim que o meio foi adicionado o volume final de 300 µL foi transferido para um eppendorf e homogeneizado por meio de pipetagem contínua. Após tais procedimentos a solução de células foi colocada em câmara de Neubauer para contagem.

2.4 Quantificação celular pelo método da sulfarodamina B

Após encerrado o tratamento, as células foram lavadas, tratadas com ácido tricloroacético a 50% w/v por 30 min em geladeira para a fixação das células. Decorrido esse tempo, o ácido foi retirado e foram efetuadas 5 lavagens com água para a retirada total do reagente. Após esse tempo, foi adicionada a solução de sulfarodamina B 0,4% w/v em ácido acético por 15 min para corar as proteínas. Decorrido esse tempo a solução foi retirada e foram efetuadas 5 lavagens dos poços com ácido acético a 1% v/v para total retirada do corante não complexado com as proteínas. Por fim, as placas foram submetidas a uma solução de Tris a 10 mM com o objetivo de solubilizar o corante complexado com as proteínas e assim ler em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 630 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, em incubação por 72 h com o tratamento, indicam que o ATP (nas concentrações de 1 e 3 mM) induziu um estímulo proliferativo na linhagem de glioma C6. As células tratadas com ATP (1 e 3 mM) apresentaram um aumento de 16% e 40% na proliferação celular, respectivamente. Já nas células tratadas com LPS (1 e 10 ng/mL), isoladamente, não foi observado alterações na proliferação celular. Por outro lado, o ATP (3 mM) em combinação com o LPS (1 e 10 ng/mL) promoveu um efeito sinérgico sobre a proliferação celular, com índices de aumento de 82% e 56%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle (Figura 1A). Esses dados estão em acordo com a hipótese inicial desse projeto a qual propõe a participação do sistema

purinérgico e dos *Toll-like receptors* (TLR), mais especificamente o TLR-4, na progressão dos gliomas, entretanto nenhum resultado significativo foi obtido com esse método de quantificação celular.

Em nova bateria de experimentos foi efetuada a quantificação celular por método indireto, coloração por sulfarodamina B. Entretanto, conforme o que pode ser visto na figura 1B, também não obtivemos resultados conclusivos sobre os possíveis efeitos associados do LPS e do ATP na proliferação dessa linhagem celular.

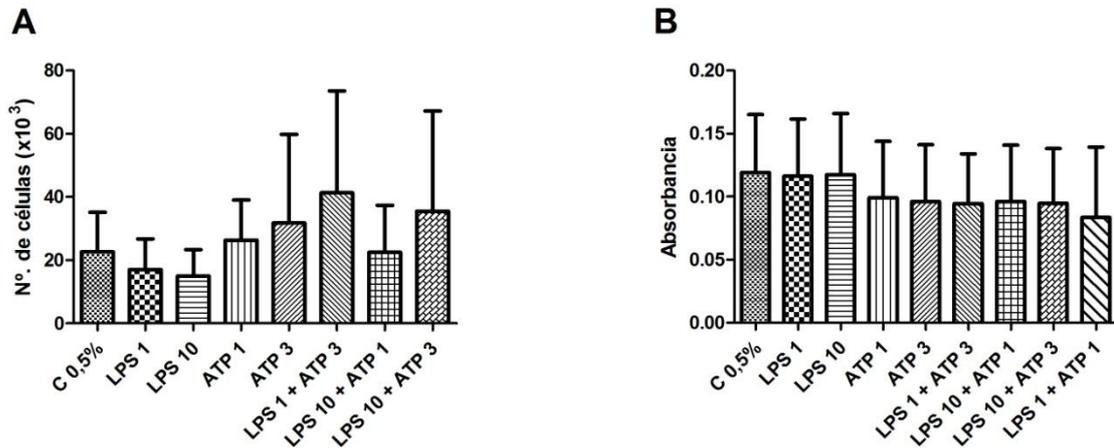


Figura 1. Quantificação celular após 72h de tratamento. A) resultados obtidos por contagem direta em câmara de Neubauer. B) quantificação indireta através de protocolo de coloração por sulfarodamina B. Os dados são expressos como Média \pm desvio padrão ($p < 0,05$) ($n=3$).

4. CONCLUSÕES

Tanto o método de contagem quanto o método de coloração por sulfarodamina B se mostraram ineficazes para a análise do efeito sinérgico. Novos estudos devem ser feitos, bem como uma padronização mais detalhada de concentrações dos componentes do tratamento para a obtenção de melhores resultados que possam assim indicar uma significância estatística suficiente para fundamentar a conexão da proliferação e crescimento tumoral com o ATP e os ligantes de receptores TLR-4.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOURS MJ, SWENNEN EL, DI VIRGILIO F, CRONSTEIN BN, DAGNELIE PC. Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, 112 (2), p. 358-404, 2006.

Burnstock G. Purinergic receptors. **Journal of Theoretical Biology**. v. 62(2), p. 491-503, 1976.

CHEN R, ALVERO AB, SILASI DA, STEFFENSEN KD, MOR G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. **Oncogene**, v. 27(2), p. 225-33, 2008.

DAI C, HOLLAND EC. Glioma models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1551(1), p. M19-27. 2001

DEMUTH T, BERENS ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **Journal of Neuro-oncology**, v. 70 (2), p. 217-28, 2004

HOELZINGER DB, DEMUTH T, BERENS ME. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. **Journal Natl Cancer Inst**, v. 99(21), p. 1583-93, 2007.

VENTURA M A, THOMOPOULOS P. Effect of ATP and ADP on U-937 Promonocyte Cell Adhesiveness and Intracellular Ca⁺⁺ Levels. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 10 (5), p. 1195-1197, 1991.

ZHANG X, MOSSER DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v.214, p. 61-178, 2008.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. **Drug Development Res**, v. 52, p. 44-56, 2001.