AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FOSFOLIPASE-D RECOMBINANTE LiRecDT1 DO VENENO DA ARANHA MARROM (*Loxosceles intermedia*) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS LUCÊMICAS HL-60

Charline Benhuk Pontes (PIBIC/UEPG), Ana Carolina Martins Wille (Orientadora), e-mail: anacarolina.wille@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética/ Setor de Ciências Biológicas e da Saúde/ Ponta Grossa, PR

Ciências Biológicas/ Citologia e Biologia Celular
Palavras-chave: Fosfolipases-D loxoscélicas, proliferação celular, leucemia promielocítica aguda

Resumo
No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doenças, tornando-se desta maneira, um grande problema de saúde pública. Entre as várias formas da doença merece atenção especial pelos profissionais de saúde, as leucemias tanto as crônicas como as agudas. Diante disto, tem sido uma busca constante uma maior agilidade no diagnóstico e a busca por novas formas de tratamento. Drogas com capacidade de promover a diferenciação de células leucêmicas em células não leucêmicas têm sido uma busca constante pelos pesquisadores. No presente trabalho foi proposto a utilização de uma fosfolipase-D recombinante obtida da glândula de veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia* como um possível indutor da diferenciação de células leucêmicas em células sanguíneas maduras não leucêmicas. Para isto, as linhagens leucêmicas HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e K562 (leucêmia mielóide crônica) foram submetidas ao tratamento em diferentes concentrações da fosfolipase-D recombinante de aranha marrom. Os resultados mostraram alterações significativas no padrão morfológico das células K562 nas maiores concentrações testadas.

Introdução

As leucemias, observadas pela primeira vez por médicos europeus no século XIX, compreendem um grupo de doenças complexas e diferentes entre si que se originam na medula óssea. Entre as várias formas da doença merece atenção especial pelos profissionais de saúde, a leucemia promielocítica aguda (LPA subtipo M3). São sintomas comuns desta doença: dor nos ossos, perda de peso, aumento dos nódulos linfáticos, fadiga e fraqueza, respiração curta, palidez, dor de cabeça, tonturas, febre, infecções recorrentes, hematomas e sangramentos pelo nariz ou gengivas (MARTINS, S. L. R., e FALCÃO, R. P., 2000; JÁCOMO et al., 2008).

A LPA M3 apresenta boa resposta ao tratamento com quimioterapia associada ao ácido trans retinóico (ATRA), um indutor da diferenciação das células leucêmicas em células granulocíticas (JÁCOMO et al., 2008). Tem sido extensivamente descrito na literatura o papel do ácido trans retinóico bem como de outros compostos como dimetil sufóxido (DMSO) na diferenciação de células de LPA em granulócitos maduros, bem como, o papel de 1,25 – dihidroxivitamina D3, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) na diferenciação em células monocíticas como macrófagos.

Diante disto, neste trabalho foi proposto a utilização de uma fosfolipase-D recombinante obtida da glândula de veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia* como um possível indutor da diferenciação de células leucêmicas HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e K562 (leucêmia mielóide crônica) em células sanguíneas maduras não leucêmicas. Estas enzimas catalizam a hidrólise de diferentes fosfolipídios gerando ácido fosfatídico, ou ácido lisofosfatídico (LPA), ou ceramida-1-fosfato (C1F). O LPA se liga a receptores específicos, denominados receptores LPA1-8 de superfície celular, acoplados a proteína G, os quais sinalizam para diferentes respostas biológicas (HOUBEN E MOOLENAAR, 2011). Ainda não foram feitos estudos sobre o papel desta molécula como indutor de diferenciação celular.

Materiais e Métodos

Expressão e purificação da toxina recombinante LiRecDT1: A expressão e purificação da toxina recombinante LiRecDT1 foi realizada no laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Animais Peçonhentos (LME), do Setor do Ciências Biológicas da UFPR. A expressão da proteína recombinante LiRecDT1 (número de acesso ao Genbank ABA62021) foi realizada de acordo com CHAIM *et al.,* (2006) em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS como proteína de fusão, com etiqueta de 6 Histidinas no N-terminal e 13 aminoácidos ligados incluindo um sítio de ligação de trombina entre a etiqueta de 6 histidinas e a proteína madura. Após a indução as bactérias foram sedimentadas por centrifugação e rompidas por criofratura com o auxílio de Lizosima. As suspensões dos materiais lisados foram levadas a uma coluna de Ni-NTA agarose para a purificação das proteínas recombinantes. Após a purificação, as toxinas recombinantes foram dosadas pelo método de Bradford, aliquotadas e mantidas à -20°C até o momento do uso (CHAIM *et al*., 2006).

***Cultivo das linhagens celulares HL-60 e K562*:** As células foram cultivadas em garrafas plásticas com os meios RPMI1640, F12 ou DMEM, acrescidos de soro fetal bovino – SFB a 10% e insulina (para a linhagem HL-60). As culturas foram mantidas em estufas à 37°C, contendo 2,5% ou 5% de CO_2, com umidade controlada 95%.

Tratamento das células das linhagens HL-60 e K562 com a toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1: As células foram cultivadas e mantidas em cultura nas condições descritas acima e tratadas com a fosfolipase-D recombinante LiRecDT1 em diferentes concentrações por 24 horas. Após o tratamento as células foram fixadas em lâminas e coradas com a técnica descrita abaixo a fim de verificar se houve diferenciação celular (alteração morfológica). Para cada tratamento foram feitas 5 lâminas, de cada lâmina foi avaliado por microscopia óptica convencional um campo no aumento de 400x, os tipos celulares encontrados foram quantificados e analisados. Como controle negativo foram analisadas células não expostas ao tratamento com LiRecDT1.

Técnicas de coloração para verificar se ocorreu diferenciação celular:

Giemsa - May Grünwald: é uma mistura de corantes com características neutras, que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células. Esta técnica foi utilizada para identificar morfologicamente as células e algumas estruturas celulares.

Resultados e Discussão

Expressão e purificação da toxina recombinante LiRecDT1

Na figura 1 abaixo é possível verificar no gel a presença da proteína expressa em diferentes etapas de expressão e purificação.

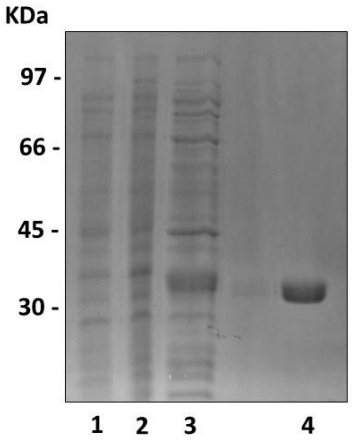


Figura 1: Etapas de expressão e purificação da toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1 em resina de Ni^{2+}-NTA-agarose. *Em* (1) cultura bacteriana antes da expressão; em (2) cultura bacteriana 3,5 horas após a adição de IPTG; em (3) *void* da cromatografia após a incubação do conteúdo lisado com resina Ni^{2+}-NTA-agarose; em (4) proteína recombinante eluída da resina. SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras.

No gel de purificação da toxina LiRecDT1 é possível observar que existe pequena expressão basal da proteína pela bactéria no tempo 0h. O plasmídio pLysS reprime a expressão na ausência de IPTG. A ligação na resina de níquel é satisfatória, pois não é observada uma banda considerável da proteína no *void* (proteína que não se ligou a resina).

Tratamento das células das linhagens HL-60 e K562 com a toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1

Na linhagem K562 foram observadas alterações morfológicas das células tratadas quando comparadas ao grupo controle. Os resultados estão expostos abaixo na **figura 2** e mostrados na **tabela 1.**

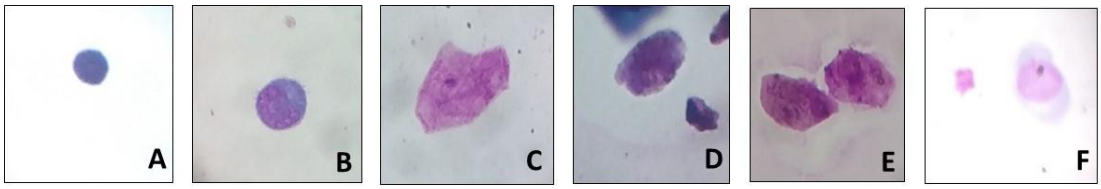


Figura 2: Variantes celulares presentes na linhagem K562 (leucemia mielóide crônica) encontrada no grupo controle ou nos grupos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1 e analisadas pela técnica de coloração Giemsa - May Grünwald. A- Célula progenitora mielóide; **B -** metamielócito; **C -** pró-granulócito; **D -** macrófagos; **E -** macrófagos com corpos apoptóticos **(*); F -** Monoblasto

	A	B	C	D	E	F	G (células não identificadas)
Controle	91%						9%
1µg/mL	85%						15%
40µg/mL		10%	23%	40%	10%	1%	16%
100µg/mL			40%	40%	10%		10%

Tabela 1: Percentagem das variações celulares encontradas na linhagem K562 (leucemia mielóide crônica) nas células submetidas ao tratamento com diferentes concentrações da toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1.

Os resultados mostraram que houve diferenciação das células da linhagem K562 tratadas com a toxina LiRecDT1 especialmente quando as células foram incubadas com 40 e 100µg/mL da toxina. Pela morfologia observada pela técnica utilizada, sugere-se que nestas concentrações, as células tenham se diferenciado seguindo predominantemente a rota monoblástica.

Os resultados descritos acima abriram a possibilidade da fosfolipase-D recombinante LiRecDT1 em atuar nos efeitos biológicos relacionados ao câncer. Atualmente as pesquisas que elucidam os efeitos biológicos das fosfolipases-D ou de inibidores para seus efeitos têm sido constantes. Além disso, isoformas de fosfolipases-D têm sido evidenciadas como possíveis modelos para o desenvolvimento de drogas e outras aplicações biotecnológicas. (SENFF-RIBEIRO, et al., 2008). Quanto as células da linhagem HL-60, estas não mostraram alterações morfológicas nas doses testadas quando comparadas ao controle (dados não mostrados).

Conclusão

A toxina LiRecDT1 foi capaz de promover a diferenciação das células da linhagem K562 nas maiores concentrações testadas podendo ter um papel importante que leve a contenção da doença. O mesmo não foi observado para as células da linhagem HL-60 em que as células não apresentaram alterações morfológicas visíveis pelos métodos analisados. Os resultados apresentados abrem novas possibilidades para a compreensão dos mecanismos moleculares pelas quais as fosfolipases-D recombinantes testadas estão envolvidas com os eventos de diferenciação celular

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio técnico-científico dos professores e pós-graduandos do laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Animais Peçonhentos (LME) do setor de Ciência Biológicas da UFPR, da UEPG e recursos financeiros do CNPq.

Referências bibliográficas

BIRNIE, G. D., The HL-60 cell line: A model system for studyng human myeloid differentiation. **Br. J. Cancer.** 58(IX):41-45, 1988.

CHAIM, O.M., TREVISAN-SILVA, D., CHAVES-MOREIRA, D., WILLE, A.C.M., FERRER, V.P., MATSUBARA, F.H., MANGILI, O.C., DA SILVEIRA, R.B., GREMSKI, L.H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., VEIGA, S.S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins** 3: 309-344, 2011.

HOUBEN, A. J., MOOLENAAR. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. Cancer Metastasis Rev. 30: 557-565, 2011.

inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.

JÁCOMO, R. H., FIGUEIREDO-PONTES, L. L., REGO, E. M., Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Rev. Assoc Med Bras.** 54(1): 82-89, 2008.

MARTINS, S. L. R., FALCÃO, R. P., 2000., A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda. **Rev. Assoc Med Bras.** 46(1): 2000.

oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-da-leucemia-mieloide-cronica-lmc/1646/337/2017.

SENFF-RIBEIRO, A., DA SILVA, P.H., CHAIM, O.M., GREMSKI, L.H., PALUDO, K.S., DA SILVEIRA, R.B., GREMSKI, W., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol. Adv.** 26: 210-218, 2008.