AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FOSFFOLIPASE-D RECOMBINANTE LiRecDT1 DO VENENO DA ARANHA MARROM (*Loxoceles intermedia*) SOBRE A ADESÃO DAS CÉLULAS DAS LINHAGENS B16-F1 E B16-F10 AO SUBSTRATO DE CULTIVO

Murilo Rossi de Matos(PROVIC/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.

Área/subárea do conhecimento CNPq: Morfologia/Citologia e Biologia celular

Palavras-chave: Fosfolipase-D loxoscélica, adesão celular, melanoma murino.

Resumo

Aranhas do gênero *Loxosceles* são eficazes em produzir em seus venenos uma grande quantidade de fosfolipases-D. Na maioria das células, estas enzimas são conhecidas como reguladoras da fisiologia celular pois 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 LPA_{1-8} de superfície celular, acoplados a proteína G, os quais sinalizam para diferentes respostas biológicas. O LPA também é conhecido como regulador do crescimento de muitos tipos celulares e têm sido relacionado ao crescimento e a metástase em muitos tipos de tumores. Resultados encontrados na literatura tem demonstrado que as fosfolipases-D tem favorecido a sobrevivência tumoral, especialmente em melanomas, aumentando a proliferação e migração por meio da ativação de receptores LPA. Diante desta casuística, o objetivo deste trabalho foi observar o efeito da fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia* sobre à adesão das células de melanomas murinos B16-F1 e B16-F10 ao substrato de cultivo. Os resultados obtidos embora não significativos mostram uma tendência da fosfolipase-D loxoscélica em aumentar a adesão celular nos maiores tempos de tratamento e nas maiores concentrações testadas.

Introdução

As fosfolipases são uma família de enzimas encontradas em várias fontes biológicas incluindo os organismos procarióticos e eucarióticos. Entre os diversos tipos de fosfolipases, as fosfolipases-D têm sido descritas como importantes reguladoras de vários aspectos críticos da fisiologia celular. Estas enzimas catalizam a hidrólise de diferentes fosfolipídios gerando ácido fosfatídico, ou ácido lisofosfatídico (LPA), ou ceramida-1-fosfato (C1F) importantes mediadores nos eventos de sinalizações celulares. O LPA se liga a receptores específicos, denominados receptores LPA_{1-8} de superfície celular, acoplados a proteína G, os quais sinalizam para diferentes respostas biológicas (HOUBEN E MOOLENAAR, 2011).

É bastante descrito na literatura o papel da molécula de autotaxina (ATX), uma enzima ectonucleotídica do tipo fosfodiesterase pirofosfatase (E-NPP) com atividade lisofosfolipase-D, isolada pela primeira vez de células de melanoma humano (STRACKE *et al.,* 1992). Atualmente sua atividade está relacionada a vários processos fisiológicos e patofisiológicos incluindo desenvolvimento vascular e neural, transporte de linfócitos, fibrose e progressão tumoral (HOUBEN E MOOLENAAR, 2011).

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas popularmente como aranhas marrons, também são eficazes em produzir em seus venenos uma grande proporção de fosfolipases-D (WILLE, 2014). No veneno destas aranhas, estas enzimas estão relacionadas à dermonecrose, desregulação da resposta inflamatória, hemólise, nefrotoxicidade e agregação plaquetária (WILLE, 2014).

A elucidação das atividades biológicas das fosfolipases-D com base na sua organização molecular e seu modo de ação em diferentes modelos celulares, bem como receptores celulares e a comparação das fosfolipases-D de melanomas murinos com as fosfolipases-D loxoscélicas poderão transmitir informações sobre catálise e ações mecanísticas destas enzimas, fornecendo dados úteis para a concepção de inibidores ou outras aplicações biotecnológicas.

Diante deste problema buscou-se neste trabalho realizar uma nova pesquisa que vise elucidar o papel das fosfolipases-D na fisiologia celular, para isto foi avaliado o papel da fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia* sobre a adesão das células dos melanomas murinos B16-F1 e B16-F10 ao substrato de cultivo.

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 da expressão da toxina recombinante, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação e rompidas por criofratura com o auxílio de Lizosima (1mg/mL) em tampão de ligação (fosfato de sódio 50mM, pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 10mM). Os materiais lisados foram centrifugados em 20.000g por 20 minutos, posteriormente as suspensões foram levadas a uma coluna de Ni-NTA agarose para a purificação das proteínas recombinantes. As colunas foram lavadas exaustivamente em tampão de lavagem (fosfato de sódio 50mM, pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 20mM) até a densidade óptica (D.O.) de 0.01 em 280nm e eluídas em tampão de eluição (fosfato de sódio 20mM, pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 250mM). 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:

As linhagens celulares tumorais de melanomas (B16F1 e B16F10) foram cultivadas utilizando-se garrafas plásticas com os meios RPMI1640 ou DMEM (Cultilab), acrescidos de soro fetal bovino a 10% (Cultilab). As culturas foram

mantidas em estufas à 37°C, contendo 2,5% ou 5% de CO_2, com umidade controlada 95%. As alíquotas para estoque e repique posterior das linhagens foram mantidas nos respectivos meios, acrescidos de soro bovino fetal a 50% e DMSO a 10%, congeladas à -20°C e -80°C e depois em nitrogênio líquido –198°C.

Ensaios de adesão celular com as células previamente tratadas com a fosfolipase-D loxoscélica recombinante LiRecDT1:

As células cultivadas e mantidas em cultura nas condições descritas acima foram submetidas ao tratamento com a fosfolipase D recombinante LiRecDT1 em diferentes concentrações (1, 40 e 100µg/mL) diluídas em meio de cutura. Após o tratamento por 2, 6 e 12 horas as células foram colocadas para aderir em placas de cultivo de 12 poços e mantidas por 2 horas. Após este período de tempo as células não aderidas foram removidas por aspiração e submetidas a múltiplas lavagens em PBS estéril. As células aderidas foram fixadas com metanol por 10 minutos, coradas com cristal violeta 0,8% dissolvido em metanol 20% por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas em PBS. O corante foi eluído com 1mL de citrato de sódio 0,1M, em etanol 50%, por 30 minutos. A concentração do corante de cada poço foi quantificada por leitura de absorbância a 550 nm, em leitor tipo ELISA. Como controle positivo foram utilizadas células não expostas ao tratamento com LiRecDT1 e como controle negativo foram utilizadas as absorbâncias de poços sem células. Cada variável foi analisada em pentaplicata.

Resultados e Discussão

Expressão e purificação da toxina recombinante LiRecDT1:

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

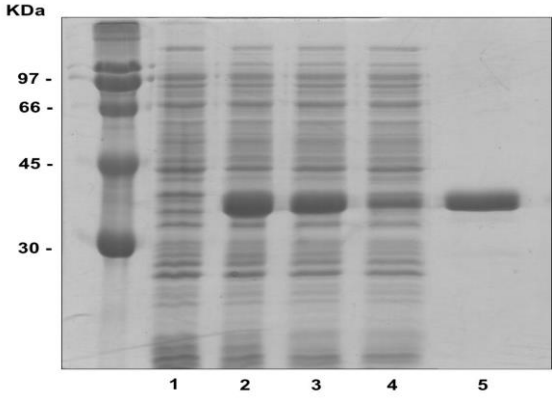


Figura 1: Etapas de expressão e purificação da toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1 em resina de Ni^{2+}-NTA-agarose. À esquerda estão indicadas as massas moleculares; em (1) cultura bacteriana antes da expressão; em (2) cultura bacteriana 3,5 horas após a adição de IPTG; em (3) lisado bacteriano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

A proteína recombinante LiRecDT1 foi expressa e purificada de maneira eficaz. No gel foi possível observar que a proteína recombinante teve expressão basal pela bactéria no tempo 0h e que o plasmídio pLysS foi capaz de inibir a expressão da proteína na ausência de IPTG. A banda pequena do *void* demonstrou a eficiência da ligação da toxina LiRecDT1na resina de Ni-NTA agarose.

Adesão celular com as células previamente tratadas com a fosfolipase-D loxoscélica recombinante LiRecDT1:

Os resultados obtidos embora não significativos mostram uma tendência da fosfolipase-D loxoscélica em aumentar a adesão celular nos maiores tempos de tratamento e nas maiores concentrações testadas em ambas as linhagens celulares analisadas.

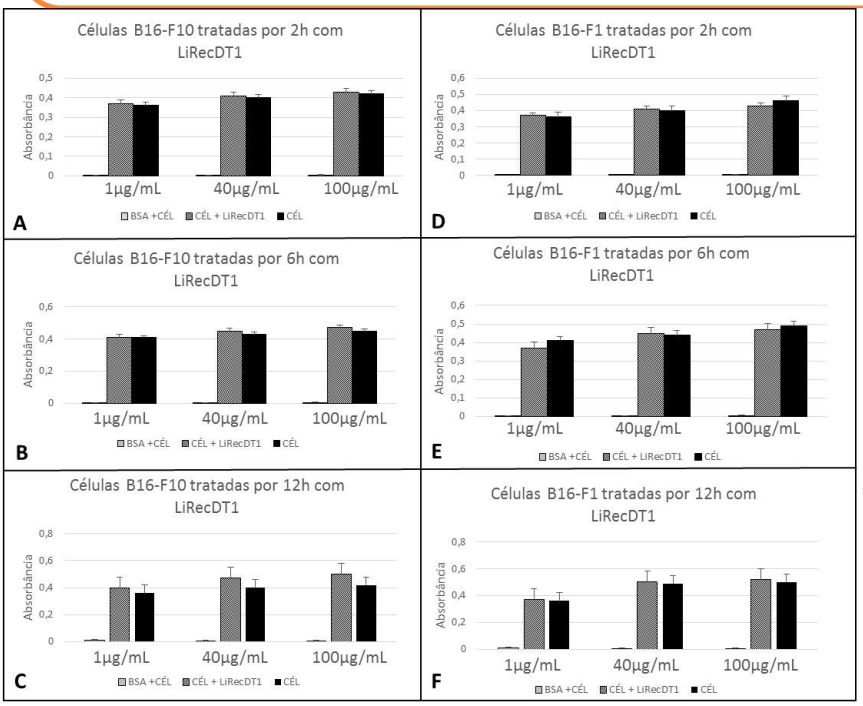


Figura 2: Os gráficos mostram os efeitos de LiRecDT1 sobre a dinâmica de adesão de células B16-F10 e B16F1 ao substrato de cultivo. (A, D) Efeito de LiRecDT1 após 2 horas de incubação, **(B, E)** Efeito de LiRecDT1 após 6 horas de incubação, **(C, F)** Efeito de LiRecDT1 após 12 horas de incubação. O controle positivo da adesão é representado pelas células **(CÉL)** na ausência de tratamento, o controle negativo está representado por **(BSA + CÉL) (**BSA – albumina sérica bovina) e a representação das células que foram incubadas com LiRecDT1 **(CÉL + LiRecDT1).**

Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram a tendência da toxina recombinante (LiRecDT1) com atividade fosfolipase-D em atuar em eventos de dinâmicas celulares. Tais resultados estão de acordo com resultados obtidos em experimentos realizados anteriormente em que a fosfolipase-D da aranha marrom *Loxosceles intermedia* foi capaz de promover a migração das células tumorais das linhagens B16-F1 e B16-F10 nas maiores concentrações e tempos de tratamento analisados.

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 Ciências Biológicas da UFPR, da UEPG e recursos do CNPq.

Referências

CHAIM, O.M., SADE, Y.B., DA SILVEIRA, R.B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ OLORTEGUI, C., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., VON DIETRICH, C.P., NADER, H.B., SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 211: 64-77, 2006.

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

STRACKE, M. L., KRUTZSCH, H. C., UNSWORTH, E. J., ARESTAD, A., CIOCE, V., SCHIFFMANN, E., LIOTTA, L. A. Identification, purification and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimuling protein. J. Biol. Chem. 267: 2524-2529, 1992.

WILLE, A. C. M., CHAVES-MOREIRA, D., SILVA, D.T., MAGNONI, M.G., FERREIRA, M.B., GREMSKI, L.H., GREMSKI, W., CHAIM, O.M., SENFFRIBEIRO, A., VEIGA, S.S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Toxicon** 67: 17-30, 2013.