

Julia Biz Willig¹, Andréia Buffon¹

Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC), Faculdade de Farmácia, UFRGS

INTRODUÇÃO

A DPPIV/CD26 é uma glicoproteína transmembrana capaz de degradar peptídeos bioativos e quimiocinas, regulando assim a proliferação e sobrevivência celular, estando então envolvida em processos relacionados ao câncer. Além disso é principal proteína de ligação para a enzima adenosina deaminase (ADA) e também se liga a proteínas da matriz extracelular. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram expressão e atividade reduzida desta proteína em linhagens celulares de câncer cervical. O objetivo deste estudo foi induzir a superexpressão da DPPIV/CD26 em células de câncer de colo do útero, para posterior análise da influência desta proteína em processos tumorais. Além disso, também avaliaremos a dependência da atividade enzimática no seu papel no câncer de colo do útero, usando uma forma mutada desta proteína (CD26mut).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de Células

As linhagens celulares HeLa (carcinoma cervical humano) e HEK-293 (rim embrionário humano) foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂.

Transfecção Celular

As células foram semeadas em placas de 96 poços (5x10³ células/poço) e transfectadas após 24h de cultura, usando 0,1ug de plasmídeos (pLR2, pLR2CD26wt ou pLR2CD26mut), e 0,3μl de solução de polietilenimina (PEI 1ug/μl). As células foram analisadas 24, 48 e 72h pós-transfecção. A expressão do gene repórter (proteína verde fluorescente - GFP) nas células transfectadas foram analisados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

Ensaio da atividade enzimática da DPPIV/CD26 em células aderentes

As células foram semeadas em placas de 96 poços (5 x 10³ células/poço) e quando confluentes foram incubadas na presença do substrato Gli-Pro-p-nitroanilida 2,5 mM durante 60 minutos de reação em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de tampão de acetato de sódio 1M, pH 4,4. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 405 nm. A fim de determinar a p-nitroanilina liberada, uma curva padrão de p-nitroanilina foi preparada. A atividade enzimática é expressa em nmol de p-nitroanilina liberada/min/mg de proteína.

Ensaio da atividade enzimática da DPPIV/CD26 no sobrenadante das células aderentes

As células aderentes confluentes em garrafas de 25 cm² foram mantidas em contato com 2 mL de meio de cultura sem soro e sem vermelho de fenol por 1 hora. Após, este sobrenadante foi recolhido e incubado na presença do substrato Gli-Pro-p-nitroanilida 2,5mM como descrito no item acima.

Citometria de fluxo

As células foram incubadas com anticorpo de DPPIV/CD26 conjugado com PE (SC-19607 PE, Santa Cruz Biotechnology), durante 20 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. As amostras foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

RESULTADOS

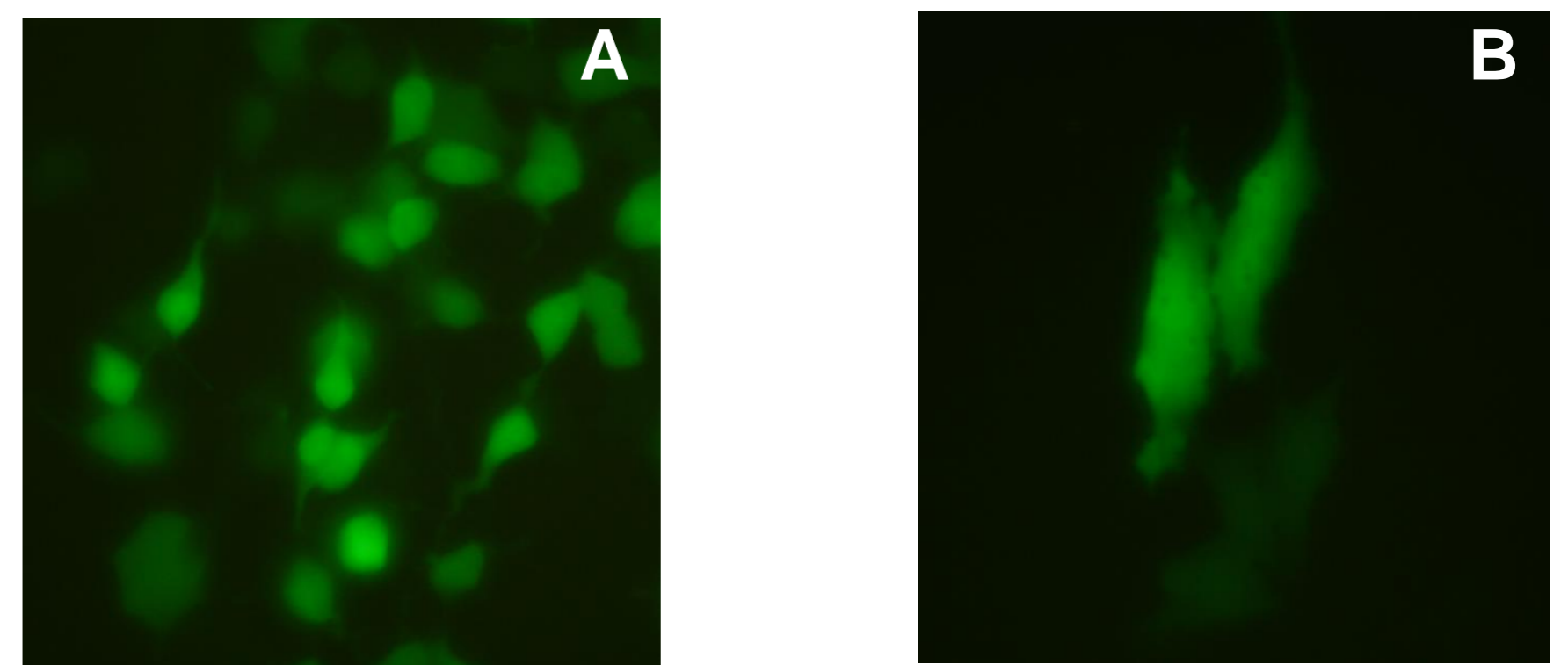


Figura 1. Microscopia de fluorescência para o gene repórter (GFP) em células HEK-293(A) e HeLa (B) transfectadas. Aumento 400x.

Tabela 1. Atividade específica de hidrólise de Gli-Pro-p-nitroanilida à temperatura ambiente em pH=8, em células aderentes e sobrenadante celular.

Linhagem celular		wt	pLR2	CD26wt	CD26mut
HEK-293	Células aderentes	13.8± 0.3	15.6± 1.2	55.5± 1.6*	12.2± 0.6
	Sobrenadante	38.2± 0.4	38.9± 0.9	52.3± 1.2*	35.8± 1.1
HeLa	Células aderentes	3.7± 0.2	3.3± 0.3	6.7± 0.8*	3.1± 0.3
	Sobrenadante	10.5± 0.6	11.0± 0.4	11.8± 1.5	10.2± 0.3

*Representa a significância estatística, quando as células transfectadas foram comparadas com respectivo controle (wt). ANOVA seguido pelo teste de tukey, p<0,05.

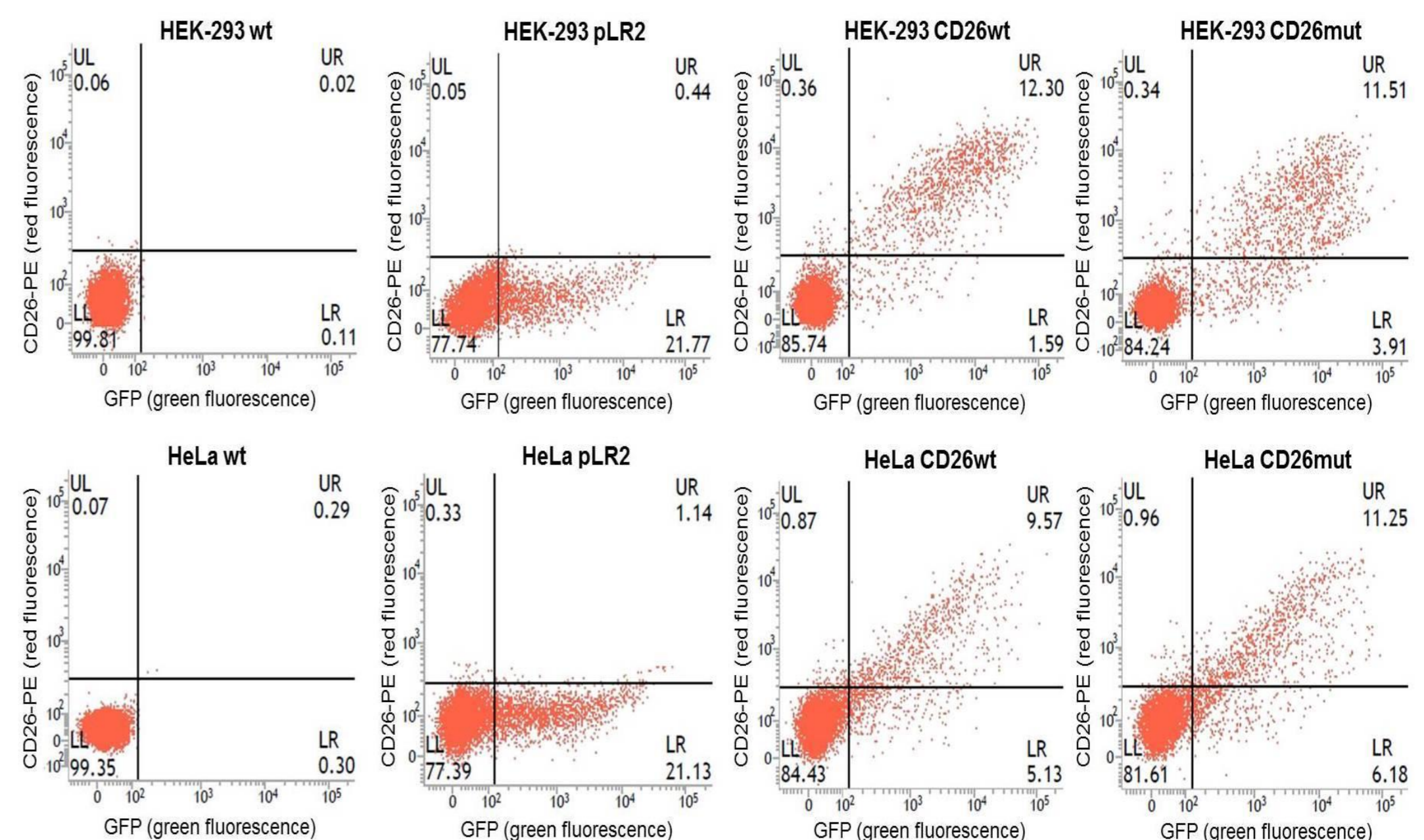


Figura 2. Expressão DPPIV/CD26 e GFP após 48 horas de transfecção nas linhagens celulares HeLa e HEK-293 por citometria de fluxo.

CONCLUSÃO

- A indução da superexpressão da DPPIV/CD26 foi confirmada através da citometria de fluxo, que demonstrou um aumento na expressão de DPPIV/CD26 nas células GFP+ transfectadas com pLR2CD26wt e pLR2CD26mut
- As células transfectadas com pLR2CD26wt demonstraram um aumento significativo da atividade da enzima nas células aderentes, enquanto pLR2CD26mut não afetou a atividade enzimática, o que confirma o efeito da mutação S630A na atividade enzimática
- Demonstrou-se que o plasmídeo pLR2 vazio não afeta a atividade enzimática quando comparado com as células não transfectadas (WT).
- No sobrenadante, um aumento na atividade enzimática foi observado apenas na linhagem celular HEK-293, que parece secretar essa proteína de forma mais eficiente
- Este estudo continua em desenvolvimento e a superexpressão de DPPIV/CD26 em linhagens celulares será importante para continuação da investigação do papel desta proteína nos mecanismos tumorais em células de câncer de colo do útero.