

Efeito dos nucleotídeos da adenina na proliferação e morte celular em cultura de células de carcinoma cervical

Aline Beckenkamp¹, Danielle Bertodo¹, Paola Mello¹, Márcia R. Wink², Guido Lenz³, Alessandra N. Bruno⁴, Andréia Buffon¹.

¹ Laboratório de Bioquímica, Dept. Análises, Faculdade de Farmácia/ UFRGS

² Laboratório de Biologia Celular, UFCSPA

³ Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Dept. de Biofísica/UFRGS

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 cervical¹, entretanto, o mecanismo pelo qual as células transformadas pelo HPV resistem a apoptose ainda não está claro. Evidências indicam que a sinalização purinérgica pode ter efeitos tróficos no crescimento e morte celular na epiderme humana, e está relacionado com processos patológicos, incluindo o câncer².

Estudos demonstram que os nucleotídeos da adenina podem ser citotóxicos para células tumorais, dependendo da concentração³. Neste sentido, acredita-se que o ATP extracelular exerce efeitos de toxicidade mediados por apoptose, possivelmente via ativação de purinoreceptores P2X₇⁴.

OBJETIVOS

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos nucleotídeos da adenina na proliferação e morte celular, em culturas de células de carcinoma cervical (SiHa, HeLa 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.

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 atingirem confluência, foram expostas a ATP, ADP, AMP e adenosina em diferentes concentrações, por 2h e 24h. Controles 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 hemocitômetro. 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).

RESULTADOS

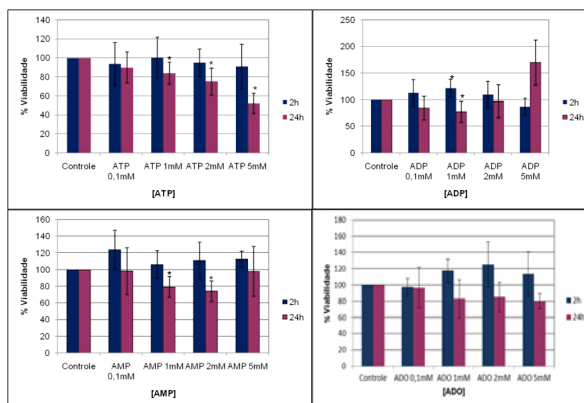


Figura 1: Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de nucleotídeos de adenina, por 2h e 24h, para a linhagem SiHa. *Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$, determinado por Teste t).

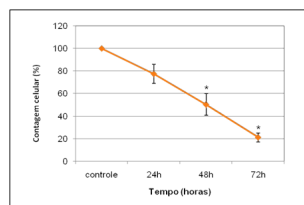


Figura 2: Contagem celular após tratamento com 5mM de ATP nos diferentes tempos, para a linhagem SiHa. *Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$, determinado por Teste t).

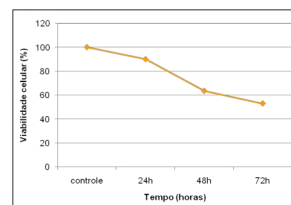


Figura 3: Viabilidade celular após tratamento com 5mM de ATP nos diferentes tempos (n representativo de um experimento), para a linhagem SiHa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados preliminares com a linhagem SiHa, demonstram uma redução significativa na proliferação celular quando as células foram tratadas com ATP nas concentrações de 1, 2 e 5 mM (16,0, 24,8 e 47,8%, respectivamente) e com AMP 1 e 2 mM (20,8 e 25,7%, respectivamente) por 24 horas. Não foi observada nenhuma redução significativa na proliferação celular com o tempo de 2 horas, em nenhuma das concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina testadas.

Com base nos resultados obtidos para a viabilidade celular após tratamento com ATP 5mM, em 24 horas (fig. 1), investigamos o efeito deste nucleotídeo na linhagem SiHa, após 24, 48 e 72h, através da contagem celular e MTT. Observou-se uma redução significativa na contagem celular nos tempos de 48 e 72 horas (49,6 e 78,8%, respectivamente), essa redução foi proporcional ao tempo de tratamento.

Considerando que os nucleotídeos da adenina exibem efeitos citotóxicos em células de câncer cervical, tais como demonstrado neste estudo, 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ YAOIN M., RUNHUA L., FUXI Z. Analyses of Bcl-2, Survivin, and CD44v6 expressions and human papillomavirus infection in cervical carcinomas. Scand J Infect Dis. 39:441-8, 2007.

² ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. Jpn. J. Pharmacol. 78, 113-145, 1998.

³ DI VIRGILIO F., PIZZO P., ZANOVELLO P., BRONTE V., COLLAVO D. Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. Immunol. Today. 11, 274-277, 1990.

⁴ FERRARI, D., LOS, M., BAUER, M. K., VANDENABEELE, P., WESSELBOURG, S., SCHULZE-OSTHOFF, K. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. FEBS Lett. 1999, 447, 71-75.