

Determinação das atividades da adenosina deaminase e CD26 em células de carcinoma cervical humano.

Danielle Bertodo Santana¹, Aline Beckenkamp¹, Denise Pereira², Alessandra Bruno³, Andréia Buffon¹.



¹Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

²Instituto Nacional do Câncer – INCA

³Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil



Introdução

O câncer cervical é a neoplasia que mais afeta as mulheres em todo o mundo e a busca de novos marcadores pronósticos é importante na redução da mortalidade desta doença. Muitos estudos já demonstraram que a atividade enzimática da adenosina deaminase (ADA) e da dipeptidil peptidase IV/ CD26 (DPPIV) está alterada em muitos tipos de câncer. A adenosina deaminase, ou ADA, realiza a hidrólise da adenosina, substância conhecida por estimular a proliferação celular e a agregação plaquetária. A ADA pode ser ancorada pela membrana (ecto-ADA) por uma enzima – CD26 – que além de exercer sua função como proteína âncora, também é capaz de hidrolisar dipeptídeos que contenham glicina ou prolina na região N-terminal, substâncias que também podem estimular a proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral. Considerando a importância de se entender o processo de formação do tumor e sabendo das dificuldades de diagnóstico da doença, este estudo tem por finalidade avaliar a atividade enzimática da ADA e CD26 e sua relação com o câncer cervical humano.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade de hidrólise das enzimas adenosina deaminase e dipeptidil peptidase IV (CD26), 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 soro fetal bovino 10%, a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂. Suspensões de células foram semeadas em placas de 24 wells e após atingirem confluência foram utilizadas para determinar as atividades enzimáticas da ADA e CD26/DPPIV.

Atividade enzimática da adenosina deaminase

A determinação da atividade foi realizada em um meio contendo Na₂HPO₄ 0,2M e Na₂H₂PO₄ 0,2M, pH 7,4, em um volume final de 200 µl. A reação foi iniciada pela adição da adenosina (2,5mM concentração final) e foi interrompida pela adição de uma solução A (fenol/nitroprussiato) seguido da adição de uma solução B (NaClO/NaOH), sendo a amônia liberada medida colorimetricamente. A atividade enzimática foi expressa em nmol NH₃ liberado/min/mg de proteína.

Atividade enzimática da CD26 (Dipeptidil Peptidase IV - DPPIV)

A atividade enzimática da CD26 em células aderentes foi realizada em um meio contendo tris/HCl 0,1M pH 7,4, num volume final de 200 µl. A reação foi iniciada pela adição do substrato glicina-prolina-p-nitroanilida na concentração de 2,5mM. A reação foi paralisada pela adição de acetato de sódio 1M, pH 4,4. O controle negativo da reação foi preparado pela adição de tampão acetato de sódio antes da adição do substrato. A quantidade de p-nitroanilina formada foi medida colorimetricamente e correlacionada com uma curva padrão.

A atividade também foi avaliada nos sobrenadante das células, onde células em confluência em frascos de cultura de 25cm² foram lavadas com PBS para remover o meio de cultura com soro, e em seguida foram adicionados 2 mL de meio de cultura sem soro e sem vermelho de fenol e então foram mantidas na incubadora por 1h. Após, retirou-se o sobrenadante que foi utilizado para a realização do ensaio enzimático conforme descrito anteriormente.

Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Comassie Blue, conforme descrito por Bradford.

Análise Estatística

Os dados para CD26 foram analisados por análise da variância de uma via (ANOVA) seguido de teste Tukey utilizando o programa Graph Pad Prism 5 e os dados da ADA foram analisados por teste T de Student. Valores de p < 0.05 foram considerados significativos.

Resultados

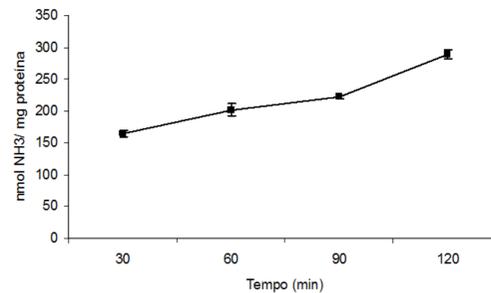


Fig. 1. Padrão de hidrólise da adenosina pela ecto-ADA em função do tempo, em culturas de células de câncer cervical SiHa. Os valores são representativos de dois diferentes experimentos (média ± desvio padrão).

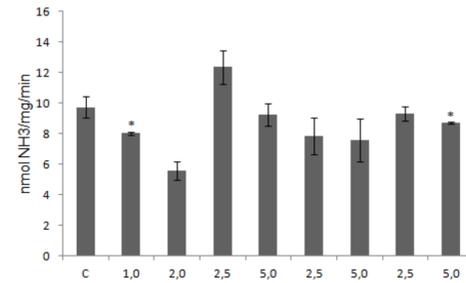


Fig. 2. Dependência a cátions divalentes na hidrólise da adenosina. A hidrólise da adenosina em célula de câncer cervical (SiHa) foi analisada na ausência de cátions (C), na presença de Ca²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺ nas concentrações de 2,5 e 5,0mM. EDTA (1,0 e 2,0mM) foi utilizado como agente quelante. Os resultados são representativos de dois diferentes experimentos (média ± desvio padrão). *Indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,005).

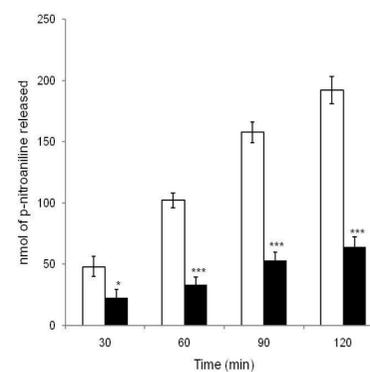


Fig. 3. Padrão de hidrólise da gli-pro-p-nitroanilida pela DPPIV/CD26 em função do tempo, em culturas de células de câncer cervical SiHa. A hidrólise foi determinada na presença apenas do substrato (barra vazia) e na presença do substrato com o inibidor específico da enzima - Sitagliptina (barra cheia). Os valores são representativos de três diferentes experimentos (média desvio ± padrão). *Indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,005), e *** para valores de p< 0,001.

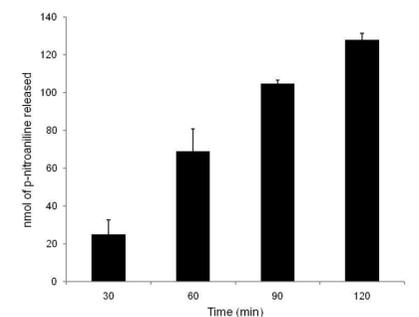


Fig. 4. Curva de tempo da atividade enzimática específica da DPPIV/CD26 (inibida pela sitagliptina) em células aderentes (0,043 mg de proteína). Resultados representativos de três experimentos (média desvio ± padrão).

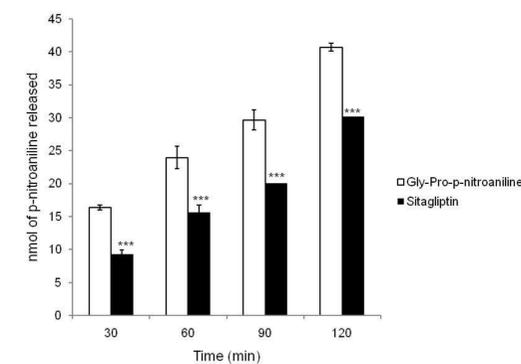


Fig. 5. Padrão de hidrólise da gli-pro-p-nitroanilida pela DPPIV/CD26 em função do tempo, no sobrenadante de culturas de células de câncer cervical SiHa. A hidrólise foi determinada na presença apenas do substrato (barra vazia) e na presença do substrato com o inibidor específico da enzima - Sitagliptina (barra cheia). Os valores são representativos de três diferentes experimentos (média desvio ± padrão). ***Indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,001).

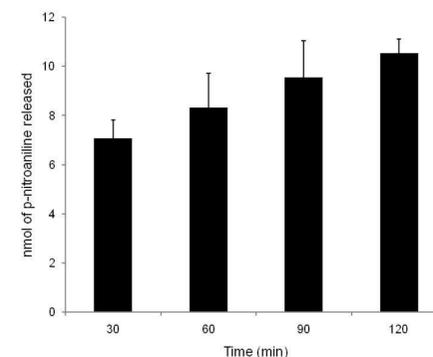


Fig. 6. Curva de tempo da atividade enzimática específica da DPPIV/CD26 (inibida pela sitagliptina) no sobrenadante das células (0,002 mg de proteína). Resultados são representativos de três experimentos (média desvio ± padrão).

Considerações Finais

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que a atividade da ecto-ADA foi linear até 120 min. Além disso, a análise para dependência de cátions divalentes mostrou que a atividade desta enzima foi inibida significativamente por Zn²⁺, na concentração de 5,0mM.

Para a DPPIV/CD26, observou-se que em células aderentes o padrão de hidrólise da gli-pro-p-nitroanilida foi linear até 120 min, e foi acompanhada pela inibição na atividade de hidrólise quando na presença de seu inibidor específico, sitagliptina, demonstrando que esta atividade é provavelmente realizada pela DPPIV, e não por outras enzimas que hidrolisam dipeptídeos. Além disso, as células exibiram uma atividade enzimática relativamente diminuída (19-27 nmols/min/mg proteína) quando comparada com melanócitos (180-220nmol/min/mg proteína). No sobrenadante, a atividade também se mostrou diminuída (44-115), porém esta atividade não foi linear durante os 120 min.

A avaliação do sobrenadante de células de câncer cervical mostrou que em uma hora de incubação, já ocorreu liberação significativa de sCD26. A forma solúvel da enzima parece ser um promissor biomarcador que poderá ser investigado em secreções vaginais de pacientes com esta patologia.

Considerando os resultados obtidos sobre o perfil enzimático da ADA e CD26, (enzimas envolvidas no metabolismo dos nucleotídeos da adenina) em células de câncer cervical, espera-se que o estudo destas proteínas auxilie na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do carcinoma cervical, possibilitando ainda a padronização de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para o carcinoma cervical humano.