

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DAS E-NTPDASES E ECTO-5 -NUCLEOTIDASE EM LINHAGENS DE MEDULOBLASTOMA HUMANO

¹CLARIMUNDO, V.; ¹CAPPELLARI, A.R.; ¹ROCKENBACH, L.; ¹DIETRICH, F.; ¹BRAGANHOL, E.; ²ABUJAMRA, A.L., ²ROESLER, R., ²SCHWARTMANN, G.; ²BRUNETTO, A; ¹BATTASTINI, A.M.O.

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS - Porto Alegre, RS, Brasil

²Lab. Pesquisa em Cancer, HCPA - Porto Alegre, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

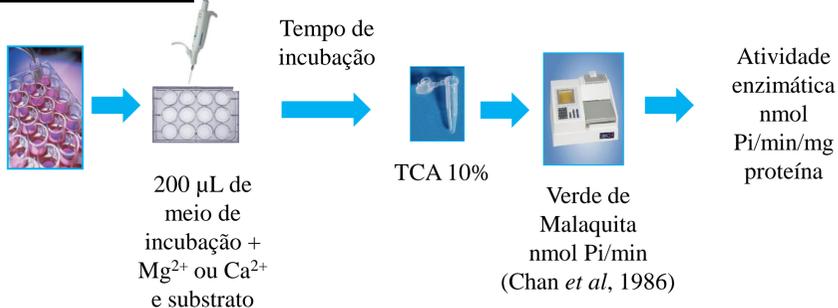
Meduloblastoma (MB) é um tumor primário de origem neuroepitelial embrionária que ocorre no cerebelo e na fossa posterior [Gilbertson & Ellison, 2008]. É classificado como tumor de grau IV, sendo este o maior grau de malignidade segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta neoplasia acomete preferencialmente crianças, principalmente do sexo masculino, com média de 9 anos de idade [Koeller & Rushing, 2003].

O ATP extracelular é considerado uma importante molécula de sinalização envolvida em diversos processos biológicos, inclusive no controle da neurotransmissão e da proliferação/morte celular e com o desenvolvimento e a progressão tumoral [Burnstock, 2006]. Foi demonstrado que o ATP e a adenosina extracelular promovem a proliferação celular em linhagens de glioma humano [Morrone et al, 2003]. Além disso, em nosso laboratório, foi mostrado que alterações na atividade das enzimas do sistema purinérgico (ecto-nucleotidases) estão envolvidas na biologia de células de gliomas e tumores de bexiga [Wink et al, 2003; Stella et al, 2009, Braganhol et al, 2009]. Considerando esses dados, o objetivo deste trabalho é avaliar a secreção basal de nucleotídeos e nucleosídeos além da atividade e a expressão das ecto-nucleotidases em diferentes linhagens de meduloblastoma humano.

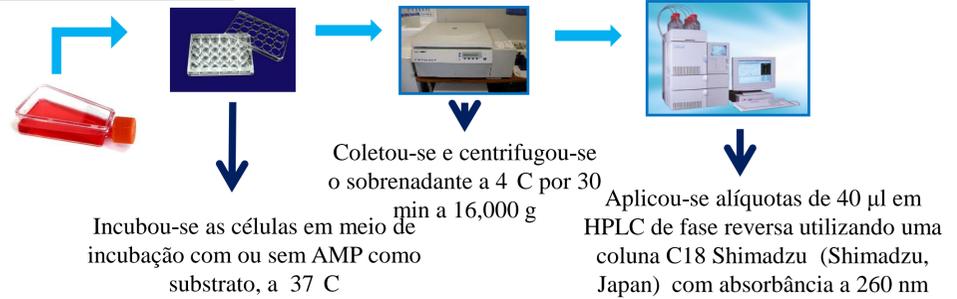
MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular: As linhagens celulares de meduloblastoma humano Daoy, ONS76 e D283 foram cultivadas em meio de cultivo (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%). As mesmas foram mantidas em temperatura média de 37 C, umidade relativa mínima de 95% e atmosfera de 5% CO₂.

Ensaio enzimático:



Análise por HPLC



Ensaio de RT-PCR: Inicialmente, o RNA total foi isolado das linhagens celulares com o reagente Trizol LS (Invitrogen). O cDNA das amostras juntamente com os respectivos primers para as NTPDases e ecto-5'-NT foram utilizados para a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).

RESULTADOS

Análise da secreção basal de nucleotídeos pelas linhagens de MB humano

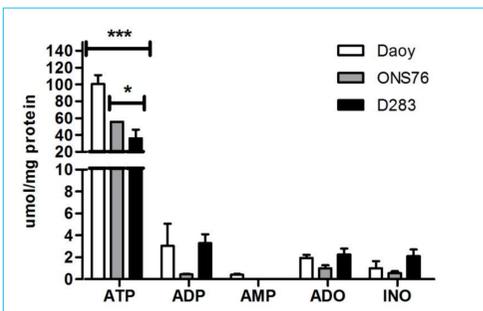


Fig. 1 → As células de MB foram incubadas por 90 min em meio de incubação adequado e as concentrações de ATP, ADP, AMP, ADO (adenosina) e NO (inosina) foram medidas por HPLC. Os dados representam médias de três experimentos independentes realizados em triplicata DP. Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. (***) p <0.001 e (*) p <0,05 foram usados para indicar significância estatística.

Avaliação da atividade ATPásica, ADPásica e AMPásica nas linhagens de MB humano

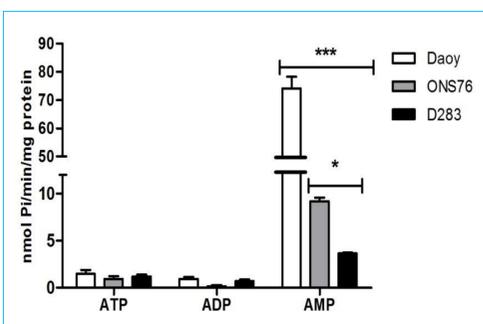


Fig. 2 → As células foram incubadas com ATP e ADP 1mM por 30 minutos, bem como com AMP 2mM por 10 minutos. Os valores representam a média DP de 3 experimentos independentes. (***) p <0.001 diferença estatística entre Daoy, ONS76 e D283; (*) p <0,05 diferença estatística entre ONS76 e D283, conforme determinado por ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Bonferroni.

Metabolismo do AMP extracelular pelas linhagens celulares de MB

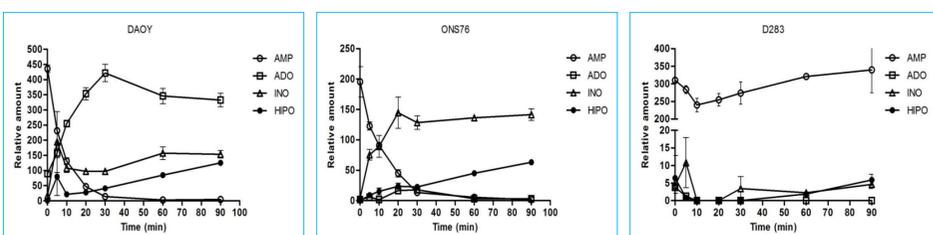


Fig. 3 → As linhagens celulares de MB Daoy, ONS76 e D283 foram cultivadas em placas de 24 poços e foram incubadas com 100 µM de AMP em 250 µL de meio de incubação. Uma alíquota de sobrenadante foi coletada nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 60 e 90 min e a presença de AMP, ADO, INO e HIPO (hipoxantina) foi determinada por separação por HPLC. Os dados são a média dos valores DP a partir de dois experimentos em triplicata.

Análise da expressão das ectonucleotidases em 3 linhagens celulares de MB

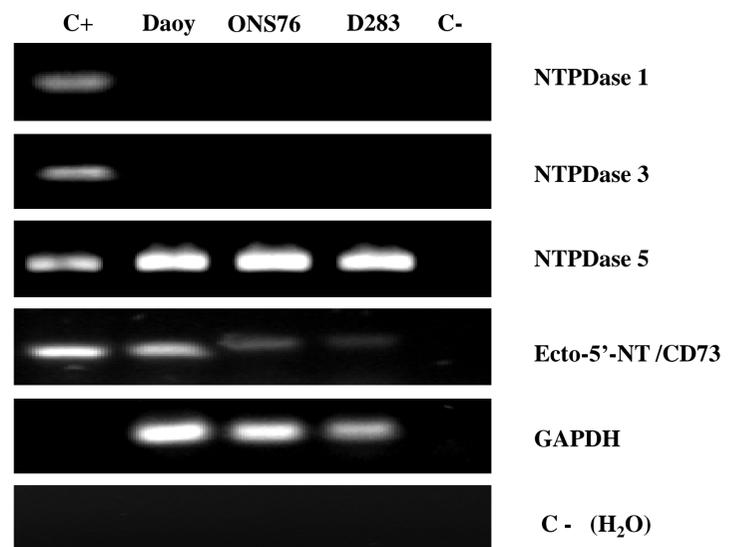


Fig. 4 → Para o gene GAPDH foi realizado como controle de reação para o cDNA das amostras. Como controle positivo dos primers foram utilizados plasmídeos contendo as sequências das NTPDases para as enzimas NTPDases 1 e 3 e ecto-5' NT/CD73. Para a NTPDase5 foi utilizado como controle o cDNA da linhagem celular de tumor de bexiga T24. Os controles negativos foram realizados pela substituição do cDNA de amostras por água destilada estéril, em cada reação de PCR.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados evidenciam que todas as linhagens celulares de meduloblastoma humano estudadas secretam principalmente ATP para meio extracelular apresentando uma baixa hidrólise do ATP e do ADP. As linhagens DAOY e ONS76 apresentaram uma maior hidrólise de AMP em relação a linhagem D283. Além disso, através dos dados obtidos em análise por HPLC salienta-se que estas duas linhagens, ao hidrolisarem AMP, acumulam adenosina e inosina, respectivamente. Dessa forma, pode-se inferir que a linhagem Daoy e ONS76 expressam a ecto-5'-NT/CD73 que é capaz de hidrolisar AMP a adenosina, sugerimos que a produção de inosina pela linhagem ONS76 deve-se à presença da enzima adenosina deaminase. É importante evidenciar que a D283 (um representante da linhagem de tumor metastático) tem uma baixa expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73, sugerindo uma importância para esta enzima na formação de metástases em meduloblastomas. Por fim, sugerimos que a acumulação de ATP e a produção de adenosina e inosina poderia favorecer a progressão meduloblastoma.