ANÁLISE DA LEUCUROGINA, UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, NO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO, SKMEL 05

NICÉIA C. BETIM[1], DÉBORA A. HIGUCHI[2].

[1] Graduanda em Licenciatura química, Bolsista CNPQ, IFSP, Campus Suzano, niceiabetim@msn.com
[2] Professora Doutora, grande área: Química, subárea: Bioquímica do IFSP-Suzano, da.higuchi@ifsp.edu.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.00.00-2 Bioquímica

Apresentado no 9° Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP
11 a 13 de dezembro de 2018 - Boituva-SP, Brasil

RESUMO: O câncer é uma célula anormal que cresce e se prolifera fora de controle dando origem a um tumor, sendo uma célula anormal, cabe a apoptose, tipo de processo de morte celular, eliminar estas células e erradicar este processo. O estudo de substâncias que inibem o câncer está diretamente relacionado a apoptose, que é um mecanismo do qual o câncer depende de sua falha para a proliferação. As desintegrinas são peptídeos que inibem a adesão celular e o desenvolvimento de metástases, promovendo a apoptose e podendo ser eficaz contra o câncer. A Leucurogina é a desintegrina em estudo, contudo, ao analisar sua ação na inibição de processos celulares como adesão, migração e proliferação de melanoma humano é possível caracterizar sua ação na célula de melanoma humano SKMEL 05.

PALAVRAS-CHAVE: câncer; apoptose; desintegrina; Leucurogina.

ANALYSIS OF LEUCUROGINE, A RECOMBINANT PROTEIN, IN THE PROCESS OF CELL DEATH IN HUMAN MELANOMA LINES, SKMEL 05

ABSTRACT: Cancer is an abnormal cell that grows and proliferates to control giving rise to a tumor, being an abnormal cell, it fits a cell-killing cell and eradicating this process. The study of substances that inhibit cancer is directly related to apopitosis, which is a mechanism from which cancer depends on its failure to proliferate. Disintegrins are peptides that inhibit cell adhesion and the development of metastases, promoting apoptosis and being effective against cancer. Leucurogine is the disintegrin under study, however, when analyzing its action in the inhibition of cellular processes like adhesion, migration and proliferation of human melanoma it is possible to characterize its action in the human melanoma cell SKMEL 05.

KEYWORDS: cancer; apoptosis; disintegrin; Leucurogine.

INTRODUÇÃO

Apoptose é a morte celular de forma programada e controlada. O erro no controle da apoptose, quando insuficiente, afeta o mecanismo de defesa onde células lesadas ou potencialmente perigosas são eliminadas para o bem do organismo, impedindo a produção de células que carregam mutações, podendo levar ao desenvolvimento de câncer (ALBERTS; et al, 2010). Na apoptose, as células se encolhem perdendo a aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas, posteriormente são fagocitados por um macrófago (GRIVICICH; et al, 2007). Conhecendo este processo, é possível afirmar que o crescimento do câncer depende de um controle deficiente da morte e da diferenciação celular, sendo o câncer uma célula anormal que cresce e se prolifera fora de controle (COOPER; HAUSMAN,2007), classificado conforme o tipo de célula da qual se origina (THULER ,2012).

As proteínas integrinas tem como papel a adesão celular transmembrana atuando como receptor de Matriz, essa ligação pode enviar mensagem para o interior e exterior da célula, quando o contato é perdido, ocorre apoptose (FERRAZ, FERNANDEZ, 2014). Há uma dependência de ancoramento, para o crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Mutações que rompem ou dominam esta dependência possuem comportamento invasivo, como em células cancerosas (ALBERTS; et al, 2010).

A ligação entre a célula e a matriz extracelular promovida pela integrina pode ser interrompida pela desintegrina, peptídeos derivados de venenos de serpentes que se ligam a integrina impedindo de forma competitiva em um domínio específico. Baseado nisso, desintegrinas são inibidores de adesão celular e desenvolvimento de metástases, podendo ter eficácia contra o câncer (LUSA, 2008). Nesta pesquisa estuda-se a ação da Leucurogina, desintegrina recombinante produzida a partir do cDNA da serpente *Bothrops leucurus* na morte e proliferação de melanoma humano, linhagem SKMEL 05.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo celular

As células de melanoma humano SKMEL 05, foram cedidas gentilmente pela professora Doutora Cláudia Bincoletto Trindade, do Departamento de Farmacologia da UNIFESP. Essas células foram cultivadas em meio DMEM, contendo 10 % (v/v) de SFB e 100 U por mL de penicilina / estreptomicina, 2 mM de glutamina. Todas as células foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2, a 37 ºC, no escuro.

Análise de viabilidade celular com o corante azul de tripano

As células foram incubadas com salina (controle negativo), 20 uM de cisplatina, droga utilizada como controle positivo e 20 uM de leucurogina. Após 1h das células agitadas a 37ºC foi realizada a análise da viabilidade celular utilizando o corante Azul de tripan.na proporção 1:1, este corante colore em azul seletivamente as células mortas (ROSETE, 2003).

Proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado para as linhagens utilizando o kit da empresa Roche Molecular Biochemicals, um imunoensaio colorimétrico para a quantificação da proliferação celular baseado em analisar BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporado durante a síntese do DNA. Em placas de cultivo celular de 96 cavidades as células foram plaqueadas na densidade de 20. 10^3 células/cavidade e incubadas 37 °C durante o período de 24h e a droga a ser analisada

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da viabilidade celular

As células após 1 h de incubação com as drogas foram contadas em câmara de Neubawer, verificando a viabilidade utilizando o corante azul de tripan. Pode-se observar a morte de 40 % das células do controle negativo, enquanto que as células incubadas com a leucurogina apresentaram uma morte de aproximadamente 60%. O controle positivo, cisplatina, na mesma concentração apresentou a morte de cerca de 75% das células aderidas.

Proliferação celular

Continuando o estudo para justificar a redução tumoral in vivo apresentada nos trabalhos de Higuchi 2011 e Almeida 2010. A análise de proliferação celular foi realizada para as linhagens de melanoma, considerando que o crescimento tumoral está diretamente relacionado à proliferação rápida destas células malignas.

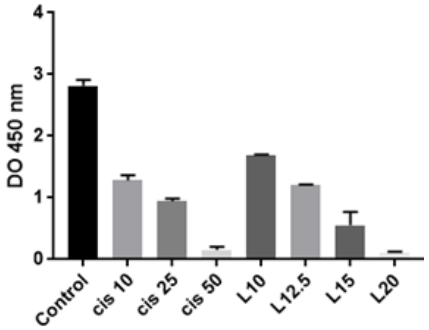

FIGURA 1 -Análise da proliferação celular, 24h, para a linhagem tumoral SKMEL 05 em placas de cultivo celular contendo 96 cavidades as células foram plaqueadas na densidade de $20x10^3$ células por

cavidade em um volume final de 100 uL e incubadas por um período de 24h, na ausência ou presença de Leucurogina (L) nas concentrações 10 µM a 20 µM ou cisplatina (cis) 10 µM a 50 µM.

O ensaio imunocolorimétrico tem como objetivo a detecção da incorporação do BrdU no DNA das células que estão se proliferando. Pode ser observado na figura 1 que a proliferação da SKMEL 05 foi inibida de forma dose-dependente tanto para a cisplatina, como também para a leucurogina. E que na dose de aproximadatente 12,5 uM a leucurogina foi capaz de reduzir a proliferação pela metade, quando comparada ao controle, portanto apresentado um IC_{50} de 12,5 uM.

CONCLUSÕES

Na literatura, há grandes evidências de que as desintegrinas de venenos de serpententes são recursos eficazes para a terapia do câncer. Conforme as condições desta pesquisa, onde a desintegrina foi extraída da serpente *Bothrops leucurus* e ensaiado na linhagem de câncer SKMEL 05, tipo de melanoma humano, os resultados também seguiram a mesma tendência. Quanto ao desenvolvimento e progressão das células malignas, nos ensaios de adesão, proliferação e viabilidade celular é possível observar a inibição do crescimento tumoral se comparado a cisplatina, droga com eficácia comprovada no combate ao câncer conforme o INCA (Instituto Nacional do Câncer).

REFERÊNCIA

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. Biologia molecular da célula. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ALMEIDA, M.C. Caracterização das propriedades anti-angiogênica e antimetastática da leucurogina, uma proteína recombinante produzida a partir de cDNA obtido do veneno da serpente Bothrops leucurus. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Mogi das Cruzes, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. A célula: uma abordagem molecular. Boston University 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

FERRAZ, F.B; FERNANDEZ, J.H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos, v. 9, n. 2, p. 25-34, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HIGUCHI D.A.; ALMEIDA M.C.; BARROS C.C.; SANCHEZ E.F.; PESQUERO P.R.; LANG E.A.; SAMAAN M.; ARAUJO R.C.; PESQUERO J.B.; PESQUERO J.L. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from Bothrops leucurus (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. PubMed [Online], v.58, n.1, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641921>. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Quimioterapia. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 06 jul. 2018.

LUSA, A.L.G. Estudos bioquímicos e biofísicos de metaloproteinases/desintegrinas de venenos de serpentes. 2008. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. doi:10.11606/D.76.2008.tde-13052010-144612.

ROCHE DIAGNOSTICS. Cell proliferation kit I (MTT): Colorimetric assay (MTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability. Mannheim, 2016. 4 p. (Version 19).

ROSETE, M.T.T.C. Vias de sinalização intracelular envolvidas na expressão da isoforma indutível da sintase do No: efeito do lipopolissacarídeo, citocinas e alergénios em células dentríticas da pele. 2003. 180 p. Tese (Doutorado em Farmácia) - Fac. de Farmácia da Univ. de Coimbra. Coimbra.

THULER, L.C.S. Abc do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2 ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2012. 129 p.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology, 7ed. page 399-. 7 ed. New York: Cambridge University Press, 2010. 399 p.