

## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNCIONALIDADE DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EM CÉLULAS LEUCÊMICAS**

Sarah Vieira Cordeiro<sup>1</sup>; Antônio Carlos Ribeiro Filho<sup>2</sup>; Edgar Julian Paredes-Gamero<sup>3</sup>

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: sarahcordeiro\_@hotmail.com
2. Doutorando em Biotecnologia; e-mail: antonio\_biomed@hotmail.com
3. Professor da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; e-mail: paredes.gamero@gmail.com

Área de conhecimento: **Biologia Molecular; Celular aplicada à saúde.**

**Palavras-chave:** Leucemia; células-tronco; receptor purinérgicos; sinalização.

### **INTRODUÇÃO**

Os cânceres de origem hematológica ocorrem por alteração dos mecanismos de proliferação e diferenciação das células; entre eles encontram-se as leucemias. Este grupo de doenças, embora hoje em dia haja medicamentos, carecem de uma efetividade mais certa. Parte da ineficiência dos tratamentos é que os quimioterápicos são principalmente dirigidos contra as células com alta taxa de proliferação. Contudo, foi mostrado que algumas leucemias possuem células com características de célula-tronco chamadas de células-tronco leucêmicas (CTL). Esta pequena população de células leucêmicas apresenta-se, semelhantes às células-tronco hematopoéticas possuindo características como: imunofenotipagem primitiva, autorrenovação ilimitada, baixa taxa de proliferação, encontrando-se a maior parte em quiescência, sendo resistente a quimioterápicos convencionais. Nos últimos anos, nosso grupo mostrou a capacidade de diferenciação do ATP, que ativam os receptores P2 (ionotrópicos e metabotrópicos), principalmente na população de células-tronco hematopoéticas, em modelos in vitro e in vivo, e também mostramos este efeito de diferenciação nas CTL.

### **OBJETIVO**

Avaliar a expressão de receptores purinérgicos e as vias de sinalização ativadas pelos quando estimulados por ATP na população de células-tronco leucêmicas das linhagens celulares KG-1 e K562.

### **METODOLOGIA**

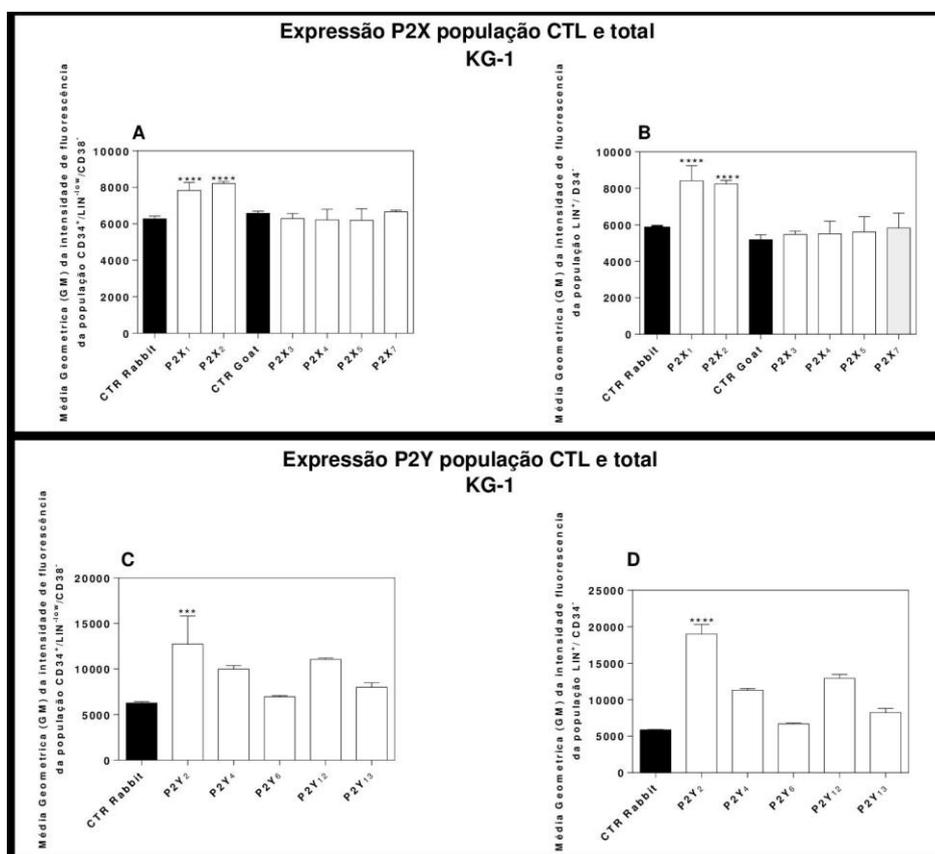
Realizou-se o cultivo celular das linhagens de leucemia mieloide aguda (KG-1) e mieloide crônica (K562). Para avaliar a modulação das células foram realizadas as seguintes marcações: CD34-APC, coquetel para marcação de linhagens maduras (Lin) todos conjugados com PE (CD38, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD14, CD19, CD20 e CD235a, CD11b), estimulada com concentrações de ATP e tempos distintos, os quais foram testados e determinados anteriormente (Ribeiro-Filho et al., manuscrito em preparação). Logo, as células foram marcadas com os anticorpos acima por 20 min e analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6; a expressão dos receptores P2 foi realizada de forma semelhante. E, para ativação das vias de sinalização em CTL, as células foram estimuladas com 1 mM de ATP e utilizaram-se os anticorpos contra as vias de sinalização ativadas por receptores acoplados à proteína G e de vias paralelas relacionadas com a diferenciação (fosfo-PLC, fosfo-PKC,

AMPC, fosfo-ERK, fosfo-AKTSer/thr). A seguir as leituras foram realizadas no citômetro de fluxo Accuri c6.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

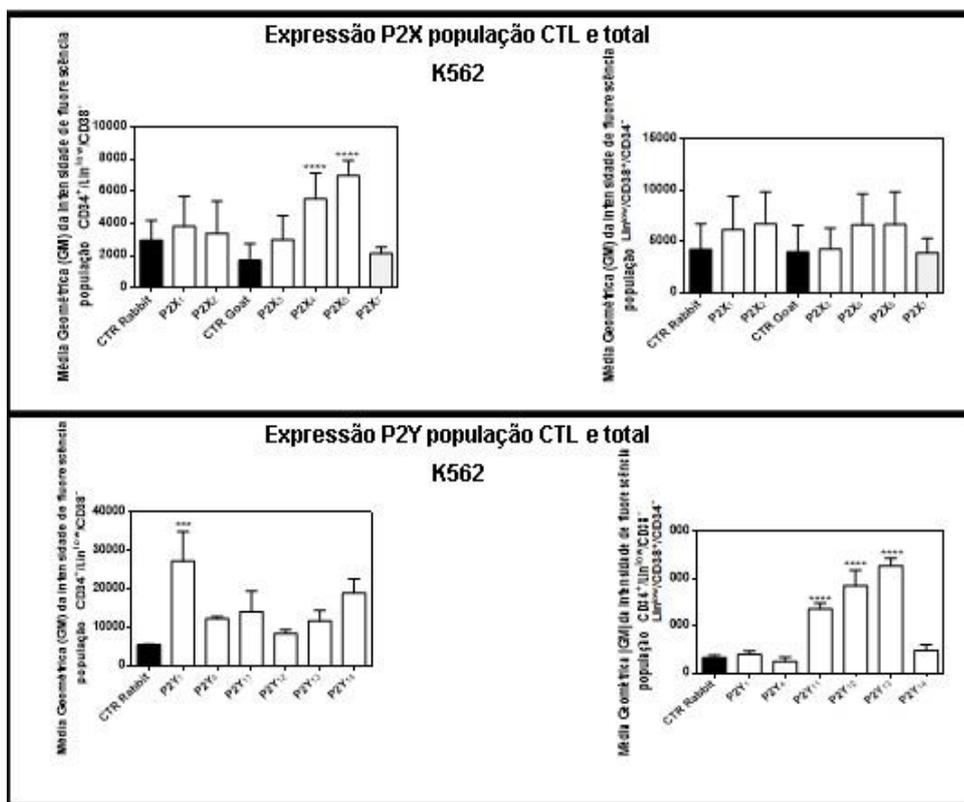
Quantificou-se a expressão dos receptores P2 por citometria de fluxo num modelo de leucemia mieloide aguda (KG-1), observando uma expressão significativa dos receptores P2X1, 2 e P2Y2, 12 (Figura 1). Segundo Clifford (2018), após uma análise de Northern Blot, observou-se níveis muito altos de mRNA do receptor P2X1 na fração total de leucócitos de humanos sangue e o mRNA do receptor P2X2 foi encontrado na superfície de linfócitos B. Já o P2Y2 é um receptor de ampla distribuição no organismo humano e murino (Burnstock e Knight, 2004).

**Figura 1:** Expressão dos receptores P2X e P2Y na linhagem KG-1.



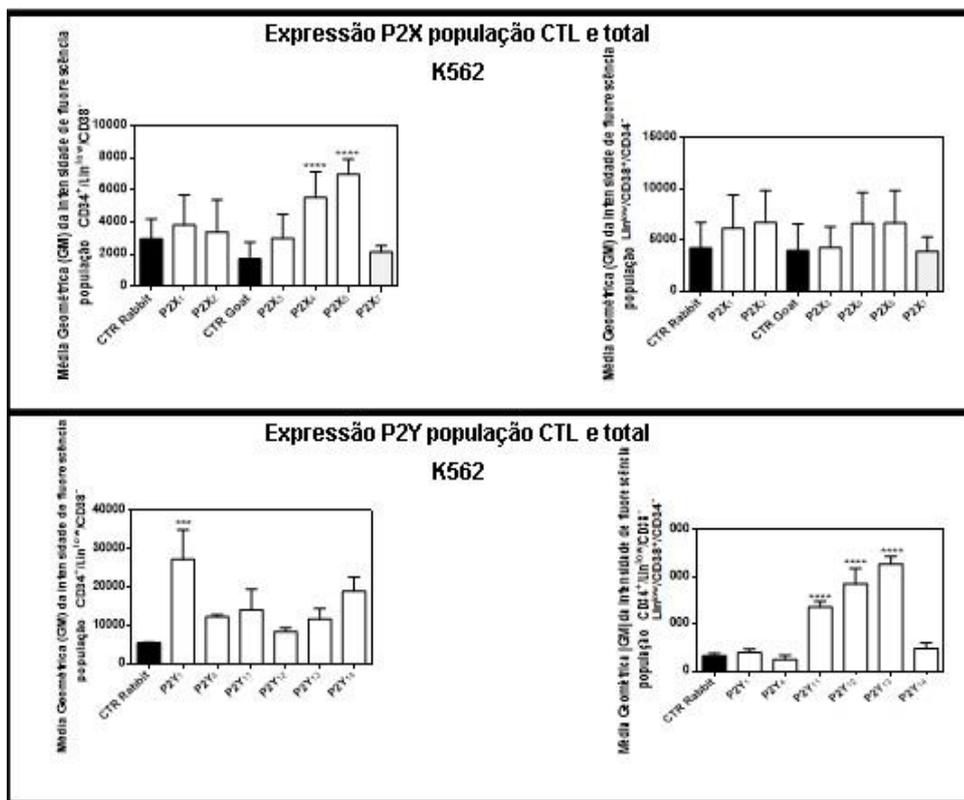
No modelo de leucemia mieloide crônica K562, por sua vez, verificou-se uma maior expressão dos receptores purinérgicos P2X4, 5 e P2Y1 nas CTL; enquanto que a subpopulação total expressa os receptores P2X2, 4 e 5 e P2Y11, 12 e 13 (Figura 2). Segundo Chong (2010), em resultados de PCR em tempo real e Western blot verificaram que os receptores P2X4 e P2X5 são superexpressos em leucemias e apresentam relação com a hematopoese. E, de acordo com Yoon (2006) pode-se dizer que o ATP extracelular está envolvido na proliferação e sobrevivência celular da leucemia mieloide humana pela expressão de receptores P2Y, sugerindo que o tratamento com nucleotídeos extracelulares possa ser uma via terapêutica para tal doença.

**Figura 2:** Expressão dos receptores P2X e P2Y na linhagem K562.



Foi observado que a via do Ca<sup>2+</sup> pode modular a diferenciação das células hematopoiéticas pelo uso de ATP e análogos (Paredes-Gamero et al., 2008). Além disso, observou-se que o aumento do Ca<sup>2+</sup> pela IL-3 e pelo GM-CSF ocorre por ativação da PLC $\beta$ 2 e que inibidores da sinalização do Ca<sup>2+</sup>, como o antagonista do receptor de IP<sub>3</sub>, da PKC e da CaMKII bloqueiam parcialmente a ativação da MEK1/2 (Paredes-Gamero et al., 2008). Posteriormente, determinaram-se os mecanismos de integração molecular entre a sinalização do Ca<sup>2+</sup> e da via da RAS/RAF/ERK1/2 em CTH humanas e murinas (Leon et al., 2011). Logo, avaliou-se a ativação as proteínas fosfo-PLC $\beta$ , fosfo-PKC, AMPc, fosfo-ERK, fosfo-AKT/Ser/thr nas subpopulações de CTL e total apenas da linhagem KG-1 e observamos que há uma considerável ativação das proteínas pAKT/Ser e pERK na fração CTL, e das proteínas pERK e pPKC na população total (Figura 3).

**Figura 3:** Proteínas de sinalização de diferenciação e proliferação ativadas com o uso de ATP extracelular em variados tempos na linhagem leucêmica KG-1.



## CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que os receptores purinérgicos são expressos nas CTL, e vias de sinalização são ativadas pelo ATP, que podem estar relacionadas com a capacidade de diferenciação.

## REFERÊNCIAS

Burnstock G, Knight GE. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240:31-304:31-304.

Chong, JH; Zheng, GG; Zhu, XF; Guo, Y; Wang, L; Ma, CH; Liu, SY; Xu, LL; Wu, KF. Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. *Send to Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1; 391(1):498-504. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.087. Epub 2009 Nov 15.