



INIBIÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR: IMPACTO NA PROLIFERAÇÃO E NA REDUÇÃO DO MTT EM CÉLULAS LEUCÊMICAS RESISTENTES E NÃO RESISTENTES A QUIMIOTERÁPICOS

Palavras-Chave: leucemia mielóide crônica, proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular, inibidor

Autores/as:

Keila Lívia Pereira Coelho – IB, UNICAMP

Beatriz Aires Lopes – IB, UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Carmen Veríssima Ferreira-Halder (orientadora) – IB, UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (CML) tem como marcador molecular o gene BCR-ABL, presente no cromossomo Philadelphia (Ph) decorrente da fusão de dois genes distintos, BCR e ABL. Tal gene codifica uma proteína tirosina quinase constitutivamente ativa, que estimula as vias de sinalização responsáveis pela proliferação celular e pela resistência das células CML à apoptose (Goldman & Melo, 2001; Houshmand *et. al.*, 2019). A resistência das células leucêmicas aos tratamentos tem ligação com a capacidade de reprogramação metabólica destas células, que depende de vários atores moleculares, como por exemplo, a proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP, *Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*), essencial no processo de oncogênese (Faria *et. al.*, 2017 e 2020; Souza *et. al.*, 2009). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto do inibidor da LMWPTP na sobrevivência das células K562 e das células Lucena-1, essas últimas, apresentam fenótipo resistente.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultura das células Lucena-1 e K562

O cultivo das células das linhagens Lucena-1 e K562 foi realizado em meio RPMI, contendo glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* - FBS). No caso da linhagem Lucena-1, a mesma foi mantida em

cultura em meio contendo 60 nM de Vincristina (VCR), a fim de manter o fenótipo de resistência da linhagem (Rumjanek *et al.*, 2001).

Os repiques foram feitos a cada 48 horas na densidade de 1×10^5 células/mL. As células foram incubadas em estufa com atmosfera umidificada, 5% de CO₂ e 37°C.

2.2. Tratamento das células com o inibidor da LMWPTP

As células (1×10^5 células/poço) K562 foram plaqueadas em placa de 24 poços (volume de trabalho = 1mL) e tratadas, por 24 e 48 horas, com quatro concentrações diferentes do inibidor da LMWPTP (LMWPTP inibitor 1 - Cayman Chemical - cód 22277): 0,5µM, 2,5µM, 5,0µM e 10µM. A solução estoque do inibidor (22,5 mM) foi preparada em dimetilsulfóxido, e para o tratamento das células foi diluído, no momento de uso, em meio de cultura. As células foram incubadas em atmosfera umidificada, 5% de CO₂ e 37°C. As células Lucena-1 foram tratadas como descrito para a linhagem K562, no entanto, houve uma etapa adicional que foi a retirada do meio contendo vincristina, por centrifugação (1500 rpm, durante 7 minutos).

2.3. Contagem das células

Após o tratamento, as células de cada poço foram ressuspensas e retirada uma alíquota de 10µL para contagem na câmara de Neubauer.

2.4. Ensaio de redução do MTT

Para realização do ensaio de redução do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), após o período de tratamento de 24h, foram removidos 800µL do meio de cultura e adicionados 800µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura livre de FBS) em cada poço. Após incubação por 3 h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foram adicionados 1000 µL de etanol para solubilização do formazan. A placa foi agitada por 10 min e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIOTEK) em $\lambda = 570$ nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT, em relação ao controle (células não tratadas com o inibidor) (Mosmann, 1983). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média de 2 experimentos independentes conduzidos em triplicata.

2.5. Análises estatísticas dos dados

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 8.0, utilizando o método ANOVA unidirecional. Os níveis de significância utilizados foram: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$; **** = $P \leq 0.0001$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Impacto do inibidor da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular na proliferação das células leucêmicas

As células K562 e Lucena-1 tiveram a proliferação diminuída após o tratamento com o inibidor da LMWPTP, como demonstrado pelo menor número de células viáveis (Figura 1). No caso das células Lucena-1 houve diminuição de 50% do número de células viáveis na concentração de 7,5 µM do inibidor (Figura 1), enquanto para as células K562 (Figura 1) foi 9 µM. Ambas as linhagens sofreram maior efeito do inibidor após 48h de tratamento. Os resultados observados são interessantes e corroboram os dados obtidos por nosso grupo, que revelaram que o silenciamento gênico da LMWPTP causou diminuição da proliferação destas células (Ferreira *et al.*, 2012). Em outras palavras, os dados obtidos no presente projeto, apontam que a modulação química da fosfatase por inibidor, também reflete na inibição da proliferação celular.

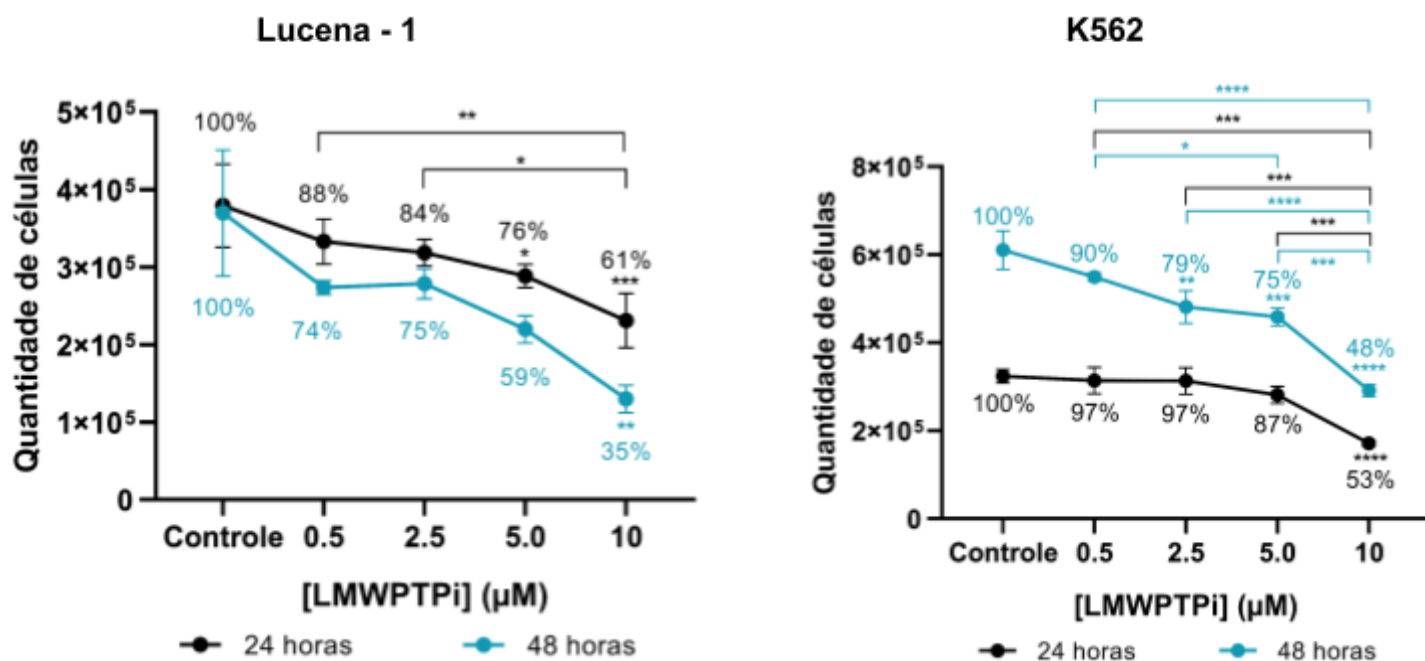


Figura 1. O inibidor da LMWPTP compromete a proliferação celular das células leucêmicas. As células foram plaqueadas a 1×10^5 células/mL na placa de 24 poços, tratadas com quatro concentrações diferentes do inibidor da LMWPTP (0,5µM, 2,5µM, 5,0 µM e 10µM) e incubadas por 24 (em preto) e 48 horas (em azul). Após o tempo de incubação as células foram contadas e os resultados foram analisados e organizados no gráfico. Os níveis de significância utilizados foram: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$; **** = $P \leq 0.0001$.

3.2. Inibidor da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular afeta diferentemente a eficiência de redução do corante MTT pelas células leucêmicas

Faria e colaboradores (2017) demonstraram que as células Lucena-1 apresentam predominância do efeito Warburg, em comparação às células K562, ou seja, mesmo em condições em que as células têm disponibilidade de oxigênio, o metabolismo glicolítico é favorecido (glicose é preferencialmente degradada a lactato). No mesmo artigo, também foi descrito em detalhes que a LMWPTP favorece o efeito Warburg e que ao ser silenciada, houve inibição da via glicolítica, ao mesmo tempo em que houve uma reativação da função mitocondrial. Portanto, no presente trabalho, decidimos averiguar se as linhagens K562 e Lucena-1 tratadas com o inibidor da LMWPTP teriam capacidade diferente na redução do MTT.

De forma interessante, observa-se na Figura 2 que as células Lucena-1 mantiveram a capacidade de redução do MTT em 96%, na maior concentração do inibidor, após 24h de tratamento. Se considerarmos que nesta mesma condição, o número de células viáveis decaiu para 61% (Figura 1), pode-se dizer que a inibição química da LMWPTP, desfavorece o efeito Warburg. Já para as células K562, após 24h de exposição, foram detectadas 53% das células viáveis (número de células), porcentagem próxima à observada na redução do MTT (Figura 2).

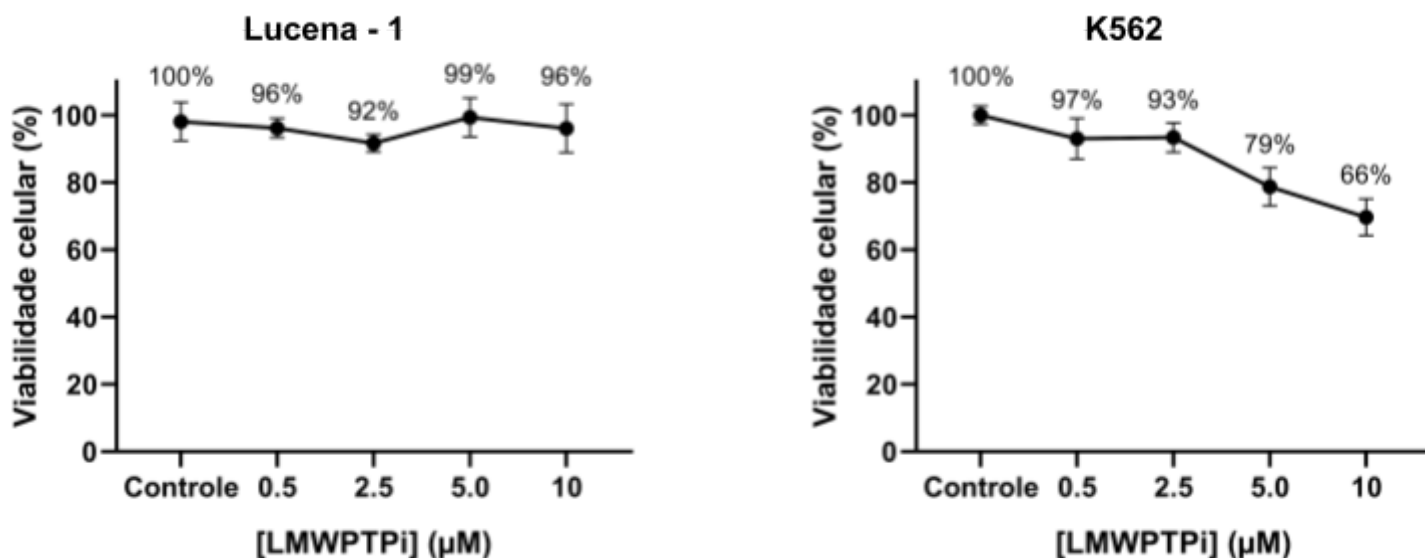


Figura 2. O inibidor da LMWPTP possui efeitos distintos na viabilidade das diferentes linhagens de células leucêmicas, desfavorecendo o efeito Warburg nas células Lucena-1. Após 48 horas de tratamento com o inibidor da LMWPTP em diferentes concentrações (0,5µM, 2,5µM, 5,0µM e 10µM), retirou-se o meio de cultura e foi adicionado meio contendo MTT 0,5mg/mL, as células foram novamente incubadas por 3 horas a 37°C, a solução de MTT foi removida e os cristais de Formazan foram solubilizados em etanol. A absorbância foi medida em 570 nm em um leitor de microplacas (Epoch Nanodrop, BioTek).

4. CONCLUSÕES

Os resultados apontam que o inibidor da LMWPTP apresenta potencial como anti-leucêmico ao diminuir a proliferação da linhagem K562 (responsiva a quimioterápicos) e da linhagem Lucena-1 (resistente a drogas). Ademais, observou-se que o inibidor desfavorece o efeito Warburg, nas células Lucena-1, uma vez que aumenta a eficiência da redução do MTT, nas maiores doses testadas. Efeito não observado nas células K562.

5. BIBLIOGRAFIA

FARIA A.V.S., CLERICI S.P., OLIVEIRA P.F.S., QUEIROZ K.C.S., PEPPELENBOSCH M.P., FERREIRA-HALDER C.V. **LMWPTP modulates the antioxidant response and autophagy process in human chronic myeloid leukemia cells.** *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020; 83-89, <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03690-1>.

FARIA A.V.S., TORNATORE T.F., MILANI R., QUEIROZ K.C.S., SAMPAIO I.H., FONSECA E.M.B., ROCHA-BRITO K.J.P., SANTOS T.O., SILVEIRA L.R., PEPPELENBOSCH M.P., FERREIRA-HALDER C.V. **Oncophosphosignaling favors a glycolytic phenotype in human drug resistant leukemia.** *J. Cell Biochem*. 2017; 118(11):3846–3854.

FERREIRA P.A., RUELA-DE-SOUSA R.R., QUEIROZ K.C., SOUZA A.C., MILANI R., PILLI R.A., PEPPELENBOSCH M.P., DEN HERTOOG J., FERREIRA C.V. **Knocking down low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) reverts chemoresistance through inactivation of src and Bcr-Abl proteins.** 2012; PLoS ONE 7(9):e44312.

GOLDMAN J.M., MELO J.V. **Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.** *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1084-6. doi: 10.1056/NEJM200104053441409. PMID: 11287980.

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.

HOUSHMAND M., SIMONETTI G., CIRCOSTA P., GAIDANO V., CIGNETTI A., MARTINELLI G., SAGLIO G., GALE R.P. **Chronic myeloid leukemia stem cells.** *Leukemia.* 2019 Jul; 33(7):1543-1556. doi: 10.1038/s41375-019-0490-0. Epub 2019 May 24. PMID: 31127148; PMCID: PMC6755964.

RUMJANEK, V. M. *et al.* **Multidrug resistance in tumor cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2001; v. 73, n. 1, p. 57-69.

SOUZA A.C., AZOUBEL S., QUEIROZ K.C., PEPPELENBOSCH M.P., FERREIRA C.V. **From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase,** *Cell Mol Life Sci.* 2009 Apr; 66(7):1140-53. doi: 10.1007/s00018-008-8501-8.