

RELAÇÃO MOLECULAR DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR P2X₇ COM OS POROS FORMADOS PELO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO GOMESINA

Wynne Barbosa de Sousa Silva¹; Antonio Carlos Ribeiro Filho²; Edgar Julian Paredes Gamero³

Estudante do Curso de Farmácia; wynnebarbosass@gmail.com¹

Estudante do Curso de Doutorado em Biotecnologia; antonio_biomed@hotmail.com²

Professor e Pesquisador da Universidade de Mogi das Cruzes;

paredes.gamero@gmail.com³

Área do Conhecimento: Biologia Molecular.

Palavras-chave: gomesina, OxATP, citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

O receptor P2X₇ é um receptor canal iônico aberto por ligante (ATP), com características farmacológicas peculiares e amplamente distribuindo em vários tecidos, em especial em células neuronais e em células hematopoéticas. A ativação do receptor P2X₇ com altas concentrações de ATP (>1 mM) causam a abertura de um poro de grande condutância que permite a passagem de moléculas até 1 kDa (North, 2002). A abertura deste poro pela alta concentração de ATP em tempos prolongados de ativação causa, entre vários efeitos, a morte celular com características de necrose (Surprenant et al., 1996; Coutinho-Silva & Persechini, 1997; Paredes-Gamero et al., 2004; Paredes-Gamero et al., 2007).

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) estão presentes em diversos organismos como anfíbios, mamífero, peixes, aracnídeos e plantas, onde atuam na primeira linha de defesa destes seres (Harris et al., 2009), desta forma possuem a capacidade de eliminar um grande espectro de microrganismos como bactérias, fungos e alguns vírus (Gallo et al., 2002). De modo geral, sabe-se que o alvo do mecanismo de ação dos PAMs é a bicamada lipídica da membrana celular, onde podem levar ao aumento do conteúdo líquido interno dos lipossomos (Epanand & Vogel, 1999).

A gomesina é um dos PAMs com maior potencial devido ao amplo espectro de ação, possuindo atividade contra diversas cepas de bactérias e fungos, indicando seu possível uso terapêutico. Esta é extraída dos hemócitos da tarântula da espécie gomesiana, *Ancathoscurria gomesiana* e possui característica anfipática, além de conformação em grampo-β, que gera maior resistência a proteases presentes no plasma humano.

OBJETIVOS

Estabelecer a relação do receptor P2X₇, que forma um poro de alta condutância, com o poro formado pela gomesina na linhagem murina CHO.

METODOLOGIA

Foi utilizada a linhagem celular de Ovário de Hamster Chinês (CHO) cultivada em meio DMEN suplementado com 20% de SFB e 1% de sulfato de estreptomicina e penicilina e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. A contagem das células foi realizada utilizando a coloração com Trypan Blue, uma alíquota de 10 µL é depositada na câmara de Neubauer sob uma lamínula e levada ao microscópio óptico.

As células de linhagem CHO foram incubadas em diferentes concentrações de Gomesina para determinação do EC₅₀ por ensaio de MTT. Para a dosagem da viabilidade também foi utilizada 1 µM de Calceína por 40 min e em seguida tratadas com 10 e 20 µM de Gomesina. A fluorescência da calceína foi quantificada em um Flex Station 3 microplate reader. A morte celular causada pela gomesina foi confirmada usando-se Anexina-V e Iodeto de Propídeo após o tratamento das células de linhagem CHO com Gomesina 10 e 20 µM por 2 h. A morte celular dependente de Gomesina foi inibida pelo OxATP em células de linhagem CHO previamente incubadas com 300 µM de OxATP por 3 h e depois estimuladas pela Gomesina por 24 h. Todos os

experimentos foram realizados em duplicata. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism® 6.05 (GraphPad Software, Inc., California, CA, USA) e o software FlowJo X 10.0.7 foi utilizado para a construção dos gráficos de citometria de fluxo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o efeito citotóxico da Gomesina na linhagem celular CHO, as células foram estimuladas com Gomesina em concentrações de 10, 20 e 30 μM e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. O EC_{50} foi determinado em 20 μM , os resultados deste experimento estão representados na Figura 1, painel A. Em seguida, para determinar verificar a morte celular de forma temporal as células CHO foram incubadas com 1 μM de calceína por 40 min e então tratadas com 10 e 20 μM de Gomesina, a fluorescência da calceína foi quantificada por um Flex Station 3 microplate reader e os resultados estão representados na Figura 1B. A morte celular por permeabilização de membrana causada pela Gomesina foi confirmada pelo ensaio de Annexina-V e Iodeto de Propídio após o tratamento das mesmas com 10 e 20 μM de Gomesina por 2 h (Figura 2). A morte celular nas células CHO promovida pela Gomesina foi inibida pelo antagonista irreversível do receptor P2X_7 , o OxATP, as células CHO foram previamente incubadas com 300 μM de OxATP por 3 h e depois estimulada pela Gomesina por 24 h e os resultados estão representados na Figura 3.

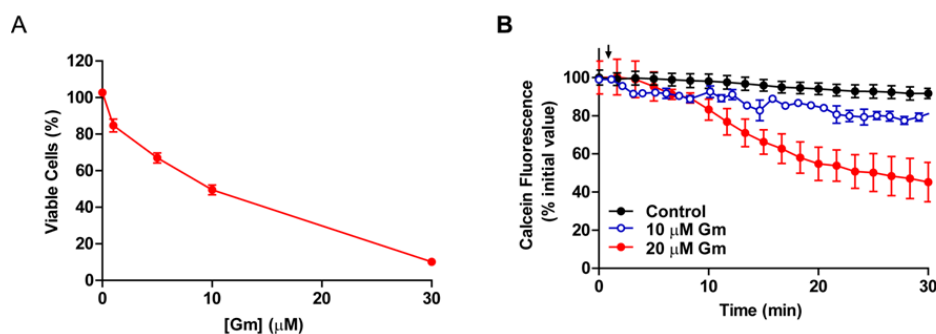


Figure 1 – Efeito citotóxico da Gomesina na linhagem CHO. (A) Redução concentração dependente da viabilidade celular pela exposição a gomesina em células CHO após tratamento por 24 h (ensaio MTT). (B) As células foram incubadas com 1 μM de calceína por 40 min e então tratadas com Gomesina. A fluorescência da calceína foi quantificada em um Flex Station 3 microplate reader.

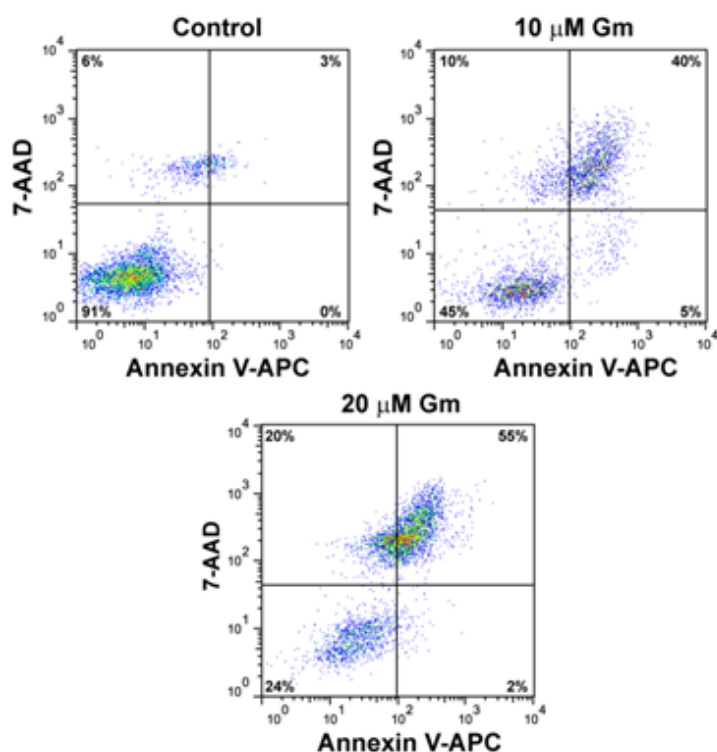


Figure 2 – Gomesina promove morte celular por permeabilização de membrana na linhagem CHO. A atividade citotóxica da Gomesina foi avaliada pelo corante Annexin V/7-AAD e analisado após o tratamento das células com 10 e 20 μM de Gomesina por 2 h.

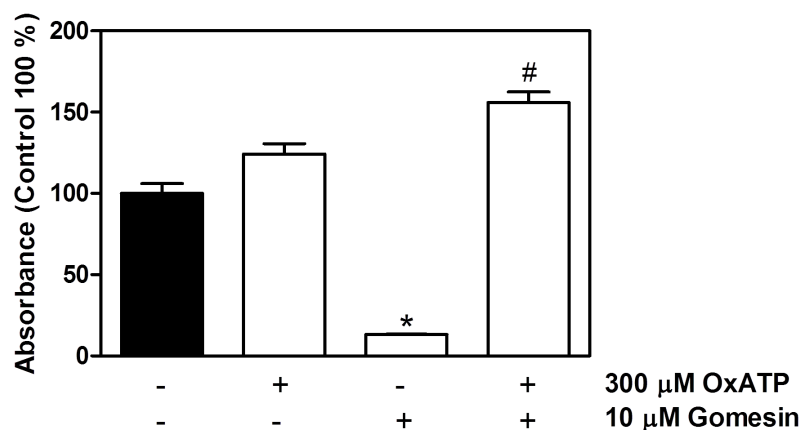


Figure 3 – Inibição da morte celular dependente de gomesina por OxATP. Células CHO foram previamente incubadas com 300 μM de OxATP por 3 h e então estimuladas com Gomesina por 24 h.

CONCLUSÃO

Na linhagem celular CHO o inibidor do receptor P2X7, OxATP, reduziu a morte celular por Gomesina, mostrando uma provável relação do receptor P2X₇ e a ação da Gomesina.

AGRADECIMENTOS: FAEP, FAPESP, CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COUTINHO-SILVA, R. & P. M. PERSECHINI. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am J Physiol.* 273(6 Pt 1): C1793-1800.1997.

EPAND, R. M. & H. J. VOGEL. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2): 11-28.1999.

GALLO, R. L., M. MURAKAMI, T. OHTAKE & M. ZAIYOU. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110(6): 823-831.2002.

HARRIS, F., DENNISON, S. R., PHOENIX, D. A. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein and Peptide Science* 10 (6): 585-606. 2009.

PAREDES-GAMERO, E. J., J. L. DREYFUSS, H. B. NADER, M. E. MIYAMOTO OSHIRO & A. T. FERREIRA. P2X₇-induced apoptosis decreases by aging in mice myeloblasts. *Exp Gerontol.* 42(4): 320-326.2007.

PAREDES-GAMERO, E. J., J. P. FRANCA, A. A. MORAES, M. O. AGUILAR, M. E. OSHIRO & A. T. FERREIRA. Problems caused by high concentration of ATP on activation of the P2X₇ receptor in bone marrow cells loaded with the Ca²⁺ fluorophore fura-2. *J Fluoresc.* 14(6): 711-722.2004.

SURPRENANT, A., F. RASSENDREN, E. KAWASHIMA, R. A. NORTH & G. BUELL. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science.* 272(5262): 735-738.1996.