

## **Análise do efeito do ionóforo Nigericina ao longo do tratamento de células da linhagem eritroleucêmica K562**

Tanira da Silveira Prieto, discente de pós-graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel

Thays Barboza da Luz, discente de pós-graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel

Andrés Delgado Cañedo, docente da Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel

e-mail: taniraprieto.aluno@unipampa.edu.br

A nigericina é um antibiótico purificado de bactérias da espécie *Streptomyces peucetius* que atua como um ionóforo poliéter H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Pb<sup>2+</sup> e apresenta diversos mecanismos antineoplásicos, os quais estão sendo amplamente estudados atualmente. Esta molécula atua na membrana celular e interfere na troca de íons K<sup>+</sup> por H<sup>+</sup> fazendo com que o pH intracelular diminua e a célula sofra o processo que é conhecido como “*cell swelling*”, ou seja, inchaço celular. A piroptose, conhecida como morte inflamatória, é caracterizada por apresentar este processo de “*cell swelling*” induzido por diversas vias de sinalização, onde uma delas envolve a desregulação da entrada de íons K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> através da membrana plasmática. Isto transforma a nigericina numa das moléculas mais usadas como indutoras deste tipo de morte celular. Dentre os mecanismos antineoplásicos estudados da nigericina estão a inativação de sinais Wnt/ $\beta$ -catenina, bloqueio da sinalização do Receptor de Andrógênio (AR) e ativação das vias de sinalização da Proteína Cinase Ativada por Estresse/Cinase N-terminal de c-Jun (SAPK/JNK). Contudo, poucos são os dados na literatura sobre métodos/protocolos do estudo dos efeitos da nigericina pela técnica de citometria de fluxo avaliando o comportamento das células tratadas com este composto ao longo do intervalo de tratamento para a indução da piroptose/“*cell swelling*”. Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito da Nigericina na indução do processo de piroptose nos intervalos de 6h-12h-24h na linhagem eritroleucêmica K562. Para isso, células da linhagem K562 foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 100 $\mu$ g/mL de antibiótico/antifúngico (sulfato de gentamicina e anfotericina B). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, replicando as culturas a cada três ou quatro dias, conforme necessário. Ao atingirem a confluência desejada, as células foram plaqueadas na concentração de 1x10<sup>5</sup>cél/poço. Todos os experimentos foram realizadas usando 3 amostras biológicas (n = 3). Para o grupo controle negativo, as células permaneceram sem tratamento. Através de concentrações estabelecidas na literatura, foi utilizada uma concentração final de 10 $\mu$ M de Nigericina no grupo tratado. No momento da análise (6h- 12h e 24h), a marcação de células mortas foi realizada pela adição do corante de iodeto de propídio (PI) na concentração final de 250 ng/mL. Além disso, para análise de células apoptóticas foi utilizada a combinação dos corantes Iodeto de Propídio (250 ng/ml) e YO-PRO (100nM) para diferenciação de células mortas vs. células apoptóticas. Para análise do ciclo celular

usamos o método padrão de núcleos isolados corados com PI (5µg/ml). As células foram analisadas por microscopia e citometria de fluxo, coletando 10.000 eventos nos gráficos *density plot* FL3-A vs. FSC-A para análise de viabilidade, FL1-A vs. FL3-A para a marcação de morte celular e FL3-A vs. FL3-H e histogramas FL3-A, coletado no modo “slow” para observação do ciclo celular (fases G1→S→G2/M). Às 6 horas de tratamento, as células tratadas com Nigericina (10µM) já apresentaram a morfologia característica de uma célula em processo de *cell swelling*, com grande aumento do volume citoplasmático. A viabilidade celular analisada por citometria de fluxo demonstrou baixa mortalidade (1,4%), acompanhado pelo aumento do tamanho da célula e aumento da complexidade celular. Em 12h, a mortalidade celular apresentou um leve aumento para 2,13%, não demonstrando diferenças significativas em relação ao controle negativo e às 6h de tratamento; porém, mantendo as características observadas no tratamento anterior: aumento do tamanho e complexidade celular. Ao completar 24h de tratamento, a mortalidade aumentou para 14%, apresentando moderada diferença significativa em relação ao controle e mantendo as características morfológicas observadas em 6h-12h de tratamento. A análise de apoptose revelou células em processo apoptótico em 7,3% nas primeiras 6 horas de tratamento, entretanto nas 12h-24h não foram observados diferenças em relação às 6h de tratamento e ao controle negativo. O ciclo celular das células tratadas com Nigericina não apresentou diferenças consideráveis em relação aos controles em nenhum dos tempos de tratamento. Através das análises dos resultados, concluímos que a nigericina na concentração de 10µM apresentou moderada diferença na viabilidade e apoptose nos intervalos de tratamento nas células da linhagem K562, quando comparada aos grupos controles, mesmo quando demonstrando características morfológicas de células que deveriam entrar em processo de morte celular por piroptose. No entanto, novos experimentos devem ser realizados com outras linhagens celulares hematopoiéticas para entender se a linhagem K562 apresenta algum mecanismo de resistência à piroptose induzida por nigericina e também realizar um teste das células k562 tratadas com diferentes concentração deste ionóforo.

**Agradecimentos:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. UNIPAMPA - Laboratório de Cultura Celular Animal e Chamada interna Nº 08/2022 apoio à inovação - INOVAPAMPA 2022.

**Palavras-chave:** Nigericina, citometria de fluxo, linhagem K562, piroptose, câncer.