

Efeito do pH na análise de ciclo celular da linhagem leucêmica K562 por citometria de fluxo

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

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

Giovani Serratti, Técnico de Laboratório, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel

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

e-mail: thaysluz.aluno@unipampa.edu.br;

As pesquisas que incluem análises de cultura de células, proliferação celular, apoptose e ciclo celular são altamente importantes para o diagnóstico e elucidação dos mecanismos e tratamentos de diversas doenças, entre elas as neoplasias. Uma das técnicas mais comumente utilizadas é a análise do ciclo celular por citometria de fluxo, que distingue populações de células em proliferação nas fases G1→S→G2/M, quando ocorre a síntese de DNA, preparação da divisão celular e processos de mitose subsequentes. Inúmeras são as metodologias que definem os reagentes e corantes que podem ser utilizados para análise de ciclo celular por citometria de fluxo; entretanto, os dados na literatura sobre o efeito ou importância do pH na técnica, principalmente na preparação do tampão de lise, são negligenciados. Desta forma, nosso trabalho visou investigar o efeito de diferentes valores de pH no tampão de lise usado no protocolo padrão de análise de núcleos isolados, a fim de avaliar qual ou quais valores de pH apresentam os menores coeficientes de variação (CV) nas curvas correspondentes às fases G1 e G2/M, ao mesmo tempo que pode ser observado a eficiência na absorção do corante fluorescente pelo DNA. As medições do material genético (DNA) podem apresentar variações entre os dados, que podem estar relacionadas a diferentes metodologias para a isolamento dos núcleos e a marcação da fluorescência, a partir disso o CV visa fornecer a variação dos dados em relação a média, representado pela porcentagem, quanto menor for a sua porcentagem significará que os dados das amostras estão mais homogêneos, sem tanta disparidade entre ambas. Para isto, o tampão de lise utilizado foi previamente preparado nas seguintes concentrações: NP-40 (0,5%), Tris base (0,05M), NaCl (0,05M) e EDTA (0,001M) preparando um volume de 200mL. Na sequência, 4 amostras de 50 mL do tampão foram separadas para o ajuste do pH nos valores de: 7.0/7.5/8.0/8.5. A linhagem celular leucêmica K562 foi utilizada como modelo por ser uma linhagem que apresenta altos valores de CV no protocolo de análise de ciclo celular. Para avaliar o ciclo celular, 1×10^5 células foram testadas em triplicata para cada valor de pH. Para tal, o pellet celular obtido de cada amostra, após centrifugação, foi ressuscitado em 250 μ L de cada tampão de lise. Posteriormente, foi adicionado o corante Iodeto de Propídio na concentração final de 1 μ g/mL para marcação do DNA. A citometria de fluxo foi realizada adquirindo 10.000

eventos em gráficos density plot FL3-A vs. FL3-H e histogramas FL3-A, no modo “slow”. As amostras foram analisadas após 5 minutos de incubação e também após incubação por 72h mantidas em refrigeração de 4°C a 8°C. O tampão de lise para ciclo celular, sem ajuste de pH, foi utilizado como procedimento padrão. As amostras avaliadas após 5 minutos de incubação revelaram que o tampão mais adequado para se obter a melhor marcação foi aquele ajustado no pH de 8,5. Nas amostras analisadas após as 72h, todos os gráficos mostraram-se semelhantes, não havendo discrepância entre os tampões com diferentes valores de pH. Por estas razões, nossos dados sugerem que pH mais elevados como pH 8,5, possivelmente conseguem diminuir a interferência de RNA nas amostras, desnaturando os mesmo desfazendo estruturas secundárias dos RNAs, o que resultaria numa marcação preferencial do DNA. Além disso, nas amostras avaliadas após as 72h, o pH mais alcalino não teria muita influência no dado pois o RNA não é estável e estaria degradado nestas condições de conservação das amostras. Assim, podemos concluir que, apesar da linhagem leucêmica K562 possuir grandes quantidades de RNA que interfere na qualidade da marcação das diferentes fases do ciclo celular, o tampão de lise testado no pH de 8,5 foi eficaz para marcação sem interferências de RNA sem a necessidade de uso de RNAses durante o protocolo. Ao mesmo tempo, salientamos que outras linhagens celulares podem apresentar diferentes particularidades no ciclo celular, sendo necessários mais estudos acerca do efeito do pH no tampão de lise. Portanto, reforçamos a importância do uso de pH alcalino no tampão de lise nos protocolos de ciclo celular por citometria de fluxo para obtenção de dados com baixos coeficientes de variação. Mais estudos referentes ao efeito do pH, em diferentes linhagens celulares e diferentes valores de pH serão posteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa para estabelecer as melhores condições para a realização da técnica.

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.

Palavras-chave: pH; ciclo celular; linhagem K562; citometria de fluxo; tampão de lise.