

Mariana Alberti Gonçalves (Iniciação Científica)¹, Raquel Ciuvalshi Maia¹, Roberta Soares Faccion¹

1-Laboratório de Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, INCA, RJ

e-mail: marianalberti@hotmail.com

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Compondo o grande grupo de neoplasias hematológicas existem as leucemias e os linfomas. Os linfomas surgem nos diferentes tecidos linfoides dispersos pelo corpo podendo ser classificados em dois subtipos os linfomas Hodgkin (LNH) e linfomas não-Hodgkin (LNH). Dentre os LNH existem mais de 40 tipos de linfomas sendo o subgrupo de maior ocorrência, mais heterogêneo e agressivo os linfomas difusos de grandes células B (LDGCB). Sendo também este o subgrupo que apresenta o pior prognóstico em relação ao tratamento convencional. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer estima-se uma incidência de aproximadamente de 3 mil novos casos de LDGCB por ano no Brasil. Além disso, quase metade dos pacientes ainda evolui para o óbito em decorrência de recaída e/ou refratariedade relacionadas à resistência ao tratamento. Por isso, é importante identificar fatores biológicos que tenham valor prognóstico e que possam ajudar a compreender a patogênese e o curso da doença.

Com o caráter multifatorial de resistência ao tratamento, um possível alvo de investigação é o papel do fator estimulador de colônias de macrófagos (CSF1) nos LDGCB. O CSF1 é uma citocina tradicionalmente conhecida por seu papel na proliferação, diferenciação e sobrevivência de monócitos. O CSF1 regula também a diferenciação de macrófagos e osteoclastos, a implantação do trofoblasto e o desenvolvimento da glândula mamária (onde seu receptor é expresso na puberdade, gravidez e amamentação). Além disso, a expressão de CSF1 bem como de seu receptor tem sido observada em diversos tipos de câncer como carcinomas de mama, do trato reprodutor feminino, próstata e rim além de neoplasias hematológicas. Foi descrito ainda que o CSF1 torna o sistema imune permissivo a tumores e pode atuar nas próprias células tumorais estimulando seu crescimento e migração. Diversos grupos vêm mostrando a produção do CSF1 por células de LDGCB, a expressão do seu receptor nos tumores, bem como o estímulo à expressão de survivina e Bcl-2 pelo CSF1. Embora seja classicamente descrito como uma proteína de membrana, o receptor do CSF1 (CSF1R) já foi detectado no núcleo de monócitos saudáveis e também de células tumorais. Tal observação foi associada à atividade transcricional de genes relacionados à proliferação celular, incluindo o gene que codifica a proteína c-myc, que é uma proteína de destaque na linfomagenese. Por isso, o presente projeto tem como objetivo investigar a localização subcelular do CSF1R em células de duas linhagens celulares derivadas de LDGCB mediante a exposição ou não ao seu ligante, comparando com a sua localização em células neoplásicas de mama e de leucemia mielóide crônica, através da imunofluorescência.

Representação esquemática do receptor de CSF1

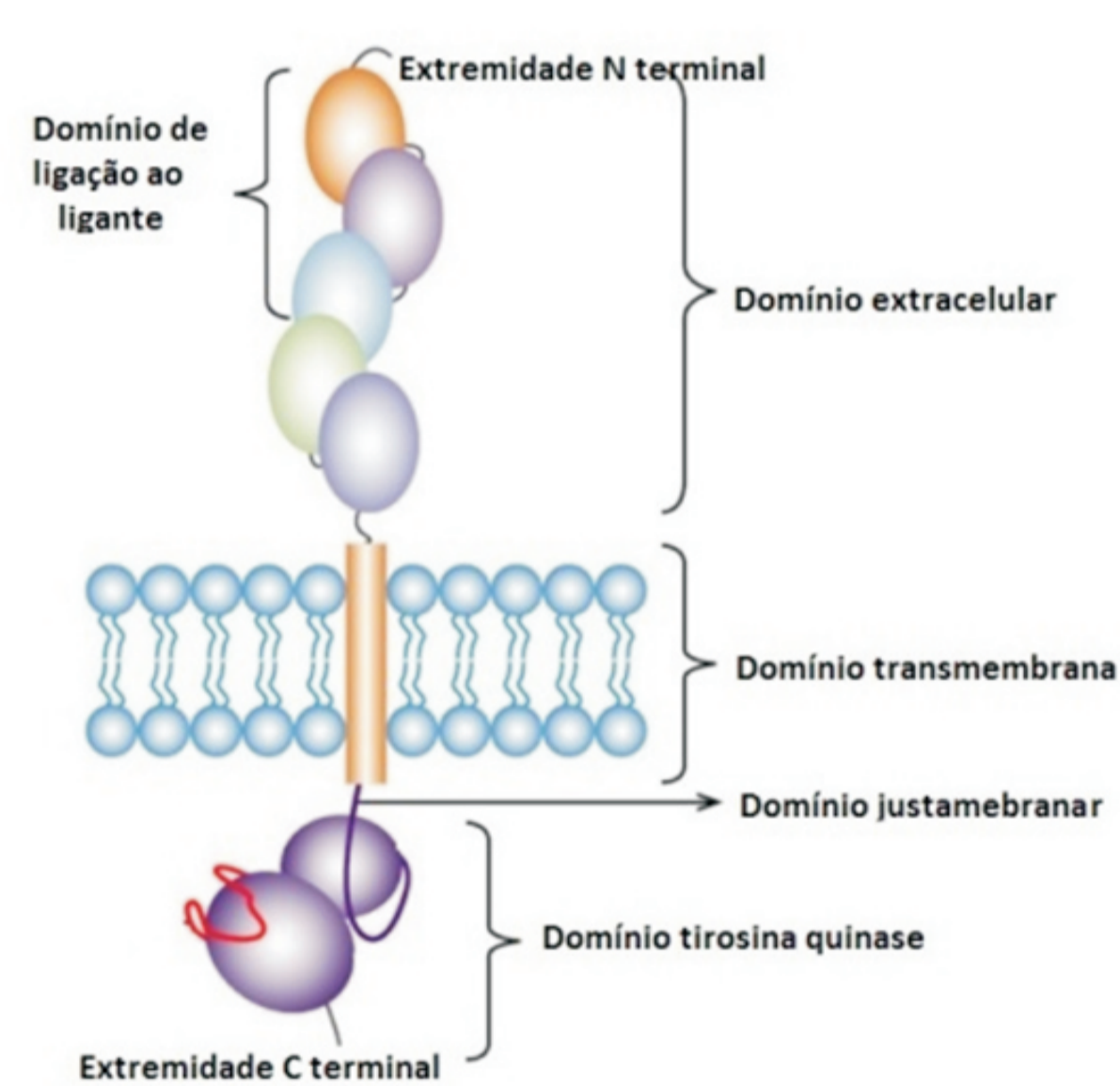


Figura 1: Ilustração do receptor de CSF1. Adaptado de Berenstein, 2015.

MATERIAIS E MÉTODOS

No estudo são utilizadas as linhagens celulares humanas de LDGCB SUDHL4 e Toledo e a linhagem neoplásica de mama MDA-MB-231. Também estão sendo estudadas as linhagens derivadas de leucemia mielóide crônica K562 e Lucena. Todas as linhagens serão expostas a 100 ng/mL de CSF1 recombinante para avaliar uma possível modulação da localização celular do CSF1R mediante sua ativação. É utilizada a técnica de imunofluorescência para avaliar morfologicamente a localização celular do CSF1R. A imunomarcagem com o anticorpo monoclonal anti-CSF1R (#3152 Cell Signalling) foi seguida da marcação com anticorpo secundário anti-Rabbit fluorescente Alexa 488, bem como com DAPI para visualização das células ao microscópio confocal. A localização do CSF1R será comparada ainda com a de moléculas como β -tubulina (citoplasma) e fosfatidilserina (membrana), através da microscopia confocal.

Imunofluorescência indireta

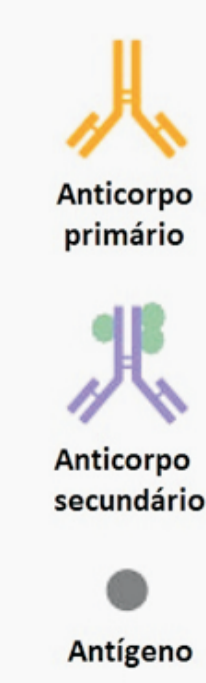
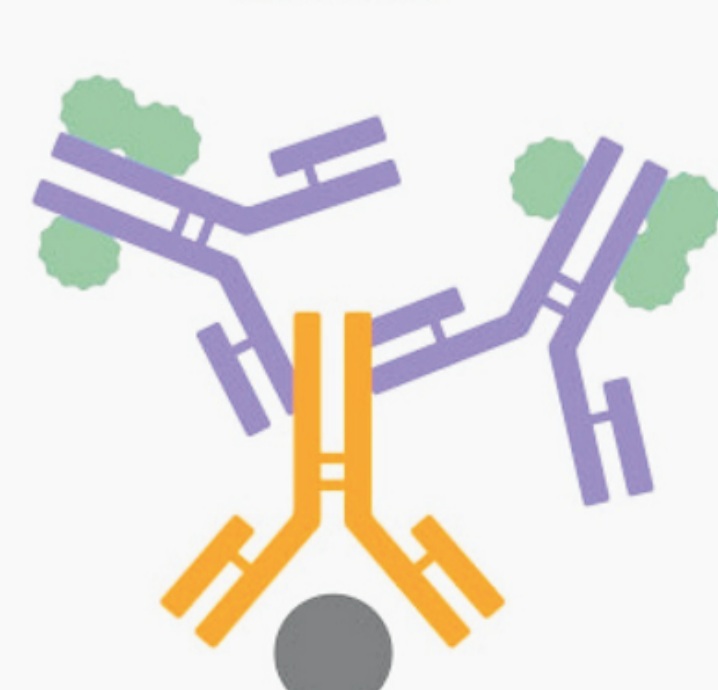


Figura 2: Representação esquemática da reação de imunofluorescência indireta. Figura adaptada. Disponível em: <www.thermofisher.com>

RESULTADOS PARCIAIS

Como o estudo encontra-se em fase inicial de desenvolvimento, até o momento foi realizada a titulação do anticorpo monoclonal anti-CSF1R nas linhagens de leucemia mielóide aguda Lucena, K562 e KIM (Figura 3), também a detecção inicial da localização do receptor nas linhagens celulares de leucemia mielóide crônica K562, Lucena e KIM e na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (Figura 4). Nas linhagens de LDGCB SUDHL4 e Toledo foi realizada a detecção da localização de CSF1R, além disso, foi feita a comparação entre essas linhagens com e sem tratamento de 100 ng/ml do ligante CSF1 (Figura 5).

Até o presente momento está sendo realizada a repetição de todos os experimentos. Foi possível perceber que, corroborando com os dados da literatura, as linhagens testadas apresentam o receptor. Entretanto, sua localização em cada linhagem precisa ser confirmada.

Titulação de CSF1R

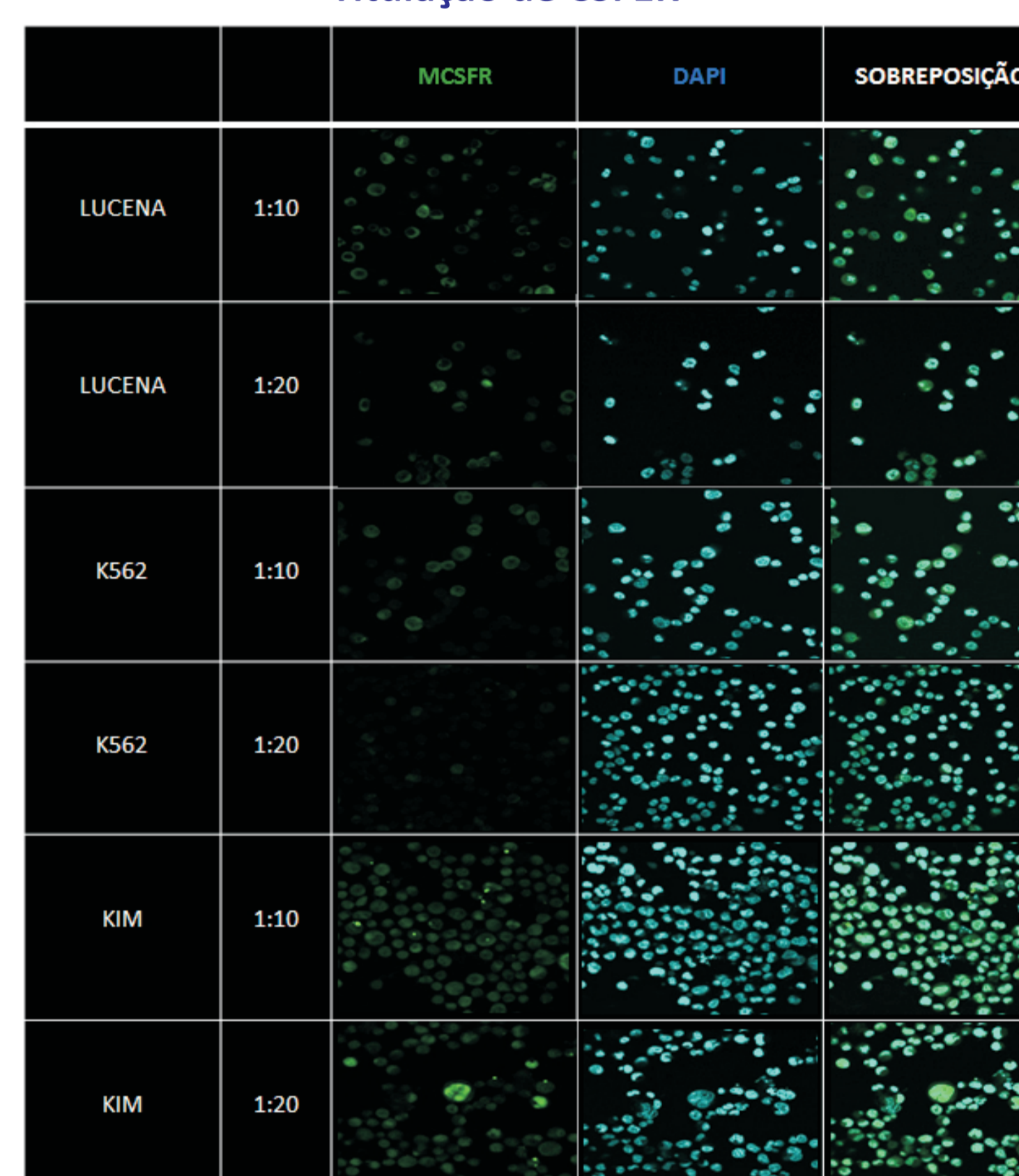


Figura 3: Titulação do anticorpo anti-CSF1R nas linhagens de leucemia mielóide crônica K562, Lucena e KIM. A cor verde representa a detecção do anticorpo monoclonal anti-CSF1R (#3152 Cell Signalling) pelo anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado ao fluorocromo Alexa 488. A cor azul representa a detecção do DAPI. Imagem analisada por microscopia confocal capturada com aumento de 60x.

Localização de CSF1R

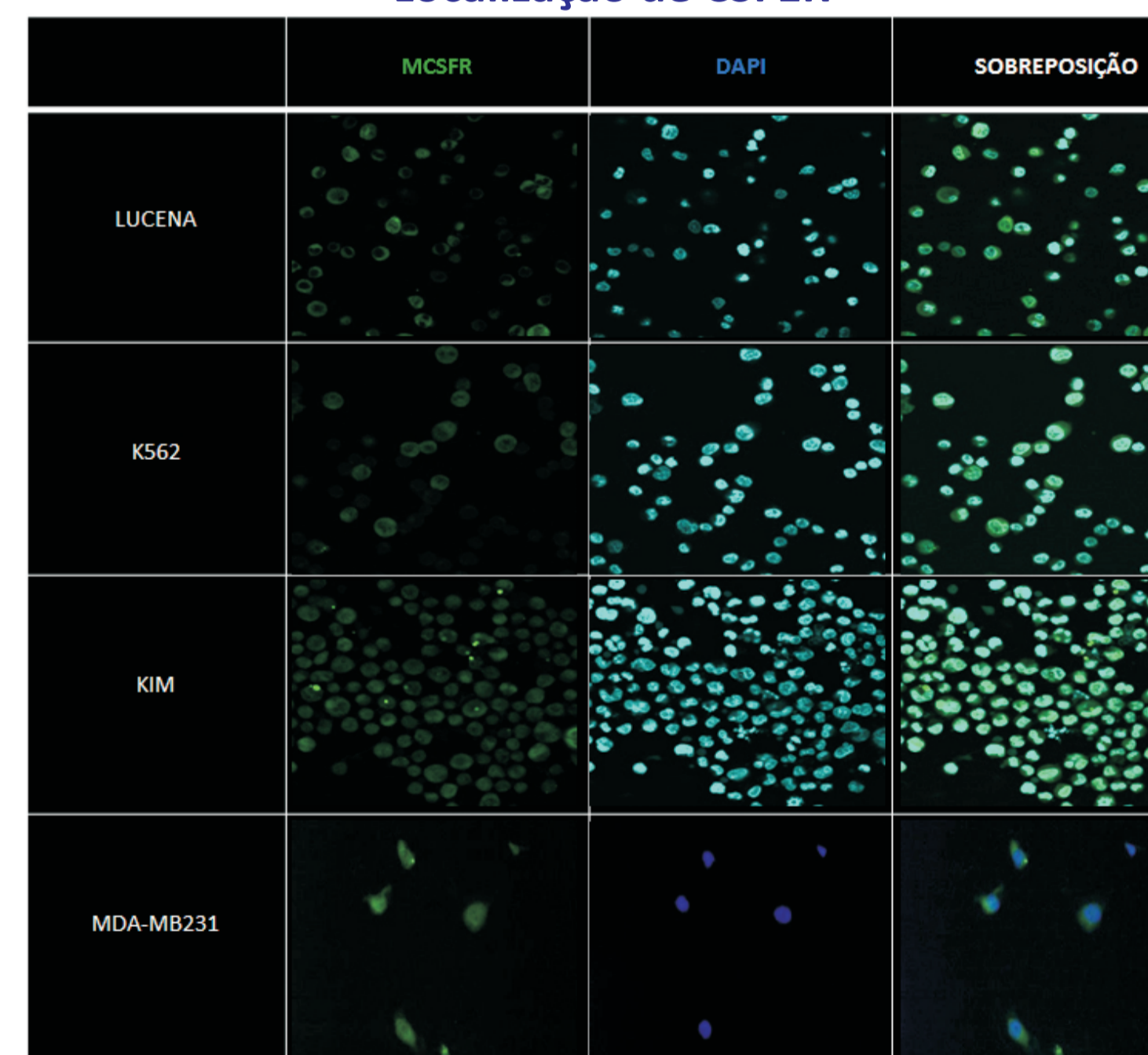


Figura 4: Localização de CSF1R nas linhagens de leucemia mielóide crônica K562, Lucena e KIM e na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. Verde representa a detecção do anticorpo monoclonal anti-CSF1R (#3152 Cell Signalling) diluído na proporção de 1:10 nas linhagens K562, Lucena e KIM. Diluído 1:25 em MDA-MB-231 seguido pelo anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado ao fluorocromo Alexa 488 em todas as linhagens. A cor azul representa a detecção do DAPI. Imagem analisada por microscopia confocal capturada com aumento de 60x.

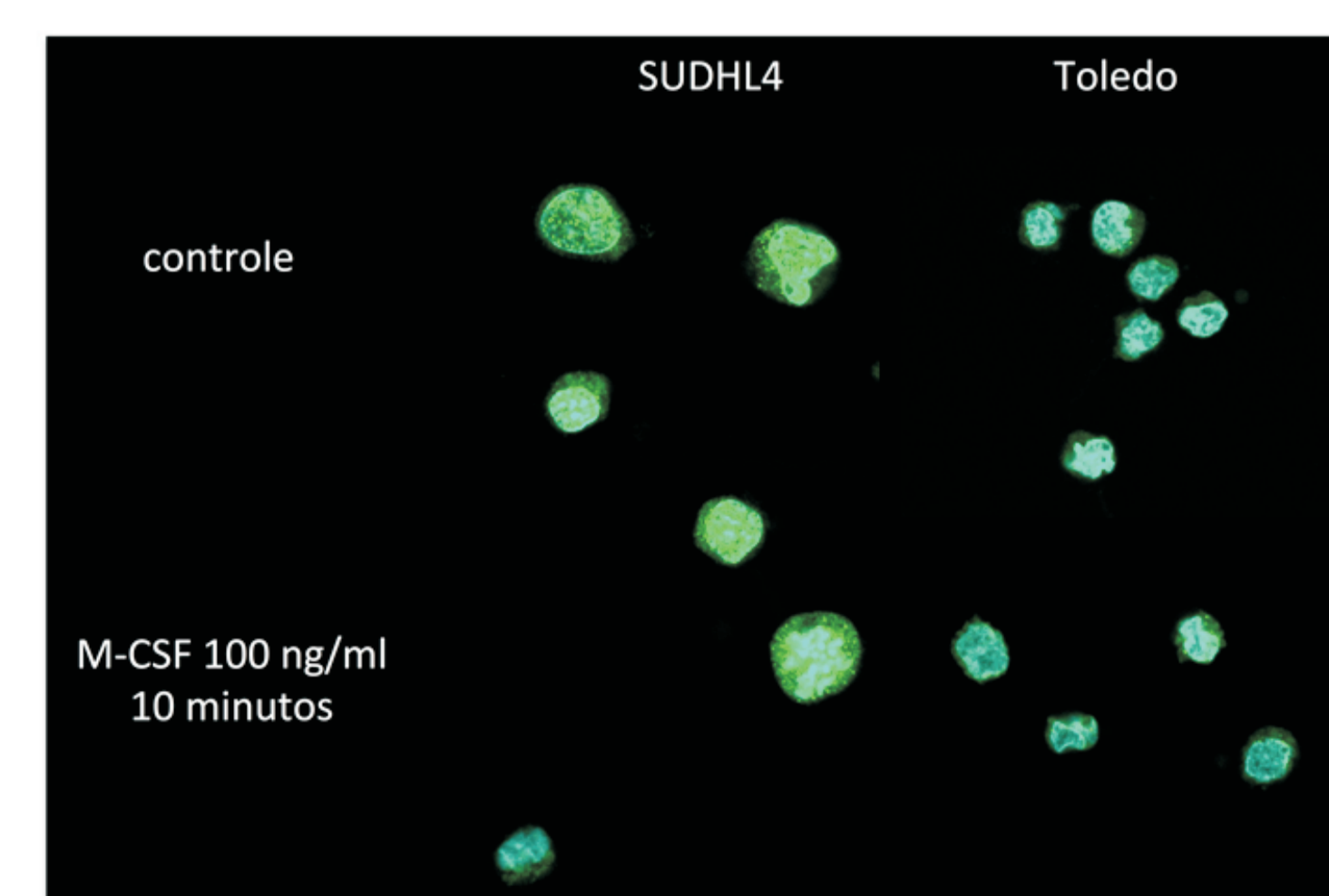


Figura 5: Localização do CSF1R nas linhagens de LDGCB SUDHL4 e Toledo. Comparação entre controle e tratado com adição de 100 ng/ml do ligante CSF1. A cor verde representa a detecção do anticorpo monoclonal anti-CSF1R (#3152 Cell Signalling) pelo anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado ao fluorocromo Alexa 488. A cor azul representa a detecção do DAPI. Imagem analisada por microscopia confocal capturada com aumento de 60x.