

EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE WNT EM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Pedro Leite Azevedo¹ (ME); Nathalia Correa de Almeida Oliveira, Msc.¹; Eliana Abdelhay, PhD.¹; Renata Binato, PhD.¹

¹Laboratório de Células Tronco, Centro de Transplante de Medula Óssea CEMO, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença hematológica heterogênea, caracterizada pelo acúmulo e proliferação de precursores mielóides na medula óssea, diminuição dos níveis de apoptose e a parada da diferenciação celular. Apesar de vários estudos na área, eventos relacionados com o início da doença, bem como a sua progressão continua a ser desconhecido. Acredita-se que a transformação maligna das células tronco hematopoiéticas (CTH) pode dar origem as células tronco leucêmicas (CTL) e esta transformação pode estar relacionada com alterações na sinalização das células estromais mesenquimais (hMSC).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que as hMSC de pacientes com LMA (hMSC-LMA) possuem uma assinatura molecular comum, quando comparada hMSC de doadores saudáveis (hMSC-DO). Neste estudo, foram encontrados 55 genes diferencialmente expressos. Dentre eles, o gene *Bmp4* encontra-se com sua expressão diminuída em hMSC-LMA e essa diminuição de expressão pode ser regulada pela via de sinalização Wnt.

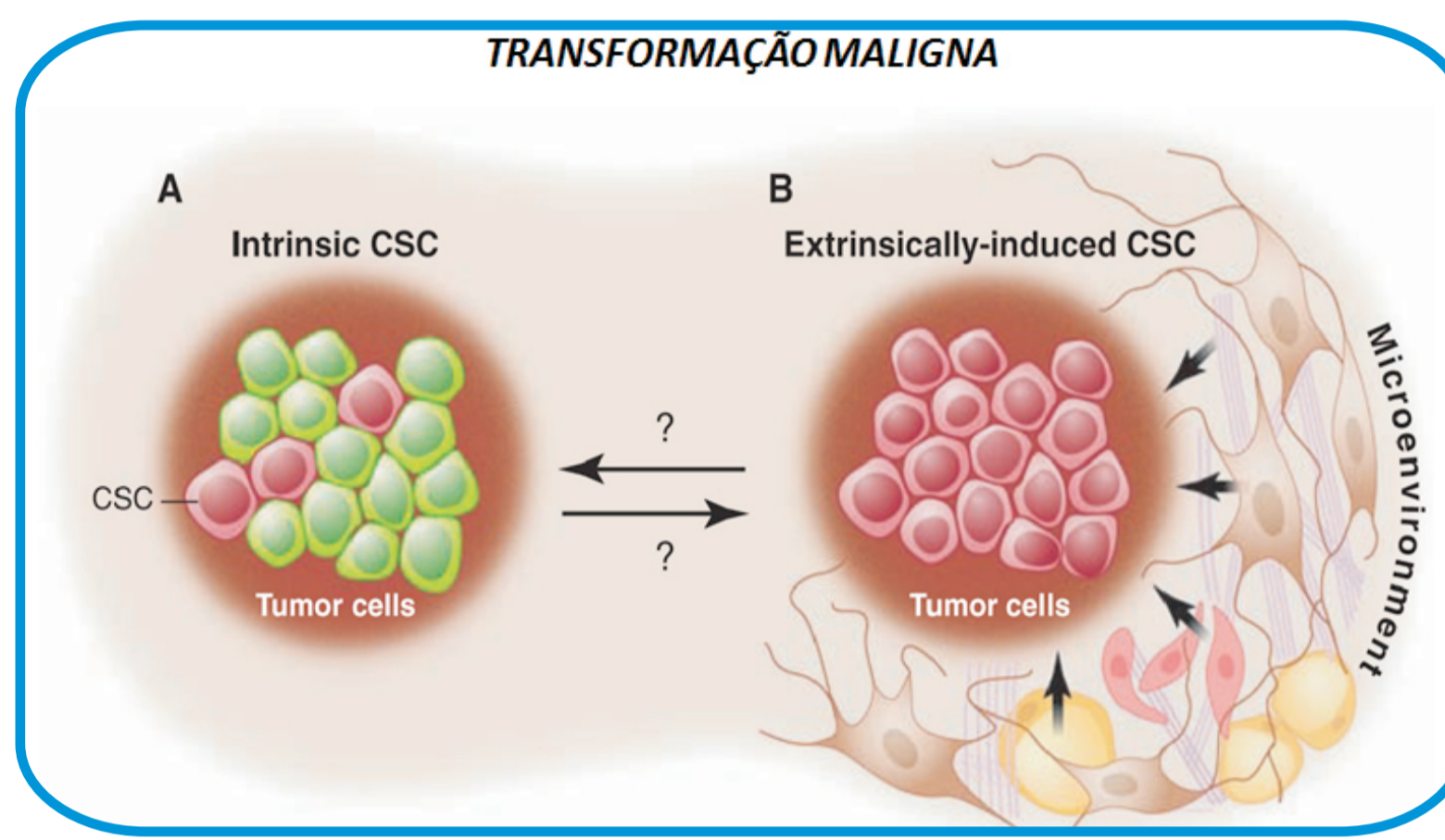


Figure 1: Influências no surgimento da célula tronco leucêmica. O surgimento da CTL (B) pode ser influenciado por fatores intrínsecos como mutações, translocações, instabilidade genética, como também por fatores extrínsecos através da desregulação das sinalizações realizada pelo microambiente medular para a CTH (A). Adaptado de M.J. Rosen e T.C. Jordan.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é avaliar a expressão gênica relacionada com a via de sinalização de Wnt em hMSC-LMA e comparar com a expressão de hMSC provenientes de doadores saudáveis (hMSC-DO).

METODOLOGIA

As hMSC foram obtidas a partir da medula óssea de pacientes ao diagnóstico com LMA, abrangendo todos os subtipos comuns de acordo com a classificação da FAB, e de doadores saudáveis (DO). As hMSC foram caracterizadas de acordo com os critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). Para avaliar a expressão gênica dos genes relacionados com a via de Wnt, utilizamos a metodologia de PCR Array (Human WNT Signaling Pathway RT² ProfilerTM PCR Array-Qiagen). O *fold change* 1,5 foi utilizado como critério para definirmos os genes diferencialmente expressos. Para a validação dos resultados do PCR Array, a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR) foi aplicada.

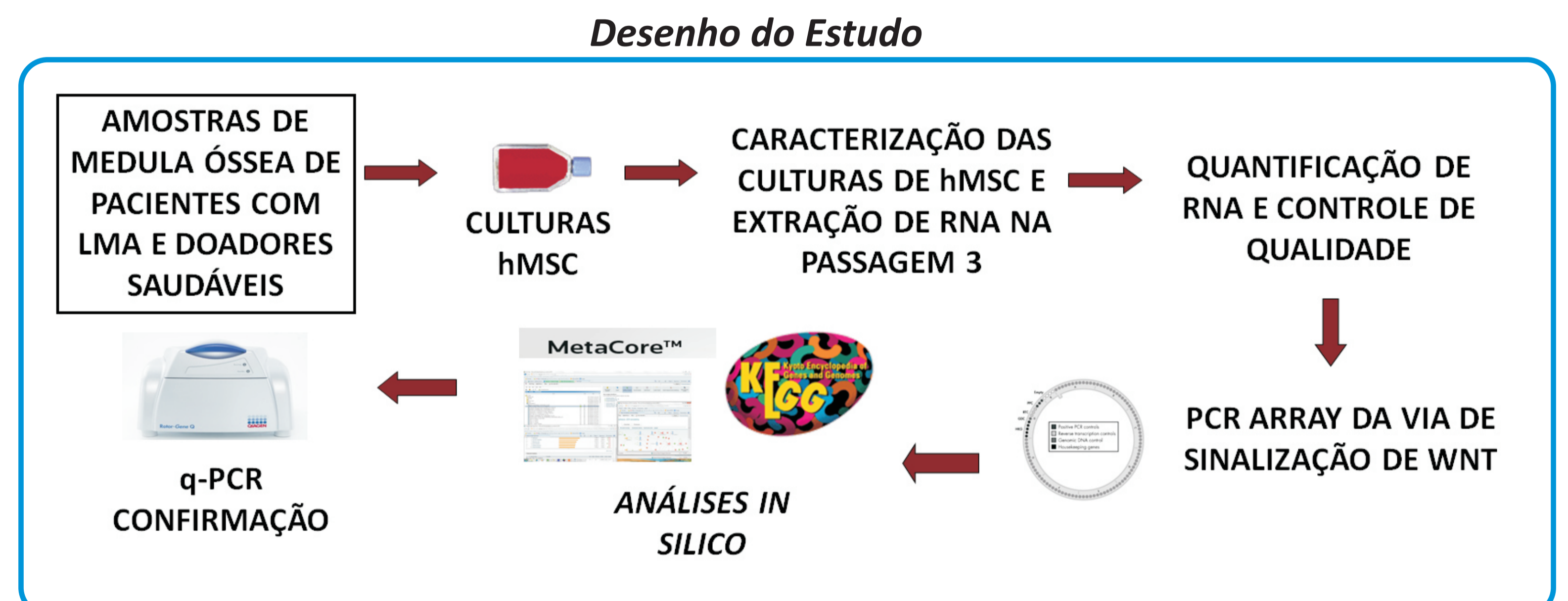


Figure 2: Esquema do estudo realizado

RESULTADOS

Caracterização das culturas de hMSC

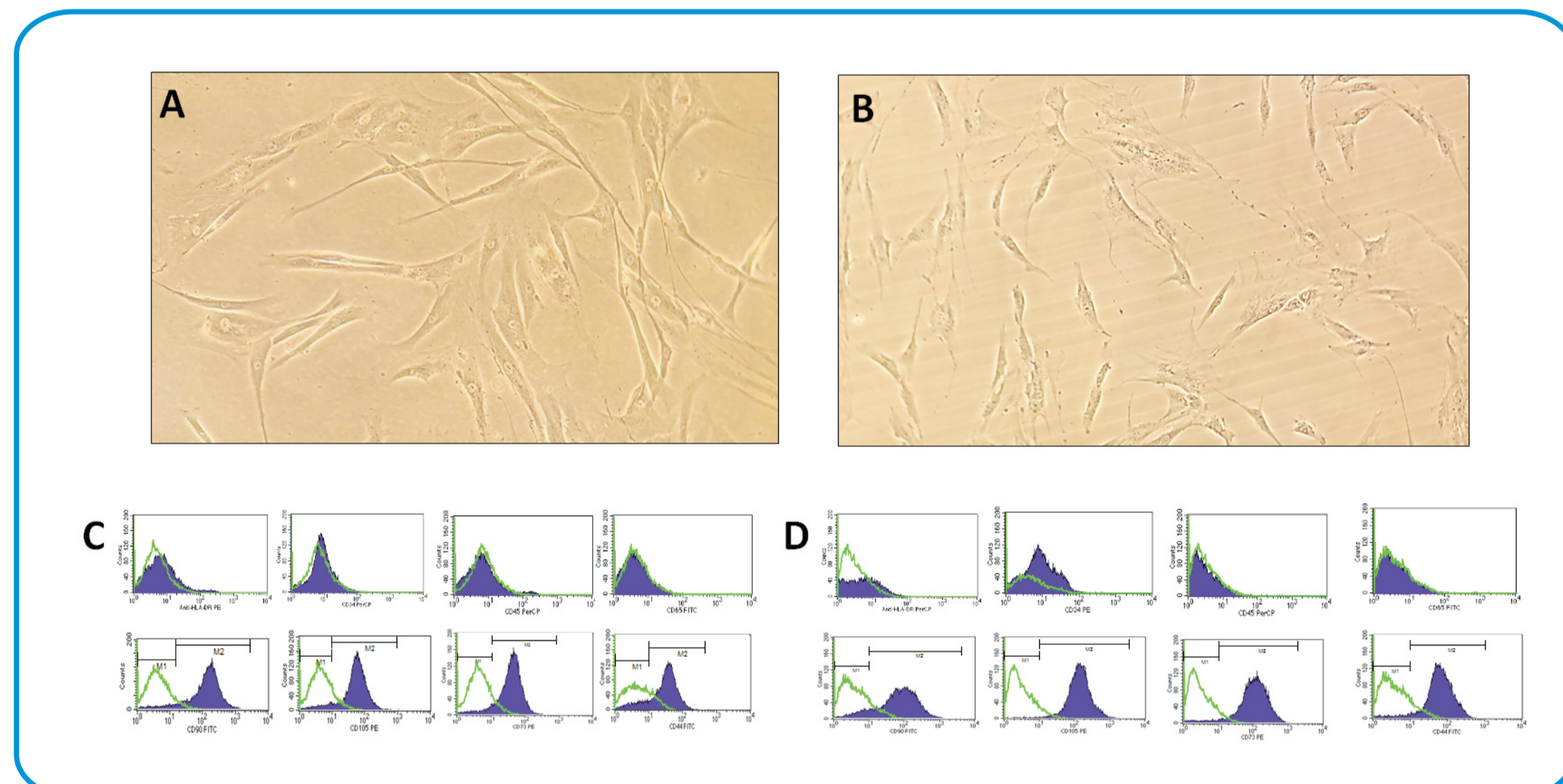


Figure 3: Caracterização das culturas de hMSC de acordo com a SITC. (A) e (B) hMSCs indiferenciadas de doadores saudáveis e pacientes com LMA, respectivamente (Aumento 200x). Perfil imunofenotípico das (C) hMSC-DO e (D) hMSC-AML. As culturas foram capazes de expressar CD90, CD105, CD73 e CD44, com ausência para os marcadores CD45, CD34, CD65 e HLA-DR.

Genes diferencialmente expressos

Símbolo Gene	Fold Change	Símbolo Gene	Fold Change
WNT7B	-23,75	PRICKLE1	1,52
WNT11	-3,40	WNT10A	1,56
WIF1	-2,99	BCL9	1,57
CXXC4	-2,44	FZD3	1,64
TCF7	-2,29	KREMEN1	1,76
PORCN	-2,05	VANGL2	1,85
LEF1	-1,86	FRZB	2,39
WNT16	-1,83	FZD1	2,42
WNT5B	-1,73	MMP7	3,11
PITX2	-1,61	SFRP1	3,20
RHOA	-1,57	FZD9	3,56
TCF7L1	-1,56	SFRP4	3,61
PPARD	-1,54	NKD1	9,56

Figure 4: Lista dos genes diferencialmente expressos quando comparado as culturas de hMSC-AML e hMSC-DO, identificados através do ensaio de PCR Array (Human WNT Signaling Pathway)

Confirmação RT-qPCR

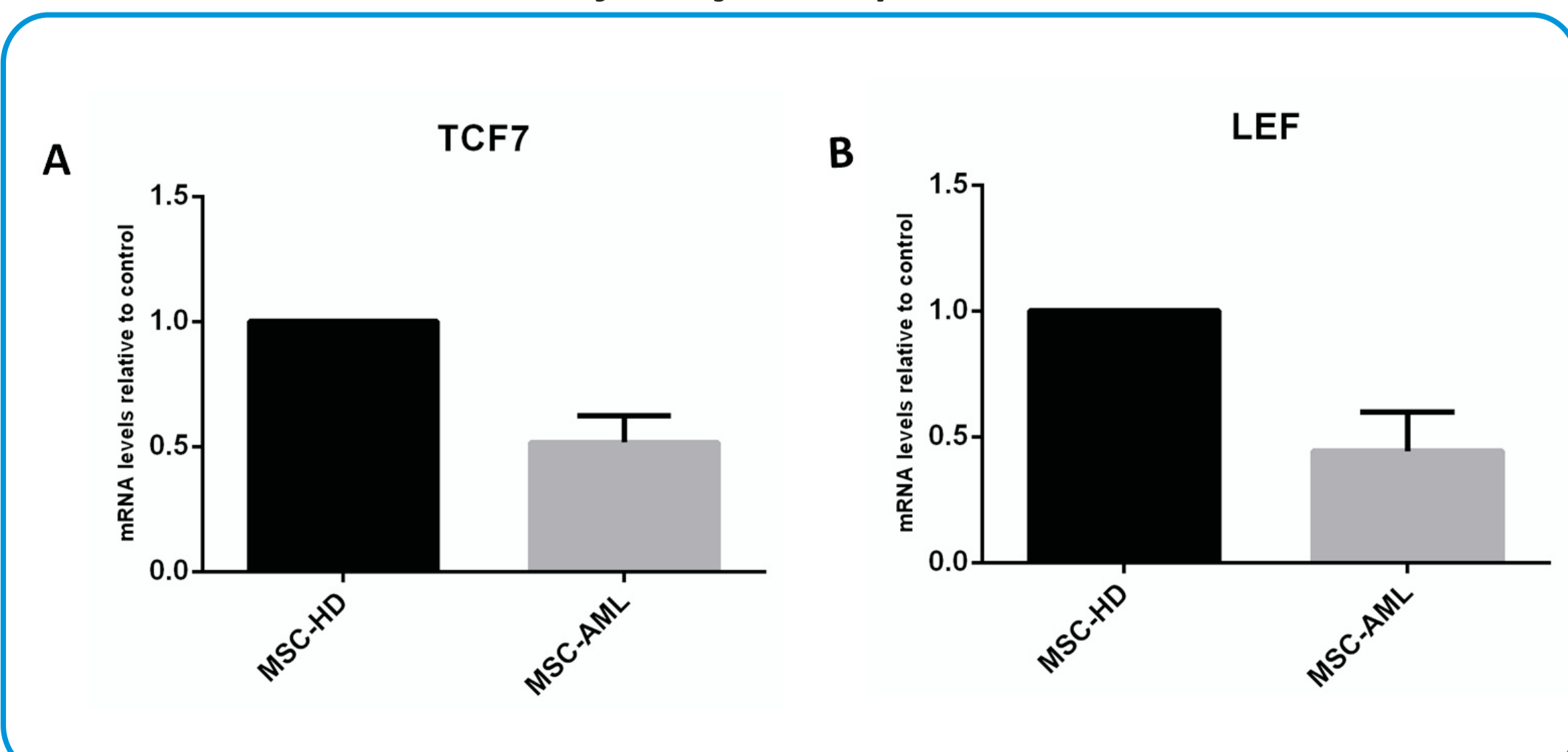


Figure 5: Validação dos resultados do PCR array por RT-qPCR. Para confirmar os resultados obtidos do PCR array, foi utilizado o RT-qPCR para analisar os genes diferencialmente expressos utilizando um número maior de amostras. A análise por RT-qPCR para o gene (A) *Tcf7* e (B) *Lef* confirmou a regulação negativa em de hMSC de pacientes com LMA, corroborando com os resultados do PCR array.

Análises In silico

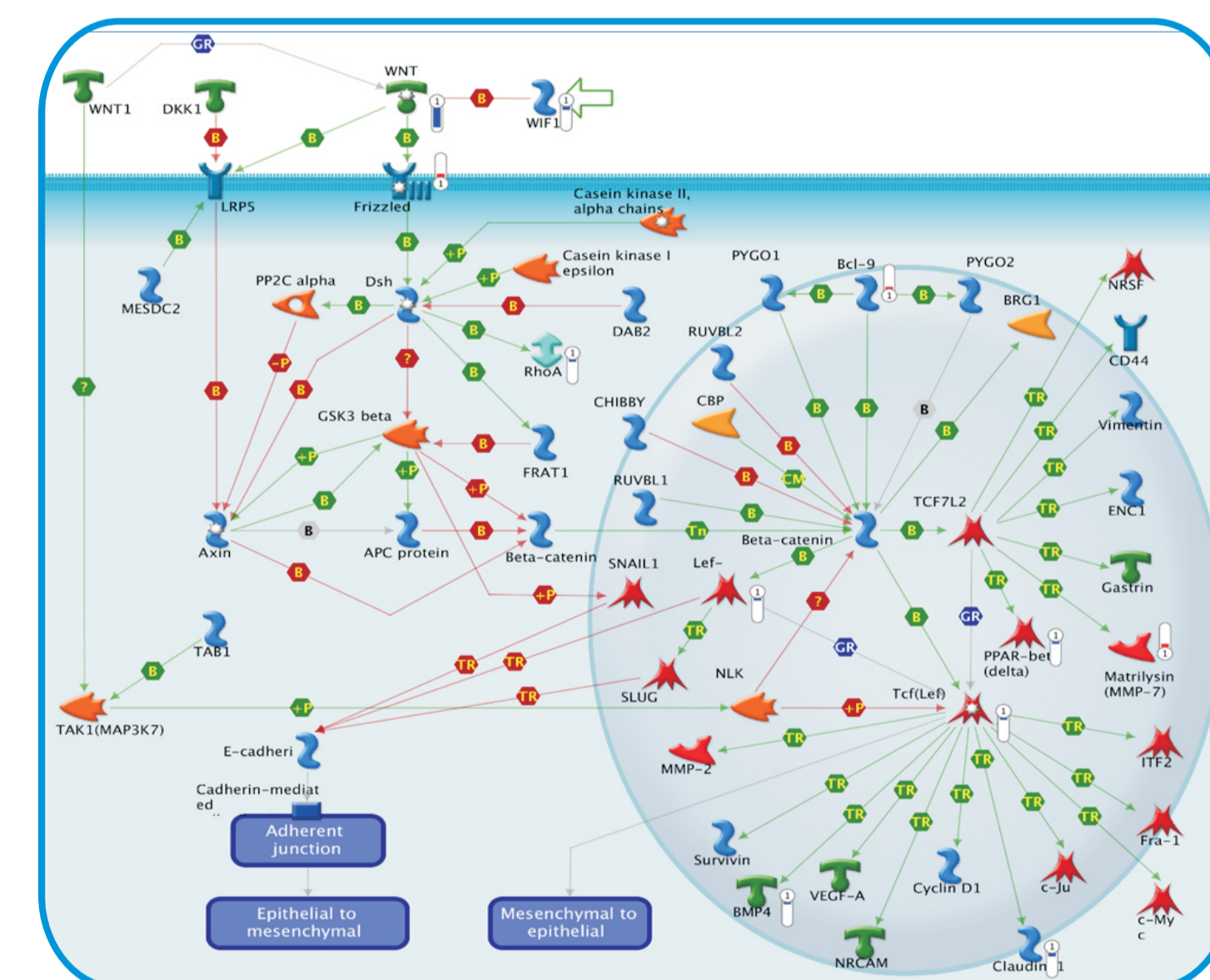


Figure 6: Análise *in silico* utilizando o software MetaCoreTM dos genes diferencialmente expressos em hMSCs-LMA envolvidos na via de sinalização Wnt.

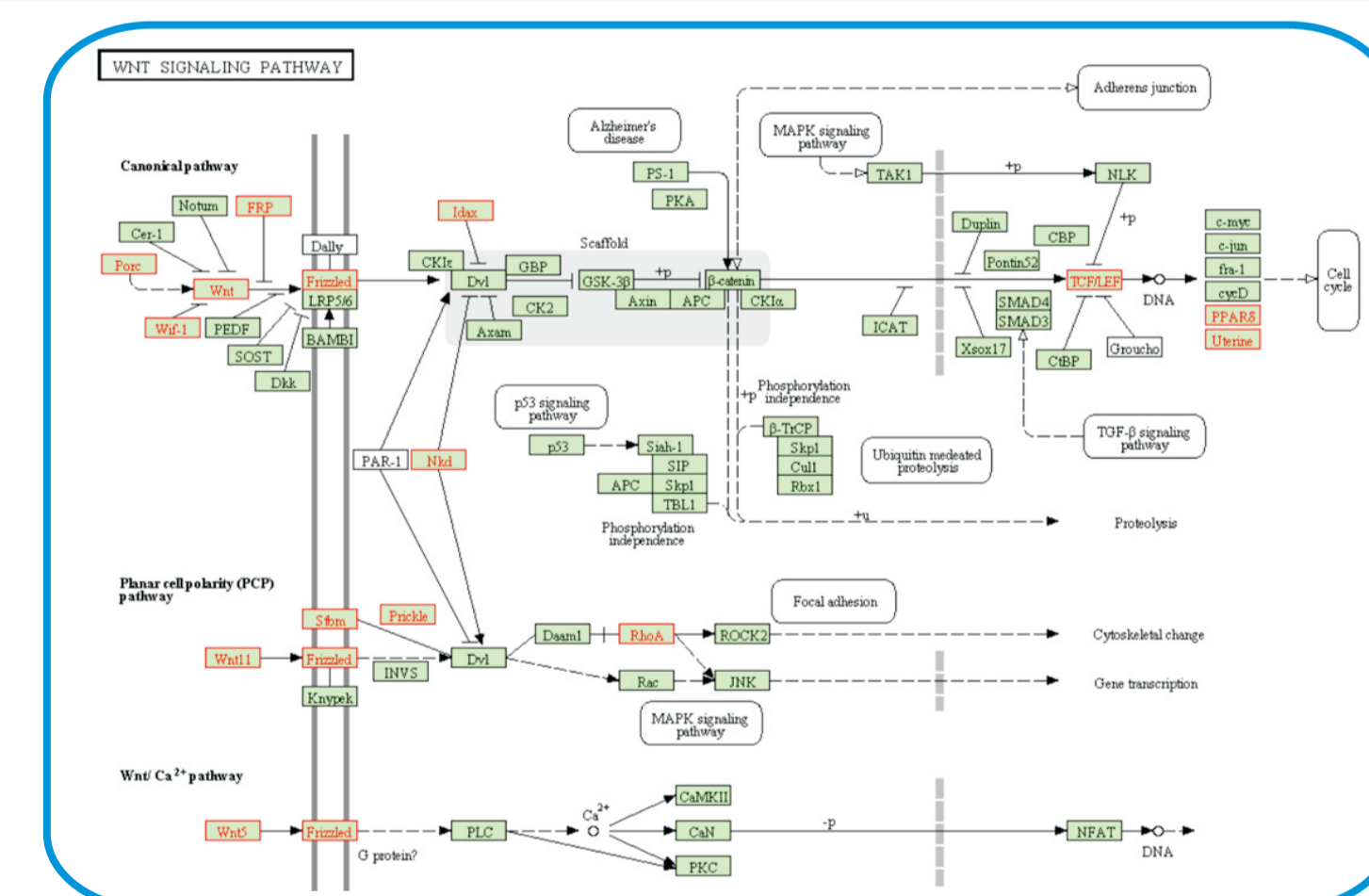


Figure 7: Diagrama de KEGG da via canônica de sinalização Wnt/β-catenina: Quadros verde indicam proteínas relevantes na via de sinalização de Wnt. Quadros vermelhos indicam alterações na expressão gênica em hMSC-AML.

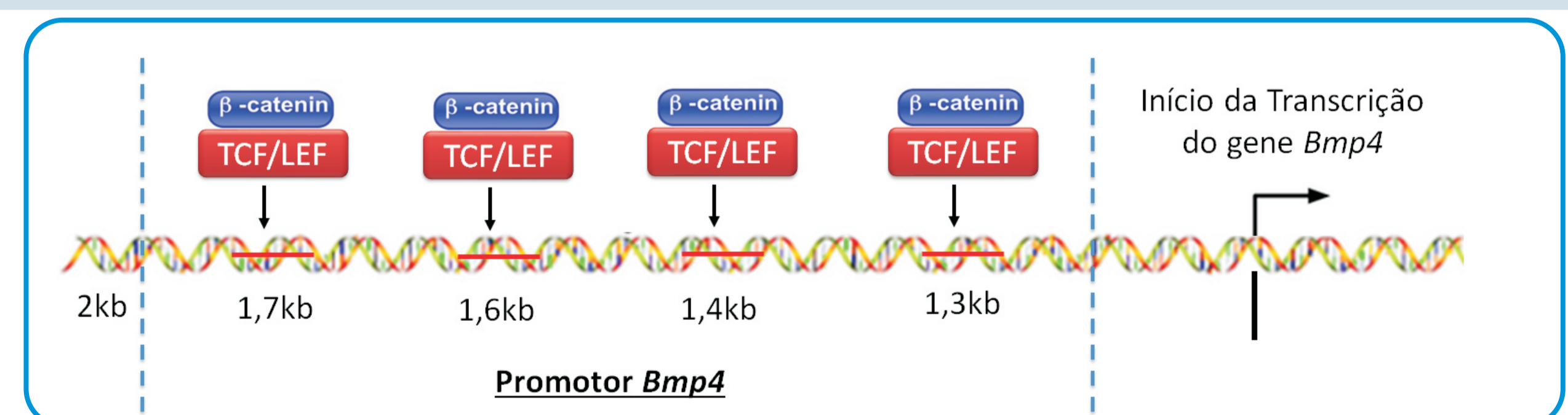


Figure 8: Análise *in silico* de 2kb do promotor do gene *Bmp4*: Foram identificados quatro sítios de ligação Tcf/Lef na região promotora do gene *Bmp4* (Sítio consenso de ligação TCF/LEF: 5'-CTTTG-3')

CONCLUSÃO

Nossos resultados até o presente momento sugerem uma alteração na sinalização da via Wnt nas hMSC-LMA e esta alteração pode estar relacionada com a diminuição da expressão de *Bmp4*.

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA

Suporte Financeiro: FAPERJ, CNPq, CAPES and Ministério da Saúde – INCA