

# OBTENÇÃO DE LINHAGEM CELULAR LEUCÊMICA COM EXPRESSÃO ECTÓPICA DA PROTEÍNA HUMANA CD73 PARA INVESTIGAÇÃO DE SEU EFEITO NA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

Palavras-Chave: Imunologia, Leucemia, CD73

## Autores/as:

Letícia Grillo Guimarães Pereira<sup>1,2</sup>, Gabriella Lima dos Reis<sup>1,2</sup>

Orientadora: Dra. Priscila Pini Zenatti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, Inst. de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

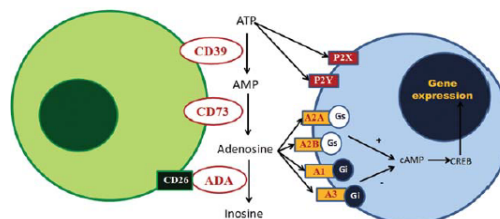
<sup>2</sup>Centro de Pesquisa Boldrini, Laboratório de Anticorpos Terapêuticos.

## INTRODUÇÃO:

Leucemia linfóide aguda (LLA) é a malignidade de infância mais comum, e consiste em 25% de todos os cânceres infantis [1]. Aproximadamente 80% dos casos são relatados em crianças [2], embora também represente uma doença devastadora quando em adultos. A LLA representa um conjunto de doenças normalmente derivadas de rearranjos cromossômicos, aneuploidias, mutações em genes que codificam fatores de transcrição que regulam o desenvolvimento linfóide, supressores de tumor e proteínas que regulam a progressão do ciclo celular [3]. A LLA Filadélfia-like (Ph-like) é um subtipo de LLA-B de alto risco e um identificou 15 genes diferencialmente expressos em um estudo com 92 pacientes. Dentre eles, foi encontrado o gene *NT5E*, que codifica a proteína CD73 [4].

A proteína CD73 consiste de dois domínios homodiméricos, e está ancorada a proteínas GPI na superfície da célula. Ela é expressa em macrófagos, células dendríticas, entre outras células, bem na maioria dos tecidos. [5]

A principal função desta proteína em conjunto com CD39, é gerar adenosina através de uma cascata de degradação [6]: ATP→ADP→AMP→adenosina; como indicado na **Figura 1**. Adenosina é um potente imunossupressor e estimulador de angiogênese [7], levando à formação de um microambiente propício à neoplasia.



**Figura 1: Vias de conversão de ATP (adenosina trifosfato) em inosina.** Nessa via, a enzima CD73 participa da conversão de AMP em adenosina [8].

Elevadas concentrações de adenosina são responsáveis por criar um microambiente imunossupressor, limitando a habilidade das células NK em mediar a lise de células tumorais, inibindo sua produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  [5,8]. Assim, fica evidente a importância de estudar mais acerca do efeito desta proteína, que pode se tornar alvo para novas terapias contra leucemia.

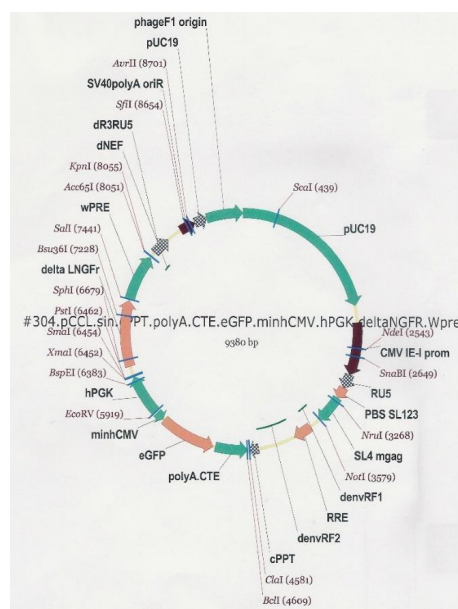
Portanto, o presente projeto propõe relacionar possíveis efeitos da superexpressão do gene *NT5E* na progressão da LLA-B, utilizando as linhagens leucêmicas REH e RS4;11.

## METODOLOGIA:

O mRNA do gene *NT5E* foi obtido a partir da linhagem de meduloblastoma DAOY, que tem expressão endógena deste. A amplificação do gene foi feita a partir do DNA complementar, pela técnica de PCR, utilizando-se primers específicos desenhados por nós. O amplicon (1830 pb) foi purificado a partir de eletroforese em gel de agarose 1%, clonado no plasmídeo pJET (ThermoFisher) e sequenciado para confirmar ausência de mutações decorrentes da PCR. O gene *NT5E* foi subclonado no plasmídeo p#304 (pCCL.sin.cPPT.minCMV.eGFP.PGK. $\Delta$ NGFR.WPRE) [8], por digestão dupla com *Xma*I e *Sal*I, enzimas de restrição que flanqueiam o inserto clonado (**Figura 2**). O plasmídeo lentiviral obtido após a clonagem será denominado p#304.CD73/GFP, pois além do

gene *NT5E*, ele expressa o gene *repórter* GFP. Também utilizamos plasmídeos sem o gene, denominados p#304.empty/GFP, como controle. Ele possui os sítios de restrição *Xma*I/*Sal*I, onde será inserido o gene de interesse. Para tanto, os primers de amplificação do deste também contêm as sequências destas duas enzimas de restrição.

A produção dos lentivirus carregando o gene *NT5E* foi feita em células HEK293T, por meio da transfecção delas com os plasmídeos p#304, pVSVG (envelope viral), pREV (transcriptase reversa) e pMDL (empacotamento). Esses vírus foram os vetores para transdução das linhagens REH e RS4;11, que foram selecionadas por *sorting* para células GFP<sup>+</sup>.

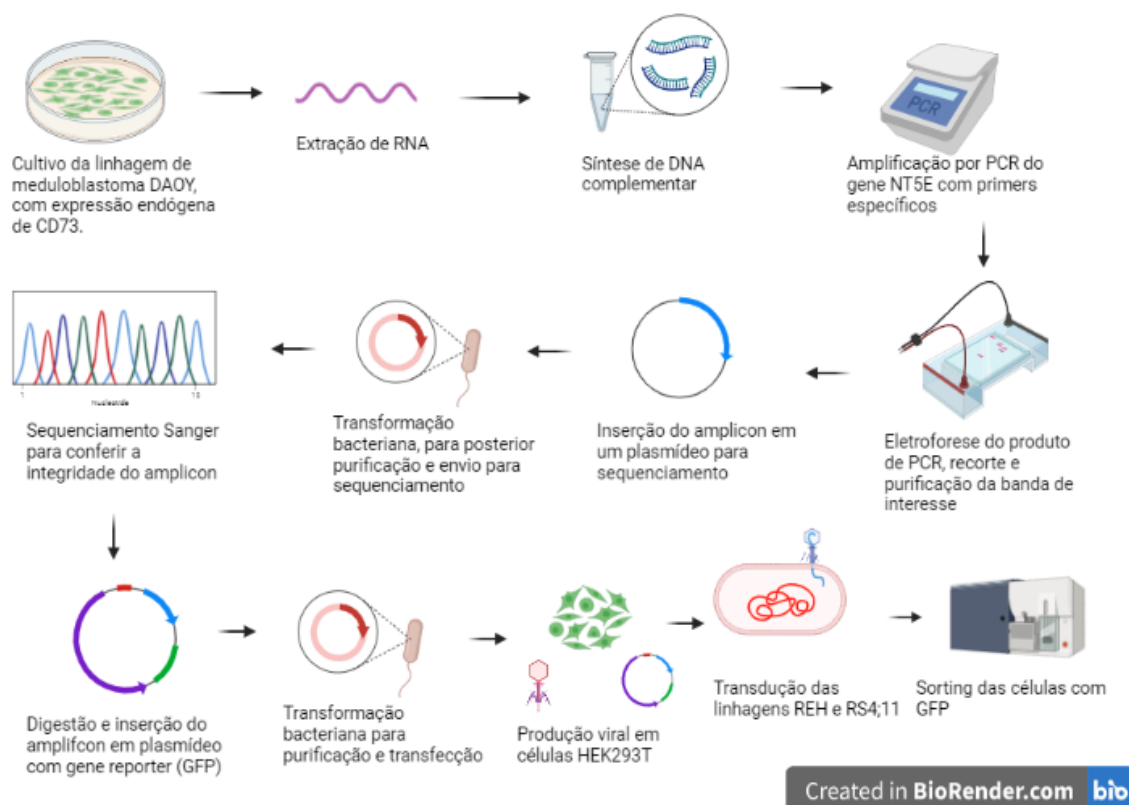


**Figura 2: plasmídeo lentiviral p#304 utilizado na clonagem do NT5E-201.** O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Xma*I e *Sal*I, liberando o fragmento correspondente ao delta LNGFr (989pb). Nesta posição foi, então, clonado o nosso gene de interesse de, aproximadamente 1830pb, originando o plasmídeo p#304.NT5E-201/GFP.

A fim de verificar se a superexpressão do CD73 confere alguma vantagem proliferativa para estas células, realizamos experimentos de proliferação *in vitro* e *in vivo*, comparando REH-GFP x REH-NT5E/GFP e RS4;11-GFP x RS4;11-NT5E/GFP (Figura 3).

Então, estas linhagens transduzidas foram inseridas em camundongos (5M de

células por camundongos, em 5 camundongos por grupo) para verificação da progressão da leucemia *in vivo*. Além disso, foi realizado um teste de proliferação *in vitro*. Pretende-se ainda realizar uma qPCR para validar a expressão diferencial deste gene *NT5E* nestas células transformadas, bem como um ensaio de funcionalidade da enzima CD73 nas linhagens.

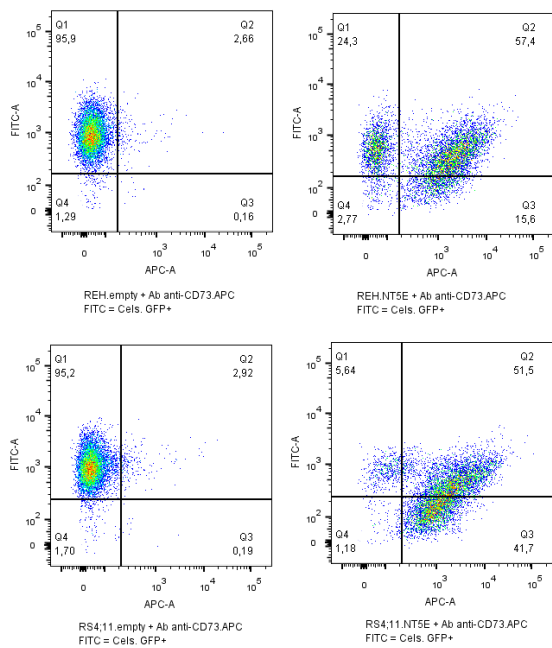


**Figura 3: Metodologia do projeto.** Na imagem, pode-se observar todos os passos realizados até então no projeto, que começa com a extração de RNA de uma linhagem a qual já é sabido que possui expressão endógena de CD73, e termina com a seleção das células GFP positivo após a transdução das linhagens com o plasmídeo p#304.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

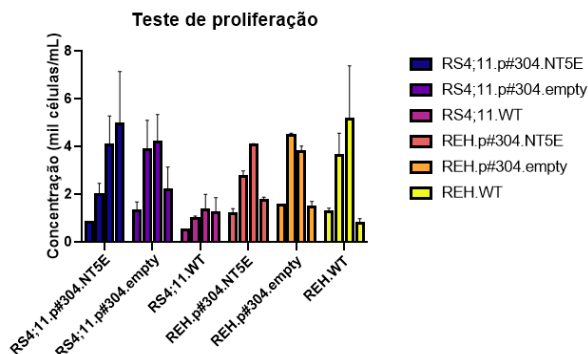
A expressão de CD73 na superfície das células foi confirmada por citometria, conforme mostra a figura 4. As células transduzidas com o plasmídeo p#304.NT5E/GFP claramente mostram a proteína CD73 na superfície celular, bem como a expressão de GFP. Enquanto que as

células transduzidas com o plasmídeo p#304.empty/GFP possuem apenas a expressão de GFP.



**Figura 4: Expressão ectópica de CD73 em linhagens leucêmicas.** As linhagens REH e RS4;11 foram transduzidas com os plasmídeos p#304.empty/GFP e p#304.NT5E/GFP, marcadas com anticorpo anti-CD73.APC (BioLegend) e avaliadas quanto à expressão de CD73 e de GFP.

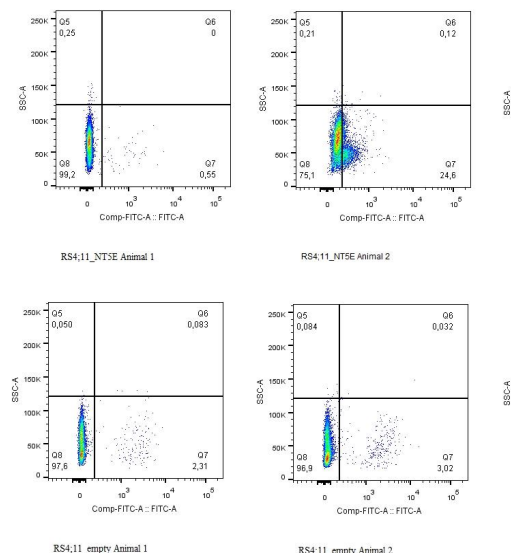
Após confirmar o sucesso na obtenção das linhagens com superexpressão do gene *NT5E*, comparamos o perfil de proliferação destas células, in vitro por 6 dias (Figura 5). As células foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro e contadas com trypan blue, em câmara de Neubauer diariamente, em triplicata.



**Figura 6: Ensaio de proliferação comparativo entre as linhagens transduzidas (in vitro).** Durante 4 dias, amostras de cada tipo celular foi contado (a cada 24h, que está representado pelas barras) em triplicata. A linhagem RS4;11 parece ser mais sensível à expressão aumentada de CD73, em relação à REH, que não

mostrou diferença significativa em relação à condição WT (selvagem) da mesma linhagem. Apesar das células RS4;11 com p#304.empty/GFP terem proliferado mais em relação à condição WT, no quarto dia (quarta barra) se observa uma diminuição no número de células, enquanto a condição RS4;11 p#304.NT5E/GFP segue aumentando. Este experimento deverá ser repetido para confirmar os dados encontrados.

Para verificar o efeito da superexpressão desta enzima in vivo, transplantamos 4 grupos (n= 5) de camundongos imunodeficientes NSG-SGM3 com 5 milhões das células REH-GFP, REH-NT5E/GFP; RS4;11-GFP e RS4;11-NT5E/GFP, e acompanhamos a progressão da leucemia no sangue periférico destes animais por citometria (células GFP<sup>+</sup>). A figura 6 mostra os primeiros resultados.



**Figura 5: Progressão da leucemia com superexpressão de CD73 em modelo animal.** Células com superexpressão ou sem expressão de CD73 foram transplantadas em camundongos NSGS por via endovenosa. Após 18 dias os animais já apresentavam sintomas da doença, porém o exame

do sangue periférico não confirmou prevalência de leucemia (baixa porcentagem de células GFP<sup>+</sup>), bem como a marcação negativa para CD73. No dia 20 apenas os animais que receberam as células RS4;11-NT5E/GFP foram mantidos vivos para seguimento da curva de sobrevivência. Os demais foram sacrificados por estarem mal, com sintomas da doença.

## CONCLUSÕES:

Os resultados *in vitro* apontam para uma vantagem proliferativa da superexpressão de CD73 na linhagem RS4;11. No entanto, essa condição de superexpressão não se reflete em maior agressividade leucêmica, *in vivo*. Considerando que a enzima CD73 ter forte relação com o sistema imunológico, na geração de adenosina, repetiremos o ensaio em modelo animal imunocompetente C3H/HePas, onde o impacto da superexpressão pode ser melhor interpretado e ajudar a completar o quadro de informações a respeito do papel desta proteína CD73 na progressão da leucemia

## BIBLIOGRAFIA

1. Bhojwani, D., Yang, J. J., Pui, C. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Clinics of North America** 62, 47-60. (2015).
2. Terwilliger, T., Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer J.** 7, e577 (2017).
3. Tasian, S.K, Loh, M.L., Hunger, S.P. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 130, 2064–2072 (2017).
4. Centoducatte, GL. Método para identificar a leucemia linfóide aguda (LLA) pediátrica do subgrupo BCR-ABL1-Like (Ph-Like). 2017. 1 recurso online (95 p.). **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia**, Campinas, SP.
5. Gao, Z.W. et al. "The Roles of CD73 in Cancer." **BioMed Research International** 2014, 1–9 (2014).
6. Antonioli, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in molecular medicine** 19, 355-367 (2013).

7. Yegutkin, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology** 49, 473-497 (2014).
8. Amendola, M., Venneri, M.A., Biffi, A., Vigna, E. & Naldini, L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. **Nat. Biotechnol.** 23, 108–116 (2005).