

Investigação das vias Hedgehog e Notch em Leucemia Mielóide Aguda e Síndromes Mielodisplásicas

UNICAMP

Amanda Inacio Dias dos Santos*, Sara Teresinha Olalla Saad *e-mail: amanda.inaciodias@gmail.com

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - HEMOCENTRO, FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, CAMPINAS, BRASIL.

AGÊNCIA FINANCIADORA: CNPq

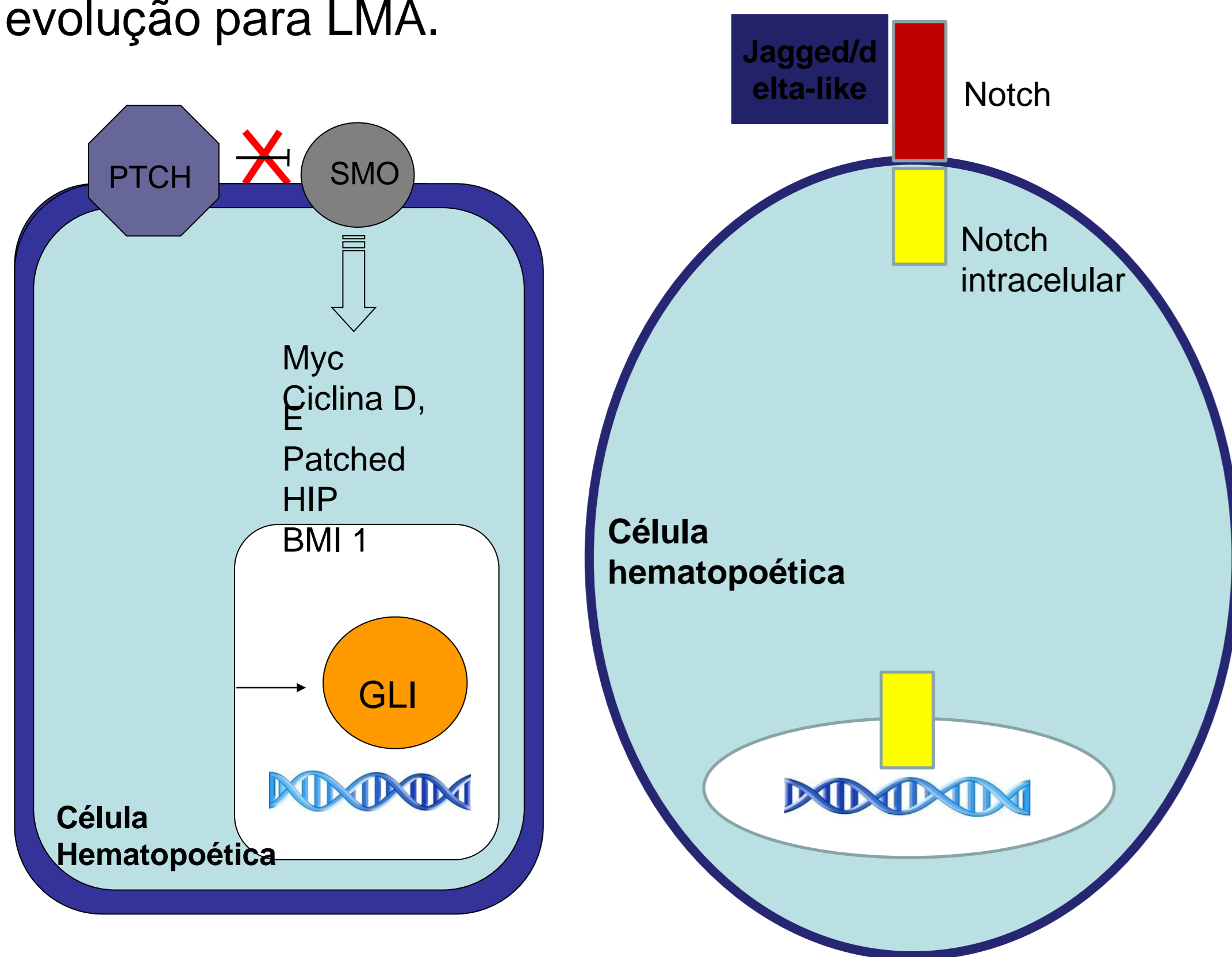
Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Palavras-chave: Hedgehog – Notch - Leucemia mielóide aguda – Síndromes Mielodisplásicas

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas (LA) são caracterizadas pela presença de células muito imaturas (blastos) e por evolução rapidamente fatal em pacientes não tratados. A leucemia mielóide aguda (LMA) se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocasionando produção insuficiente de células normais e conseqüente substituição do tecido normal.

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são doenças hematológicas clonais com apresentação heterogênea que resultam em insuficiência medular progressiva e evolução para LMA.



A via de sinalização Hedgehog, que já foi observada na forma hiperativa em variados tipos de cânceres, é associada à entrada das células no ciclo celular, à inibição de apoptose, ao balanço entre auto-renovação e diferenciação de células-tronco em vários tecidos e à modulação da polaridade de tecidos.

Em mamíferos, a família de genes Notch codifica quatro receptores (Notch1-4), sendo que todos são importantes para as decisões do destino celular. A Notch é uma das principais vias que medeiam o contato direto célula-célula.

Várias funções celulares e situações micro ambientais associadas à tumorigênese são moduladas pela via de sinalização Notch, incluindo proliferação, apoptose e adesão.

METODOLOGIA

Imunohistoquímica - após a recuperação antigênica, os anticorpos (anti- c-kit, anti-osteopontina, anti-Vascular Endothelium e anti-VE Cadherin) foram diluídos nas concentrações 1:50/ 1:100/ 1:150/ 1:200 / 1:500 e 1:1000 e incubados overnight a 4°C. Os cortes foram lavados com TBST antes e depois da marcação com anticorpos secundários. Além disso, foram lavados com tampão de acetato equilibrado. O corante ELF97 TRAcP foi diluído em tampão de acetato em 1:1000 e os cortes foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

Também foram utilizados os anticorpos para identificação dos ligantes da via Hedgehog (Anti-Ihh, Anti-Dhh e Anti-lhh). Na continuação do projeto testaremos os anticorpos da via Notch.

RT-PCR - as amplificações foram realizadas utilizando as seguintes sequências de primer: DHH forward primer: 5'- TGGAGCCGACCGCCTGATGA - 3'; DHH reverse primer: 5' - CGTCCTCGTCCCAGCCCTCA - 3'; GLI 1 forward primer: 5' - CAGCCCCAACTCCACAGG - 3'; GLI1 reverse primer: 5' - CTGCAGCCATCCCAACGG - 3'; GLI 2 forward primer: 5' - CCATTCCATGCGCCCTACCG - 3'; GLI 2 reverse primer: 5' - GAGATGACAGGGCTGCCGCT - 3'; SMO forward primer: 5' - GCCTGACTTCTGCGCTGCA - 3'; SMO reverse primer: 5' - AGGGCACTTCGCACTGGC - 3'; IHH forward primer: 5' - CGAGGAGAACACAGGCGG- 3'; IHH reverse primer: 5' - TGAGTGGTGGCCGTCCTCGT - 3'; SHH forward primer: 5' - ACCGCGACCGCAGCAAGTAC - 3'; SHH reverse primer: 5' - : CGATTTGGCCGCCACCGAGT - 3'; PTCH forward primer: 5' - TCAGTGTCATCCGCGTGGCC - 3'; PTCH reverse primer: 5' - GCAACCAGCAGGACGCCAG. Os primers foram desenhados no programa Primer - BLAST e foram, posteriormente, analisados no Software Gene Runner 3.05.

OBJETIVOS

Estudar as vias Hedgehog e Notch em biópsias de medula óssea de SMD e LMA tendo em vista as interações com o nicho, principalmente no que diz respeito ao balanço entre a auto-renovação e diferenciação. Além disso, estudaremos os padrões de expressão da via Hedgehog em medula óssea normal, com SMD e com LMA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação de células positivas para c-kit entre medula normal, com SMD e LMA revelou uma tendência no aumento do número de células positivas em medula com LMA. No entanto, a análise estatística através do Teste de Wilcoxon Pareado não revelou diferença significativa.

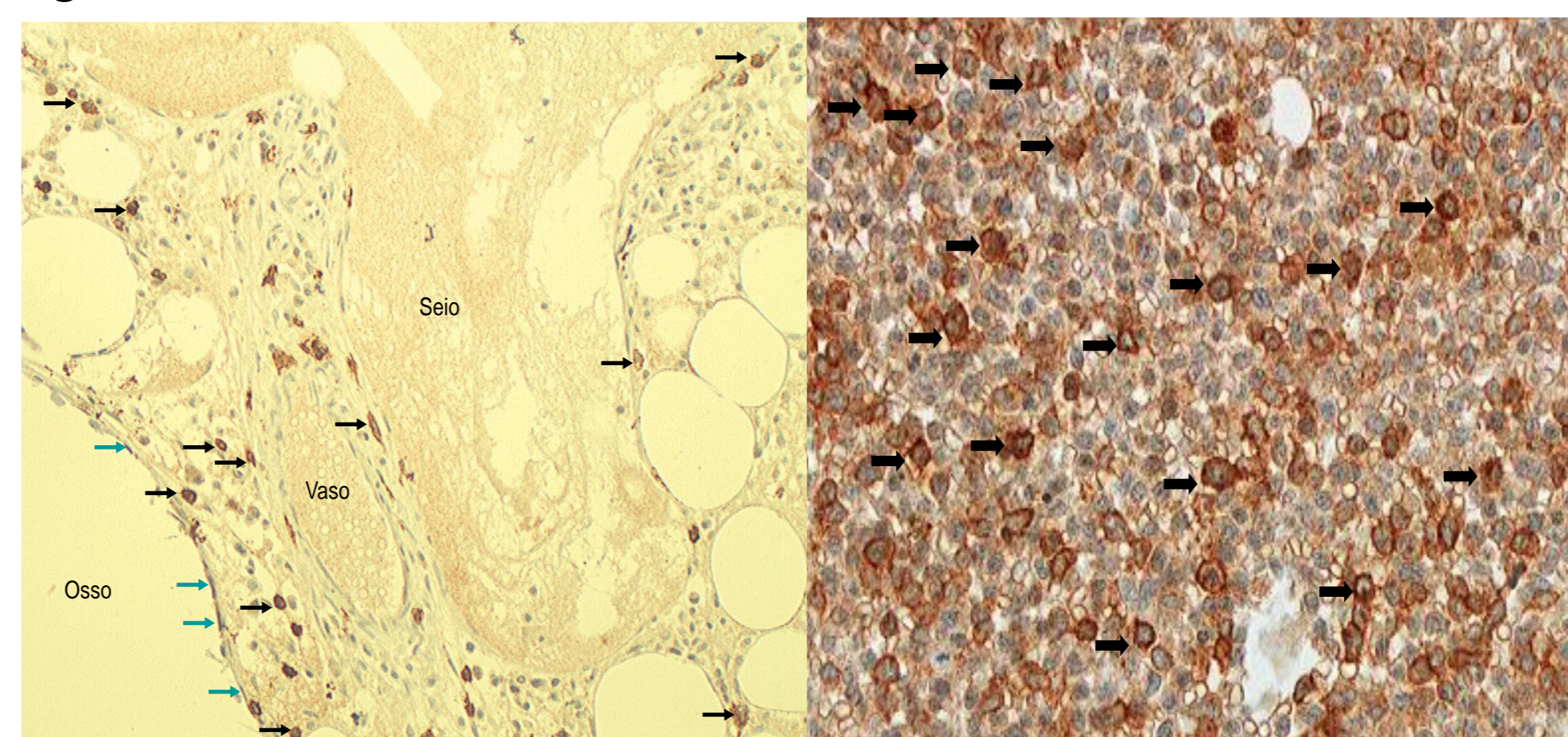


Figura 1: Corte de medula óssea com SMD incubada com c-Kit. A figura mostra uma alta concentração de células precursoras próximas ao osso e aos vasos. O osso foi identificado pela presença de osteoblastos. As setas pretas indicam células precursoras e as setas azuis indicam osteoblastos.

Figura 2: corte de medula óssea de paciente com LMA incubada com c-Kit. A figura mostra células precursoras indicadas por setas pretas.

No entanto, a análise estatística através do Teste de Wilcoxon Pareado não revelou diferença significativa. Acreditamos que, com o aumento do número de lâminas analisadas, a diferença na expressão de c-kit entre LMA e controle se mostre significativa, já que, pela contagem de células positivas, existe um aumento da marcação do anticorpo em medulas com LMA.

Quanto aos resultados do RT-PCR, as menores concentrações dos primers capazes de amplificar adequadamente foram as seguintes: 600 µM para Desert hedgehog (DHH), GLI2 e Patched 1 (PTCH); 300 µM para Smoothed (SMO); e 150 µM para GLI 1, HPRT e BACT.

As primeiras placas de RT-PCR realizadas revelaram a expressão de GLI1, GLI 2, DHH, PTCH e SMO em todas as amostras de pacientes com SMD, como mostrado nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7.

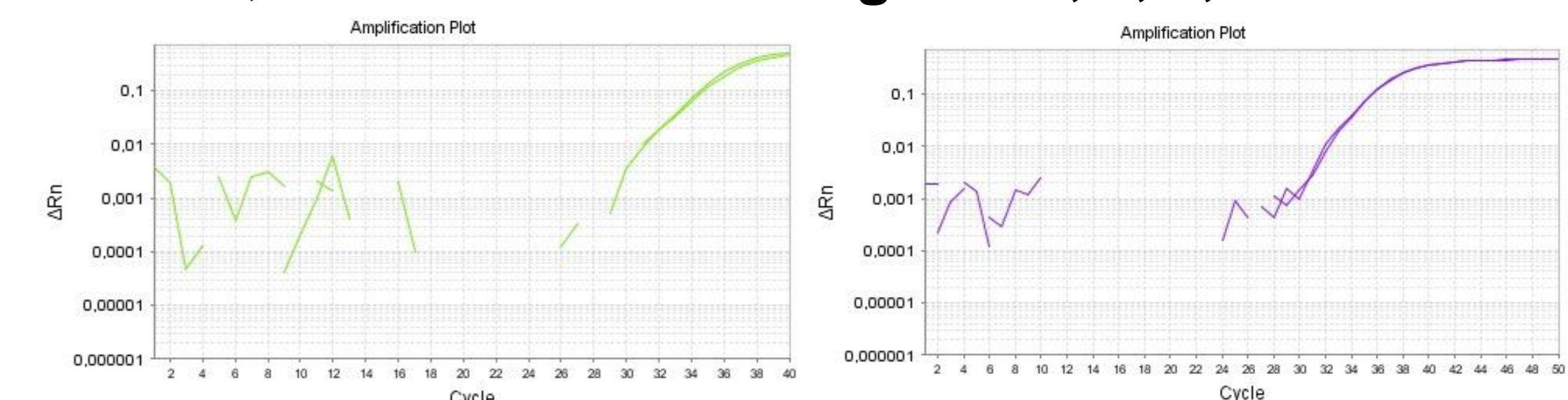


Figura 3: expressão de GLI 1

Figura 4: expressão de GLI 2

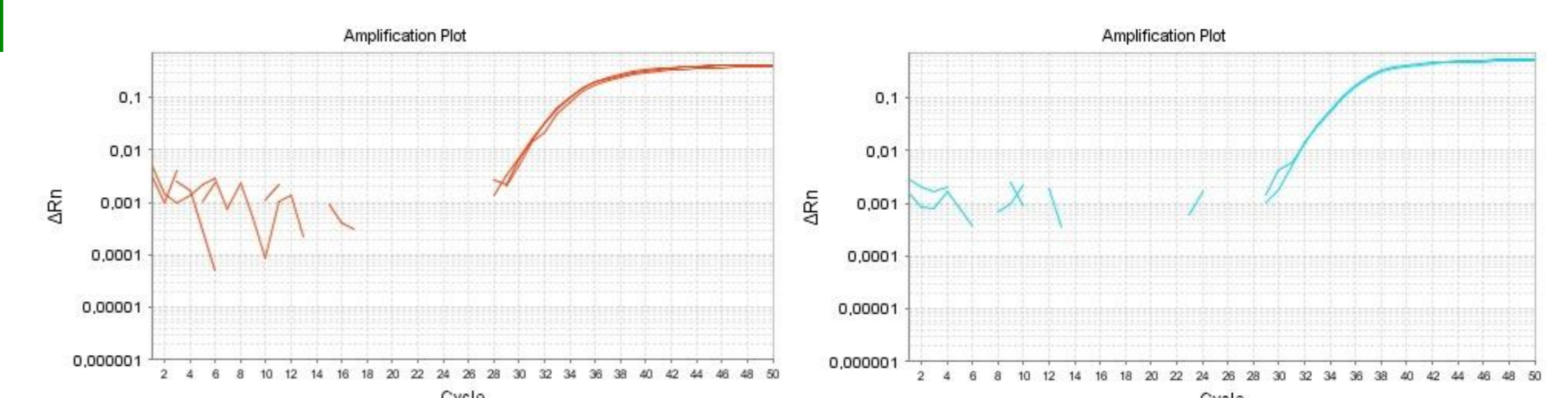


Figura 5: expressão de PTCH

Figura 6: expressão de SMO

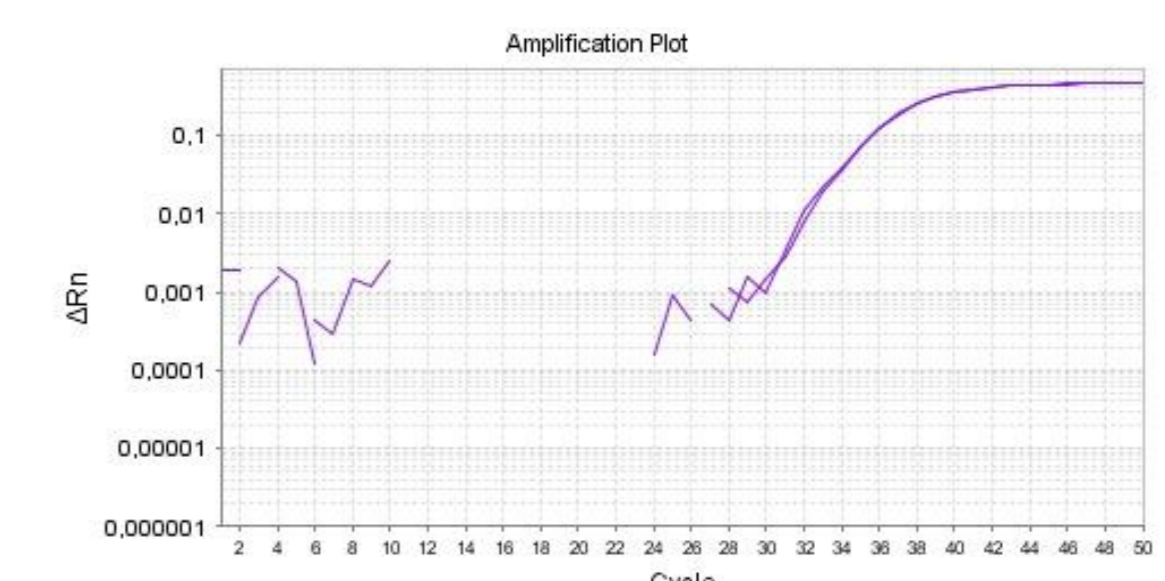


Figura 7: expressão de DHH

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na imunohistoquímica revelam uma tendência no aumento de c-kit em medula óssea de pacientes com SMD e LMA, se comparados com controle (anemia megaloblástica), estando de acordo com os resultados publicados em estudos prévios. Acreditamos que a diferença não se mostrou significativa pelo pequeno número de amostras, e, portanto, pretendemos aumentar o número de amostras para analisar se a diferença na expressão de c-kit de mostra significativa. Os primeiros resultados do RT-PCR revelaram expressão dos componentes da via Hedgehog e agora pretendemos estabelecer as relações entre as diferenças na expressão da via em medula de pacientes com SMD, LMA e controle.