

Papel da via Wnt/beta-catenina na sinalização por BCR em células B-1 *in vitro*

Osugui, Lika & Popi, Ana Flavia

Abstract: Wnt proteins are a family of highly conserved glycoproteins, encoded by 19 different genes, highly conserved among species, and play an important role in a variety of biological processes, such as proliferation of progenitor cells, establishment of the dorsal axis, and specification of cell fate. Several works demonstrated that Wnt/beta-catenin signaling is related with lymphocyte survival and proliferation and for this reason its dysregulation could be tumorigenic. High levels of beta-catenin/Tcf were described as tumor promoter in human, and cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) present elevated Wnt expression. B-1 cells have gained particular attention, since they are associated with human and murine lymphoma and leukemia, specially the B-1a subtype, due to CD5 expression and restricted BCR (B cell receptor) repertoire. After stimulation, BCR signaling activates pathways, like Akt, Erk and NF- κ B, that enhances cell survival and proliferation of CLL cells. Taking together, B-1 cells presented an interesting model to study the Wnt influence at the BCR response after anti-IgM stimulus. Our group already demonstrated that B-1 cells are responsive to Wnt3a treatment by promoting their proliferation. The clarification of the relationship of these two signaling pathways could bring some elucidation about the malignant transformation and future therapies.

INTRODUÇÃO: Wnt consiste de uma família de glicoproteínas secretadas, codificadas por 19 diferentes genes, altamente conservados entre diversas espécies e destacam-se pelo papel fundamental que exercem em diversos processos biológicos, envolvendo desde estabelecimento do eixo dorsal, proliferação celular a especificação de linhagem celular. Devido à sinalização via Wnt/beta-catenina ser importante para sobrevivência e expansão de linfócitos, tem sido sugerido que a desregulação desta via possa ser um mecanismo para desenvolvimento de leucemias. A associação do aumento da ativação da sinalização beta-catenina/Tcf já foi descrita como

promotor de alguns tumores em humanos. Células B de pacientes com CLL (leucemia linfocítica crônica) expressam níveis mais elevados de Wnt. A localização nuclear de β -catenina e o aumento dos genes alvo de Wnt, principalmente TCF1 e LEF1 em células de leucemia linfocítica aguda (LLA) corroboram esta hipótese. Células B-1, principalmente o subtipo B-1a, são associadas com linfomas e leucemias de células B murinas e humanas, devido à expressão de CD5 e a utilização de um repertório restrito de BCRs (receptores de células B). A sinalização via BCR é essencial na proliferação e sobrevivência de células de CLL, ativando múltiplas vias de sobrevivência, como a Akt, Erk e NF- κ B. A estimulação *in vitro* do BCR de células de CLL com anti-IgM induz a ativação de JAK2, causando a fosforilação de STAT3, ativando fatores de transcrição anti-apoptóticos. Em pacientes com CLL, foi demonstrado que quinases SYK e PI3K encontram-se constitutivamente ativadas. Neste contexto, as células B-1 representam um bom modelo de estudo sobre a associação da via e a transformação maligna de tumores. Nosso grupo demonstrou a presença de receptores e outros componentes da via nas células B-1. Além disso, o tratamento com Wnt3a recombinante aumenta a proliferação de células B-1 *in vitro*. Desta forma, o estudo das inter-relações das vias Wnt e BCR possibilitará compreender os processos envolvidos no surgimento da CLL e em futuras terapias.

OBJETIVO:

Este trabalho tem como objetivo avaliar se o estímulo com Wnt3a recombinante após a ativação do BCR de células B-1 com anti-IgM é capaz de ocasionar a mesma cascata de sinalização observada em células leucêmicas, acarretando na expressão de fatores que aumentam a sobrevivência e a proliferação destas células.

METODOLOGIA

Células B-1 serão obtidas a partir de lavado da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 fêmeas e negativamente selecionadas por cell sorting, evitando assim a ativação do BCR. Após serem recolhidas, as células serão marcadas inicialmente com anticorpo anti-CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) e, em seguida, com anticorpos monoclonais de rato anti-camundongo para CD23 conjugado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e CD3 (145-2C11), CD11c (HL3), CD117 (2B8), F4/80 (BM8), NK1.1 (PK136), Ter119 (TER-119), conjugados a alofocianina (APC) e Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) biotinizado, para exclusão de células B convencionais (B-2), células T, células dendríticas, progenitores hematopoiéticos, macrófagos,

células NK, células eritróides e monócitos, respectivamente. Após o período de incubação, as células serão marcadas com streptoavidina conjugada a APC. Como estratégia de sorting, após a seleção da população de linfócitos e exclusão de doublets, a população duplamente negativa para FITC e APC será separada. A porcentagem de células B-1 (CD19+CD23-IgMhighCD5+/-) será avaliada após cada separação, por citometria de fluxo. As células purificadas serão co-cultivadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células B-1 sobre células OP9 (ATCC® CRL-2749™) e estimuladas ou não, com 100 ng de Wnt3a recombinante (R&D Systems) e/ou 10 µg/mL de F(ab')₂ anti-IgM purificada (eBioscience). Após 72 horas, serão avaliadas por FACS as populações de células mortas ou em apoptose em cada grupo (controle, Wnt3a, anti-IgM, Wnt3a+anti-IgM) utilizando o PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Do gate de células vivas (Annexin V-/7-AAD-) será avaliada a proliferação de B-1, marcadas previamente com BD Horizon™ Violet Proliferation Dye e450.

Utilizando o mesmo protocolo de purificação, co-cultura e estímulo, a cascata de sinalização do BCR será avaliada utilizando BD™ Phosflow para os seguintes marcadores: Akt (pS473), ERK1/2 (pT202/pY204), Btk (pY223)/Itk (pY180), Syk (pY348), Zap-70 (pY319)/Syk (pY352), PLC-γ1, PLC-γ2 e PKCα.

A separação de células B-1 será realizada no equipamento FACSAria™ II e todas as aquisições serão realizadas no FACSCanto™ II. Os dados serão posteriormente analisados no software FlowJo v.9.7.5 e a análise estatística no software GraphPad Prism 5.

O concurso BD Biosciences Pesquisador SBI visa o reconhecimento e apoio aos pesquisadores que promovem o constante avanço científico através do incentivo à técnica de Citometria de Fluxo com Múltipla Marcação no Brasil.

Saiba mais em bdbiosciences.com/br/pesquisador