

Thais N. Faria; Debora C. Cajazeiro; Ronei L. Mamoni; Taize M. Augusto*.

Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células (LBMCC), Departamento de Clínica Médica*
Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ)

INTRODUÇÃO

Investigações sobre o câncer de próstata, em modelos experimentais *in vitro*, utilizam diversas linhagens celulares derivadas de câncer de próstata humano como é o caso da linhagem PC3 (derivada de metástase em osso). Entre outras células do tecido conjuntivo atuando em cooperação com as células tumorais, destacamos os macrófagos M1 (**Figura 1**), promovendo respostas antitumorais, e M2, relacionado com a progressão do tumor (Gun et al., 2019). Densos infiltrados dos macrófagos associados a tumor são observados no câncer de próstata, tendo como componente significativo o fenótipo M2 (Chanmee et al., 2014). Estudos inserem a molécula HPSE1 relacionada a polarização desses macrófagos, tanto para o fenótipo pró-inflamatório quanto pró-tumorigênico (Goldberg et. al., 2013). A HPSE1 é uma endo- β -D-glicuronidase que tem a capacidade de clivar as cadeias de heparan sulfato presentes em alguns proteoglicanos, assim liberando várias outras moléculas na matriz extracelular (Vlodavsky et al., 2016). Quando superexpressa no tumor, ela pode iniciar ou aumentar processos relacionados ao desenvolvimento tumoral, atuando nos processos de metástase, proliferação de células tumorais e neovascularização (Rivara et al., 2016).

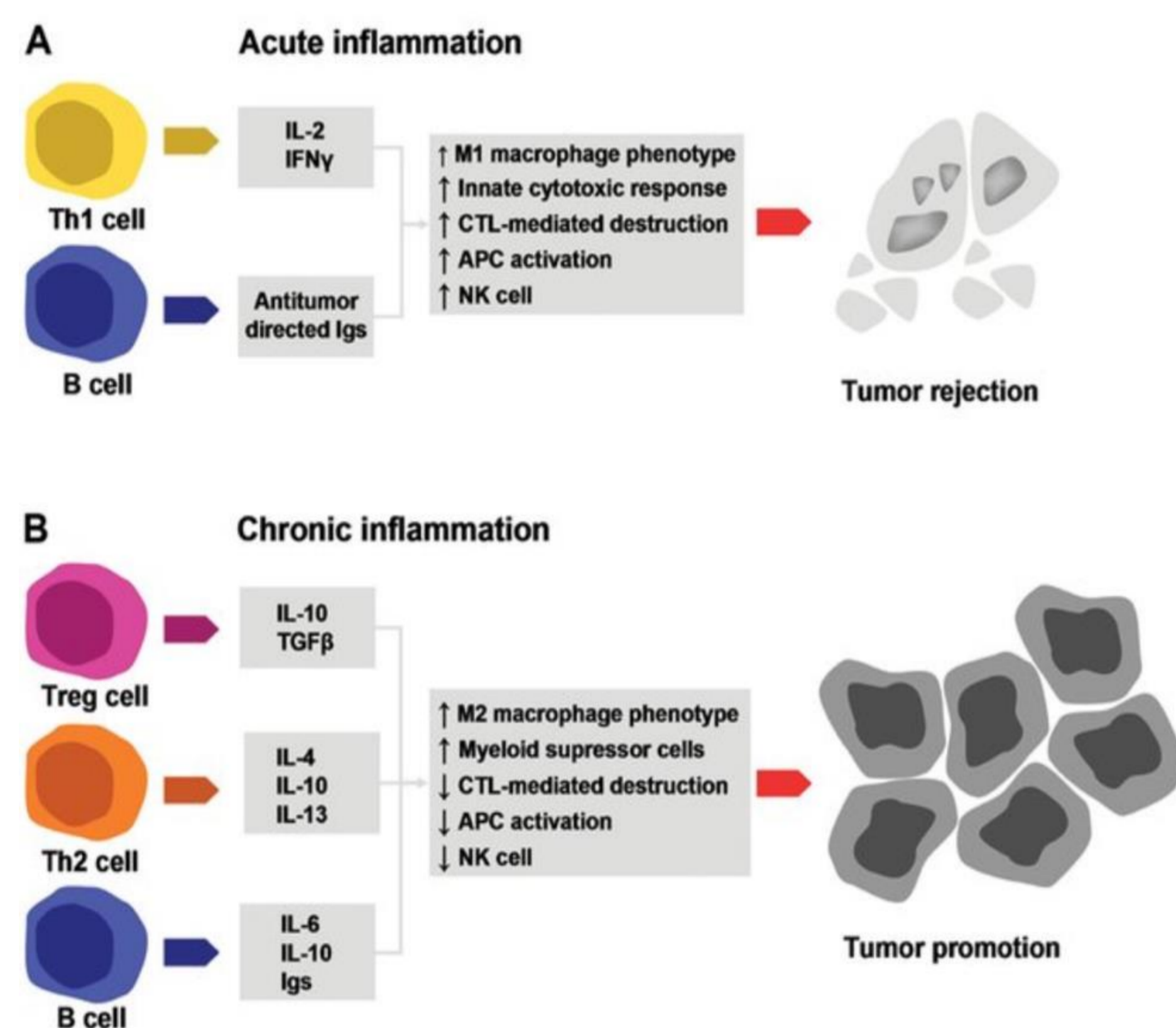


Figura 1: (A) linfócitos T e B secretam fatores que induzem o fenótipo de macrófago M1, (B) linfócitos T e B secretam fatores que induzem o fenótipo M2. (Retirado de Neagu et. al., 2016)

OBJETIVO

Analisar a diferenciação fenotípica e polarização *in vitro* de monócitos humanos (THP-1) em macrófagos na presença de HPSE1 presente no meio condicionado da cultura de células PC3 e de sublinhagem de PC3 com inibição estável HPSE1 (PC3shHPSE).

METODOLOGIA

Foram colocadas em cultura as células PC3 (**Figura 2**) e PC3shHPSE1 em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (10.000 U/mL de penicilina e 10mg/mL de gentamicina) e 25 mM de HEPES, incubadas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO². Após 70% de confluência o meio foi trocado por meio sem soro fetal bovino e a cultura foi mantida por 48h adicionais e assim o meio condicionado foi coletado e armazenado à -20°C.

As células THP-1 foram colocadas em cultura em meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, L-glutamina, piruvato de sódio e gentamicina a 0,5x10⁶ células/mL (**Figura 3**) e serão mantida em cultura até a obtenção do número adequado de células para realização dos experimentos.

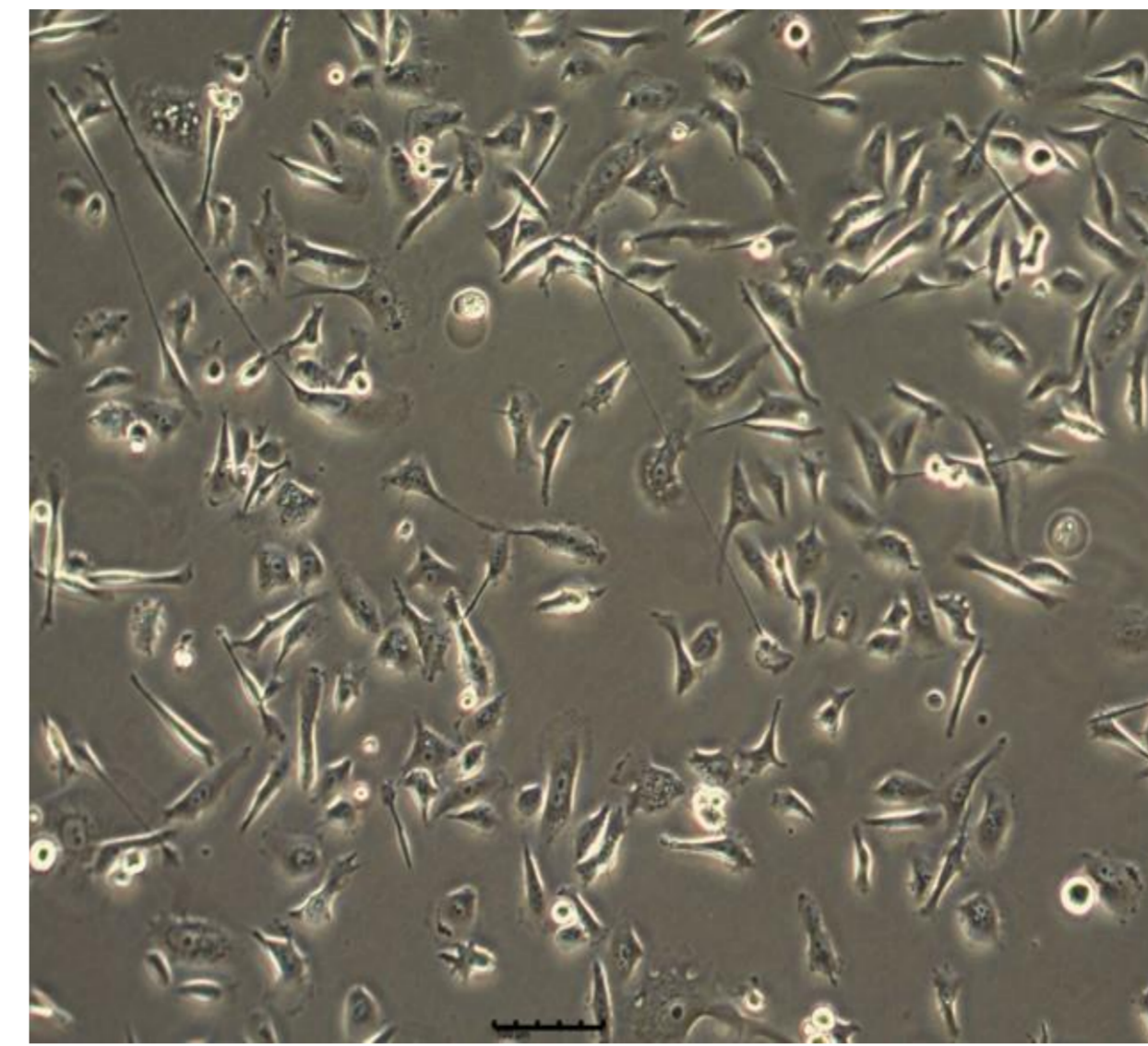


Figura 2: Células PC3 meio de cultura RPMI 1640

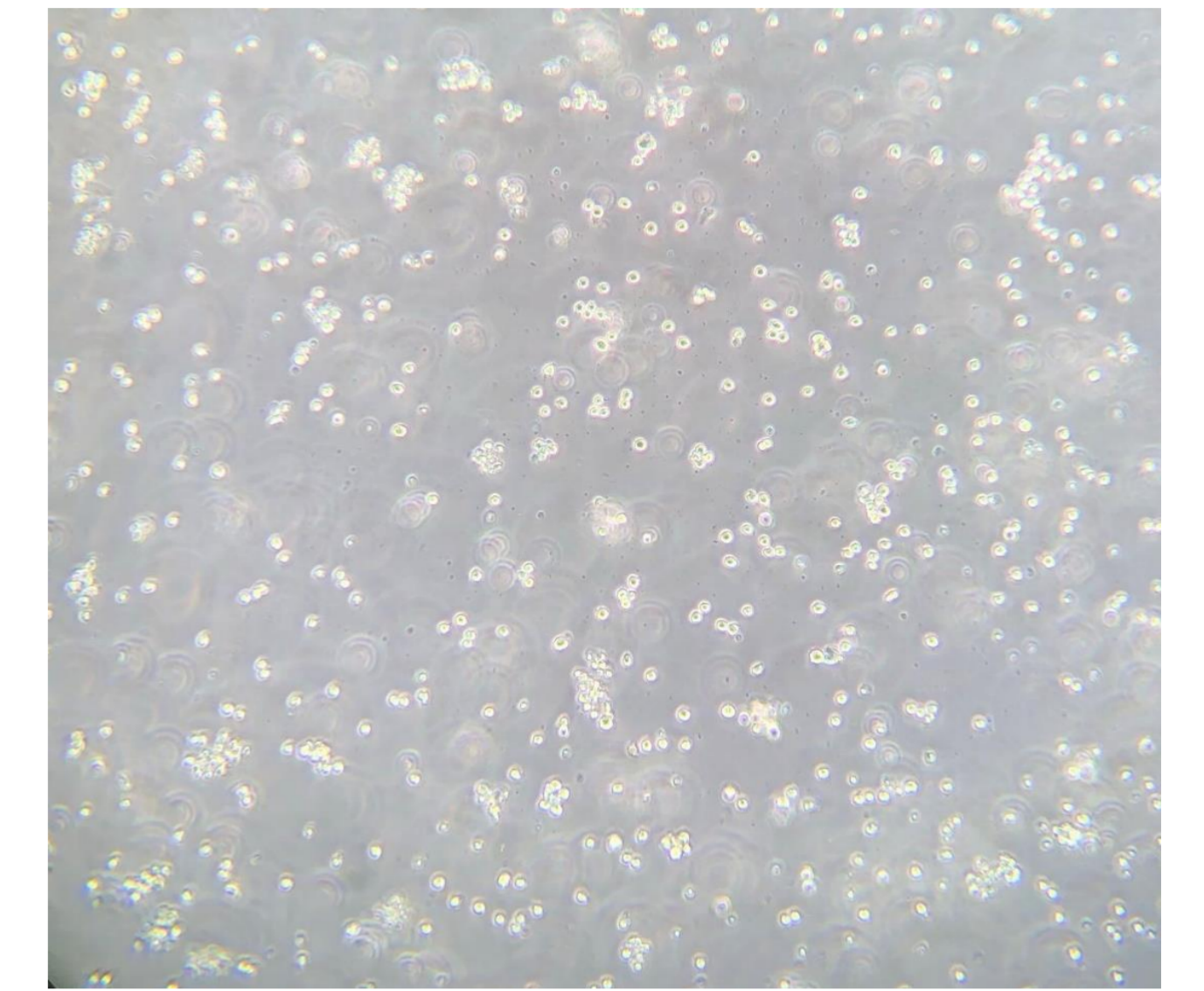


Figura 3: Células THP-1 em 48 horas de estufa a 37°C e 5% de CO² após descongelamento, mantidas em meio RPMI 164

Nas próximas etapas do estudo será realizada a diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos com estímulo de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Após este período essas células colocadas em contato com o meio condicionado pelas células PC3 e PC3shHPSE1. Em seguida, será verificada a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) através do ensaio de ELISA, para analisar o fenótipo para qual os macrófagos de diferenciaram, e de *atividade de peroxidase*, para avaliar os efeitos da HPSE-1. Também será verificado por *microscopia de luz* o fenótipo dos macrófagos diferenciados, assim como a expressão de marcadores celulares das populações de macrófagos diferenciados (CD206 (PE-Cy7), anti-CD163 (PercP) e anti-HLADR (MHC II)(PE-Cy7)), a partir da linhagem THP-1 em M1 e/ou M2 pela presença de HPSE1 por *citometria de fluxo*.

RESULTADOS ESPERADOS

Estudos evidenciam uma forte correlação entre a expressão da HPSE-1 no microambiente tumoral e a presença de macrófagos tipo M2, principalmente durante o processo de progressão tumoral. Neste estudo esperamos encontrar esta correlação mais íntima, como a direta participação da HPSE1 nesta modulação fenotípica e fisiológica dos macrófagos associados ao tumor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo encontra-se em fase de padronização da diferenciação dos monócitos humanos THP-1 em macrófagos e da coleta de meio condicionado pelas células tumorais prostáticas. Não podemos exibir quaisquer resultados neste momento por se tratar de um estudo em fase inicial.

REFERÊNCIAS

- Gun SY, Lee SWL, Sieow JL, Wong SC. Targeting immune cells for cancer therapy. *Redox Biology*. 2019 (in press)
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K. and Itano, N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2014;6:1670-1690.
- Goldberg, R., Meirovitz, A., Hirshoren, N., Bulvik, R., Binder, A., Rubinstein, A., & Elkin, M. (2013). *Versatile role of heparanase in inflammation. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.02.008>
- Vlodavsky I, Singh P, Boyango I, Gutter-Kapon L, Elkin M, Sanderson R et al. Heparanase: From basic research to therapeutic applications in cancer and inflammation. *Drug Resistance Updates*. 2016;29:54-75.
- Rivara S, Milazzo F, Giannini G. Heparanase: a rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases. *Future Medicinal Chemistry*. 2016;8(6):647-680.
- Neagu, M., Caruntu, C., Constantin, C., Boda, D., Zurac, S., A Spandidos, D., & Tsatsakis, A. (2016). *Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). Oncology reports* (Vol. 35). <https://doi.org/10.3892/or.2016.4683>