

Universidade Federal do ABC

Edital 04/2022 - PIC/PIBIC/PIBITI/PIBIC-AF

Projeto de Pesquisa

Padronização de modelo celular para estudo de neuropatologias

Resumo

A doença de Alzheimer é a patologia mais comum quando se trata de demência neurodegenerativa, observada com maior frequência em pessoas de idade. Embora descrita há mais de um século até hoje ainda não existe cura ou tratamento eficaz. Para melhor entendimento dos processos celulares e moleculares envolvidos na morte celular na doença de Alzheimer, o uso de modelos e culturas de linhagem celular são de crucial importância. Neste projeto, iremos expandir células da linhagem SH-SY5Y (derivadas de neuroblastoma humano) indiferenciadas, e padronizar protocolo de diferenciação celular, com o objetivo de fornecer ao aluno treinamento adequado em técnicas de cultura celular e embasamento teórico-prático para realização de estudos futuros utilizando cultura celular.

Introdução

O encéfalo é um dos órgãos mais complexos que temos, e que garante não só a regulação precisa para o funcionamento de órgãos vitais, através de suas funções neurovegetativas, como também a percepção e interação com o ambiente que nos cerca, bem como formação de memórias, aprendizados e emoções. O tecido encefálico é formado, além dos neurônios, por uma células da glia que incluem oligodendrócitos, microglia, astrócitos. As células da glia atuam em uma diversidade de funções como mielinização dos neurônios, sustentação e suporte, nutrição, modulação sináptica, resposta inflamatória, remoção de debris, dentre outras funções, todas com o intuito de garantir o funcionamento neuronal saudável para adequado controle das vias neurovegetativas e cognitivas (Jäkel & Dimou, 2017)

As patologias do sistema nervoso podem estar relacionadas a perda ou mau-funcionamento de um ou mais tipos celulares. As doenças neurodegenerativas tem como consequência a degeneração progressiva e/ou morte dos neurônios, resultando assim em problemas de movimento (ataxias) ou de função mental (demências). A doença de Alzheimer (DA), por exemplo, é a causa mais comum de demência – um declínio contínuo no pensamento, nas habilidades comportamentais e sociais que afeta a capacidade de uma pessoa funcionar de forma independente. Histopatologicamente, a DA tem como característica, a o acúmulo por um longo período de tempo de agregados proteicos extracelulares (Beta amiloide - A β) e intracelulares (proteína Tau hiperfosforilada). Os acumulados de A β interferem nas sinapses, enquanto os agregados de proteína Tau podem bloquear o transporte de nutrientes e outras moléculas essenciais para o neurônio. A DA é marcada pela perda neuronal e sináptica e por uma série de processos neurotóxicos incluindo estresse oxidativo e inflamação, falhas na

função sináptica, esgotamento de neurotransmissores e eventualmente morte celular neuronal (Breijyeh & Karaman, 2020). Embora a morte neuronal seja a consequência final, sabemos hoje que as células da glia e endotélio vascular também apresentam alterações que colaboram para o desenvolvimento da patologia (De Strooper & Karran, 2016).

Entender a biologia molecular de um tecido complexo como o encéfalo é um desafio, e para isso, precisamos contar com modelos experimentais adequados, dependendo do tipo de abordagem que se quer estudar. O cultivo celular, por exemplo, é uma das ferramentas mais utilizadas em biologia celular e molecular, fornecendo assim modelos para estudo da fisiologia normal celular, mas também das respostas celulares à estímulos específicos, permitindo também estudar diferentes patologias. O uso de cultivo celular traz uma série de vantagens que inclui o controle e reprodutibilidade dos ensaios, homogeneidade da amostra e redução do uso de animais de experimentação em pesquisas biológicas. Além disso, o cultivo celular permite manipulações genéticas como knock-in, knock-out, CRISPR, super-expressão de proteínas específicas, dentre outros, fornecendo assim um amplo espectro de oportunidades de estudo de vias celulares específicas.

Células SH-SY5Y

O cultivo celular para ensaios biomoleculares pode ser realizados tanto a partir de células removidas diretamente do tecido e desagregadas por meios enzimáticos ou mecânicos (cultura primária), ou podem ser derivadas de uma linhagem celular específica (cultura de linhagem). As células de linhagem são derivadas de culturas primárias ou de linhagens celulares que podem se dividir indefinidamente, devido a um processo conhecido como

imortalização, que pode ocorrer de maneira espontânea ou induzida, por exemplo, ao deletar os genes que promovem a morte celular ou senescência. Esse tipo de cultura celular possui menor variação dos resultados, por se tratar de uma cultura de células mais homogênea que a cultura primária, e assim oferece maior reprodutibilidade. A disponibilidade de células, em teoria, é ilimitada pois pode-se manter as células em crescimento celular constante, sendo possível cultivar um grande número de células. Como desvantagem, as células podem não possuir as características iniciais devido ao processo de imortalização ou depois de várias passagens, podem sofrer alterações genéticas e/ou morfológicas. No entanto, os estudos com cultura celular de linhagem têm demonstrado resultados muito importantes para o entendimento dos processos celulares (Moraes et al, 2007).

A linhagem SH-SY5Y é amplamente utilizada em modelos para estudo da DA, tanto àqueles destinados a entender o efeito dos agregados de A β (Ooi et al, 2022, Wiatrak et al, 2022, Arslan et al, 2021, doi: Gregori et al, 2017) quanto àqueles com objetivo de observar fosforilação e agregados da proteína tau (Gu et al, 2022, Lima et al, 2022, doi: De Oliveira et al, 2016. De Paula et al, 2016, Carrettiero et al, 2022, Carrettiero et al, 2009).

Essas células são do tipo neuroblastoma, derivadas do neuroblastoma parental SK-N-SH, cuja célula parental foi gerado em 1970 a partir de uma biópsia de medula óssea (Ross et al, 1983). Essas células são amplamente utilizadas já que possui propriedades neurais tais como núcleo pequeno e redondo, corpos celulares, citoplasma escasso, sistemas citoplasmáticos como neuritos (Ross et al, 1983) e naturalmente alta expressão da proteína tau (Hellstrom-Lindahl et al, 2000). As células SH-SY5Y podem ser diferenciadas a partir do estado de neuroblastos em neurônios humanos maduros através de uma variedade de protocolos, que

podem incluir o uso de privação de soro, ácido retinóico, ésteres do forbol, e neurotrofinas específicas, tais como factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Shipley et al, 2016, Christensen et al, 2011, Gimenez-Cassina et al, 2006, Encinas et al, 2000). No estado diferenciado, os marcadores neuronais se intensificam, além de apresentar diversas proteínas e outras características neuronais, se assemelhando a culturas primárias com a vantagem de serem de origem humana (Encinas et al, 2000).

No presente projeto iremos expandir células da linhagem SH-SY5Y indiferenciadas, e padronizar protocolo de diferenciação celular, com o objetivo de fornecer ao aluno treinamento adequado em técnicas de cultura células e embasamento teórico-prático para realização de estudos futuros utilizando cultura celular.

Objetivos

- Expandir células da linhagem SH-SY5Y
- Promover diferenciação da linhagem SH-SY5Y em neurônios
- Realizar a caracterização das células diferenciadas e indiferenciadas

Materiais e Métodos

Expansão e congelamento de células SH-SY5Y não diferenciadas.

As células da linhagem Sh-SY5Y (ATCC, CRL-2266) crescerão em uma mistura 1:1 de meio de crescimento essencial Eagle e meio F12 contendo soro fetal bovino (15%), glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml) e estreptomicina (50 µg/ml) em uma estufa de CO₂ 5%, 95% ar a 37°C.

As células serão expandidas e repicadas por 5-6 passagens, e alíquotas de células serão congeladas para estoque e uso futuro

Protocolo de congelamento

Para o congelamento das células, estas serão tripsinizadas, centrifugadas (300G, 5 min) e o sobrenadante será descartado. As células serão ressuspensas em meio completo contendo 10% de DMSO e aliqüotadas em tubos de congelamento. As células serão colocadas em frasco de isopentano para congelamento e mantidas freezer -80C por 24h. Após este período os tubos serão transferidos para tanque de nitrogênio líquido para armazenamento

Protocolo de diferenciação celular

As células serão plaqueadas em placas de 12 poços numa densidade de 1×10^6 células/ml. Dois dias após o plaqueamento, as células serão tratadas com ácido retinóico (10 μ M). O tratamento se repetirá diariamente por 5 dias até que as células se diferenciem completamente em células neuronais. Somente células entre as passagens P6 e P20 serão utilizadas.

Caracterização das células diferenciadas e não diferenciadas

As células não diferenciadas e diferenciadas serão caracterizadas morfologicamente utilizando microscopia de contraste de fase. As células não diferenciadas devem possuir corpos celulares maiores e achatados, espera-se que as células diferenciadas apresentem redes neuríticas vastas e ramificadas com corpos celulares pequenos e arredondados. A quantificação

da proporção de células exibindo neuritos, bem como o número de projeções de cada célula será quantificada em células diferenciadas e não diferenciadas.

Cronograma de Execução

O projeto será realizado em 12 meses de acordo com o seguinte calendário

	1 trimestre	2 trimestre	3 trimestre	4 trimestre
Revisão de literatura e treinamentos básicos em laboratório úmido	•	•		
Expansão de células SH-SY5Y		•	•	
Diferenciação de células SH-SY5Y			•	•
Caracterização das células diferenciadas e não diferenciadas			•	•

Referências

Arslan ME, Türkez H, Mardinoğlu A. In vitro neuroprotective effects of farnesene sesquiterpene on alzheimer's disease model of differentiated neuroblastoma cell line. Int J Neurosci, 131(8):745-754, 2021 <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1754211>

Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules 2020, 25, 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>

Carrettiero DC, Almeida MC, Longhini AP, Rauch JN, Han D, Zhang X, Najafi S, Gestwicki JE, Kosik KS. Stress routes clients to the proteasome via a BAG2 ubiquitin-independent degradation condensate. Nat Commun 13, 3074 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30751-4>

Carrettiero DC, Hernandez I, Neveu P, Papagiannakopoulos T, Kosik KS. Articles. The Cochaperone BAG2 Sweeps Paired Helical Filament- Insoluble Tau from the Microtubule. Journal of Neuroscience 29 (7) 2151-2161, 2009 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4660-08.2009>

Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. J Neurosci Research, 2006 <https://doi.org/10.1002/jnr.20976>

Christensen J, Steain M, Slobedman B, Abendroth A. Differentiated Neuroblastoma Cells Provide a Highly Efficient Model for Studies of Productive Varicella-Zoster Virus Infection of Neuronal Cells. Journal of Virology 85(16), 2011 <https://doi.org/10.1128/JVI.00515-11>

de Oliveira AS, Santiago FE, Balioni LF, Ferrari MFR, Almeida MC, Carrettiero DC. BAG2 expression dictates a functional intracellular switch between the p38-dependent effects of nicotine on tau phosphorylation levels via the $\alpha 7$ nicotinic receptor. Experimental Neurology, 275(1): 69-77, 2016 <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.10.005>

de Paula CAD, Santiago FE, de Oliveira ASA. Oliveira SA, Almeida MC, Carrttiero DC. The Co-chaperone BAG2 Mediates Cold-Induced Accumulation of Phosphorylated Tau in SH-SY5Y Cells. Cell Mol Neurobiol 36, 593–602, 2016 <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0239-x>

De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. Cell, 164(4):603-15, 2016 <https://10.1016/j.cell.2015.12.056>

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C Comella JX. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. J Neurochem. 75(3):991-1003, 2000 <https://10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>

Gregori M, Taylor M, Salvati E, Re F, Mancini S, Balducci C, Forloni G, Zambelli V, Sesana S, Michael M, Michail C, Tinker-Mill C, Kolosov O, Sherer M, Harris S, Fullwood NJ, Masserini M, Allsop D. Retro-inverso peptide inhibitor nanoparticles as potent inhibitors of aggregation of the Alzheimer's A β peptide. Nanomedicine. 13(2):723-732, 2017 <https://10.1016/j.nano.2016.10.006>

Gu L, Cai N, Li M, Bi D, Yao L, Fang W, Wu Y, Hu Z, Liu Q, Lin Z, Lu J, Xu X. Inhibitory Effects of Macelignan on Tau Phosphorylation and A β Aggregation in the Cell Model of Alzheimer's Disease. Front Nutr. 9:892558, 2022 <https://10.3389/fnut.2022.892558>

Hellström-Lindahl E, Moore H, Nordberg A. Increased levels of tau protein in SH-SY5Y cells after treatment with cholinesterase inhibitors and nicotinic agonists. Journal of neurochemistry, 74, n. 2, p. 777-784, 2000 <https://10.1046/j.1471-4159.2000.740777.x>

Jäkel S., Dimou L. 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. Front. Cell. Neurosci., 2017 <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>

Lima RS, Carrettiero DC, Ferrari MFR. BAG2 prevents Tau hyperphosphorylation and increases p62/SQSTM1 in cell models of neurodegeneration. Mol Biol Rep, 2022

<https://10.1007/s11033-022-07577-w>

Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica. São Paulo: Rocca, 2007. 503 p.

Ooi H, Nasu R, Furukawa A, Takeuchi M, Koriyama Y. Pyridoxamine and Aminoguanidine Attenuate the Abnormal Aggregation of β -Tubulin and Suppression of Neurite Outgrowth by Glyceraldehyde-Derived Toxic Advanced Glycation End-Products. Front. Pharmacol, 2022

<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.921611>

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells². JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 71, n. 4, p. 741-747, 1983.

Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. J Vis Exp. (108):53193, 2016 <https://10.3791/53193>

Wiatrak B, Jawień P, Matuszewska A, Szelać A, Kubis-Kubiak A. Effect of amyloid- β on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells. Biomed Pharmacother, 149:112880, 2022

<https://10.1016/j.biopha.2022.112880>