



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido para  
avaliação no Edital: 01/2022

**Título do projeto:** Papel de IP3R1 na neuroinflamação da retina – gliose reativa e ativação microglial

**Palavras-chave do projeto:** Retina, microglias, neuroinflamação, íons cálcio, IP3R1, 2-APB

**Área do conhecimento do projeto:** Neurociência

## RESUMO

A retina é um tecido do sistema nervoso central (SNC), localizado na parte interna do olho. A retina é formada por camadas celulares, que se conectam através de sinapses. Entre as células que formam a retina estão as células da glia, que podem ser divididas em micro- e macróglia, que são os astrócitos, as células de Müller e os oligodendrócitos. As células gliais são muito importantes para o bom funcionamento da retina. Isso porque as células de Müller possuem diversas funções como a manutenção da estabilidade do meio extracelular, enquanto as microglia são importantes por sua capacidade regenerativa e proteção tecidual. Além disso, ambas as células participam da neuroinflamação ao liberarem citocinas e fatores inflamatórios. Ainda, os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), regulados pelo receptor IP3R1, possuem diversas funções relacionadas direta ou indiretamente com o funcionamento de células neurais. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  influencia processos desde a proliferação à morte celular. Com isso, o objetivo desse projeto é analisar o papel de IP3R1 na neuroinflamação da retina e como ela atua na ativação microglial. Para isso, iremos realizar culturas puras de células microgliais e de Müller com camundongos da linhagem C57/BL6. Após a coleta das células puras, será feita a aplicação do fármaco 2-APB (1  $\mu\text{M}$ ) para observar a ação do IP3R1 nessas células, que serão analisadas por imunofluorescência com marcadores de neuroinflamação. Com isso, esperamos observar uma regulação da ativação microglial (de um estado mais pró-inflamatório para um estado mais anti-inflamatório), e da gliose reativa das células de Müller, quando tratadas com o 2-APB.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Retina – estrutura e funcionamento**

A retina é um tecido do sistema nervoso central (SNC), localizado na camada mais interna do olho, responsável pelo início do processo da visão. Quando a luz alcança a retina, iniciam-se diversos eventos celulares, transformando o sinal luminoso em um sinal eletroquímico (processo conhecido como fototransdução), que é enviado para diversos centros visuais do cérebro. A retina é formada por diversas camadas celulares estratificadas que se conectam através das sinapses, sendo sustentada pela camada de células epiteliais pigmentares retinianas (1).

Ainda, as células da retina possuem um padrão de diferenciação e maturação filogeneticamente conservados, em que algumas células se originam no início da histogênese da retina, como os fotorreceptores cones, células ganglionares e as horizontais, enquanto outras desenvolvem-se posteriormente, como é o caso das células de Müller, fotorreceptores bastonetes, células bipolares e amácrinas (2)

A retina é dividida em cinco principais camadas, entre elas estão a camada de células ganglionares (*ganglion cell layer, GCL*), células responsáveis pela formação do nervo óptico que se conecta ao encéfalo; a camada plexiforme interna (*inner plexiform layer, IPL*), composta por dendritos das células ganglionares e axônios das células bipolares; a camada nuclear interna (*inner nuclear layer, INL*), constituída pelos núcleos das células horizontais, bipolares, amácrinas; a camada plexiforme externa (*outer plexiform layer, OPL*), é onde estão localizados os dendritos de células bipolares e horizontais e onde ocorrem suas sinapses; a camada nuclear externa (*outer nuclear layer, ONL*) possui os corpos celulares dos fotorreceptores (1). Entre as diversas células neuronais da retina, as células da glia são muito importantes para o suporte e manutenção da fisiologia retiniana. Essas células são divididas em dois subtipos, as micro- e macroglias, que incluem as células de Müller, astrócitos e oligodendrócitos (3).

### **1.2 Importância da glia de Müller e Microglia na retina**

Na retina, as células de Müller são o tipo glial mais numeroso. Essas células podem ser encontradas em toda espessura da retina, possuindo uma morfologia alongada e com orientação radial (4). A glia de Müller é responsável pelo suporte homeostático e metabólico de neurônios da retina e por manter a estabilidade do meio extracelular, ao funcionarem como mediadoras do transporte de íons, água e

bicarbonato (4,5). Além disso, estas células estão envolvidas na regulação de atividades sinápticas da retina através da captação e fornecimento de neurotransmissores aos neurônios, e auxílio na regulação do fluxo sanguíneo e manutenção da barreira sanguínea da retina (5). Em processos danosos na retina, as células de Müller participam da neuroinflamação, liberando citocinas e fatores inflamatórios, proteínas produzidas capazes de modular a função de outras células e mediar a resposta imune. Ainda, estudos indicam que a glia de Müller auxilia na formação de sinapses em *zebrafish* e é capaz de se desdiferenciar em células que foram danificadas (5). As células de Müller também estão relacionadas à ativação e migração das microglias (3).

As células da microglia são células residentes do SNC, localizadas nas camadas plexiformes da retina, associadas à neuroinflamação e neuroproteção. Essas células são essenciais devido sua função de fagocitose e capacidade de repovoamento (6). A microglia também possui receptores para neurotransmissores, permitindo o controle da atividade neuronal, bem como o aperfeiçoamento de sinapses (7). Porém, danos crônicos à retina podem afetar a ativação microglial, favorecendo o desenvolvimento de retinopatias (8). Com isso, é muito importante estudar as reações dessas células em determinadas situações, como o uso de culturas *in vitro* para o desenvolvimento de terapias que combatem a neuroinflamação na retina.

Ainda, diversos mecanismos intracelulares são necessários para a ativação dessas células, como ativação de fatores de transcrição e a movimentação dos íons de cálcio.

### **1.3 Funções do cálcio na retina e IP3R1**

Os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) são importantes tanto na formação embrionária, como no desenvolvimento neuronal e morte celular (9). O  $\text{Ca}^{2+}$  atua também em processos como a proliferação celular e na transdução de luz (10). Ainda, as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem influenciar na síntese de proteínas e apoptose celular, além de influenciar em diversas funções neurais, a partir de vias mensageiras secundárias (11). Na retina, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são afetados pela quantidade de luz absorvida pelas células fotorreceptoras (11). Isso acontece de forma que, no escuro, os canais controlados por nucleotídeos cíclicos estão abertos, permitindo que uma corrente transportadora

de íons sódio e  $\text{Ca}^{2+}$  tenha uma alta movimentação, esse fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  também influencia nas funções dos fotorreceptores (11).

A maior parte da liberação desses íons no meio intracelular é feita a partir de canais sensíveis à molécula Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), localizada na membrana do retículo endoplasmático (9). O IP3 é uma molécula que possui influência nas atividades dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , e a homeostase de seus íons (12). Os receptores de IP3, chamados de IP3R, possuem três isoformas. Entre elas, o IP3R1 está envolvido na plasticidade neuronal e extensão de neurites, sendo a forma mais expressada em células neuronais (10,13). Estudos indicam que, em ratos com lesão isquêmica, a inibição de IP3R1 aliviou as lesões, ao reduzir a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , inflamação das células e morte celular por piroptose (14). Ainda, camundongos com mutação no IP3R1 apresentaram um problema grave de coordenação motora (15).

Com isso, os estudos *in vitro* atuam como aliados para a análise de tais dados por proporcionarem a possibilidade de cultivar células advindas de modelos animais. Ainda, o cultivo de células puras, em específico as células gliais, são importantes para analisar e estudar suas funções, de forma isolada, como células que atuam no sistema imunológico. Nesse cenário, o bloqueio de IP3R1 é uma forma de se analisar como essa molécula atua na neuroinflamação retiniana, como na gliose reativa e com a ativação microglial.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

- Analisar o papel de IP3R1 na neuroinflamação em glias da retina *in vitro*, avaliando diferentes estímulos danosos as células e o efeito do bloqueio farmacológico com 2-aminoetoxidifenil (2-APB).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obter uma co-cultura de células puras de microglias e células de Müller a partir de retina de camundongos neonatos;
- Tratar as células puras com 2-APB (1uM) após sua maturação;
- Realizar imunofluorescência de marcadores como Vimentina (para Müller) e Iba1 (para microglia) para observar o padrão morfológico destas células após tratamento com 2-APB;

- Analisar o papel de IP3R1 na gliose reativa de células puras de Müller;
- Analisar o papel de IP3R1 na ativação microglial.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Animal**

Os animais que serão utilizados serão camundongos da linhagem C57/BL6 machos e fêmeas de 0 a 4 dias pós-natais, que serão obtidos pelo biotério de criação da UFABC (Santo André). Todos os procedimentos serão realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do ABC (CEUA). Os animais serão eutanasiados por decapitação direta.

#### **3.2 Obtenção de células e cultura celular**

Para a obtenção das células, será utilizado retinas de camundongos C57/BL6 neonatos. Após a decapitação, dissecação dos olhos e isolamento das retinas, o material será colocado em um *falcon* contendo Solução A. A partir disso, iremos realizar a digestão química do tecido, com a adição de tripsina na concentração final de 0,125% por 10 a 15 minutos a 37 °C (Fig. 1). Em seguida, será adicionado soro fetal bovino (FBS) para interromper a ação da enzima, e posteriormente será realizado a dissociação mecânica do tecido com micropipetas. Após, as células serão centrifugadas por 10 minutos a 720 rpm. Depois disso, o sobrenadante será descartado e as células suspensas em 1 ml do meio de cultura completo. As células serão semeadas em uma placa T-75 e incubadas por 7 dias, quando será realizada a troca do meio da cultura (Fig. 1). Após 14 dias *in vitro*, as microglias e células de Müller serão coletadas. O meio utilizado para manter as células será DMEM/F12 com Glutamax (Gibco, A15169-01), suplementado com 10% FBS (Thermo, 16000044) e 1% P/S (Gibco, 1507-063).

Para coletar as microglias, a placa será agitada por 1h à 37°C. Em seguida, o sobrenadante será transferido para um *falcon*, que será centrifugado por 10 minutos à 720 rpm. A seguir, o sobrenadante será descartado e as células ressuspensas em 1 ml do meio completo. As microglias serão contadas e semeadas em placas de 24 poços em concentração ainda a ser definida. Para a coleta das células de Müller, a placa também será agitada por 1 h à 37 °C e, depois de retirar o sobrenadante para a coleta das microglias, será acrescentada na placa tripsina/EDTA 0.25% por 5 minutos para soltar as células que estavam aderidas à placa. Em seguida, o sobrenadante será colocado em um *falcon*, que será centrifugado nas mesmas

condições que as microglias. Então, o sobrenadante será descartado e o *pellet* ressuspensionado com 1 ml do meio completo. As células de Müller serão contadas e semeadas em placas com PDL.

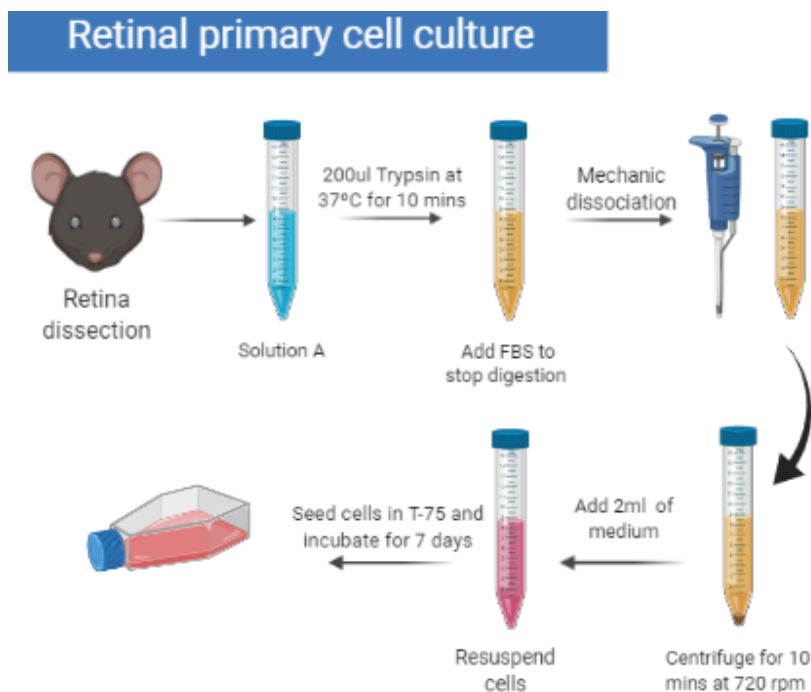


Figura 1: Representação do protocolo de cultura de células pura de microglia e células de Müller.

### 3.3 Aplicação do fármaco 2-APB nas culturas puras

O tratamento das células será realizado após 4 dias da coleta e plaqueamento. Serão analisados os seguintes grupos experimentais, são eles:

- Grupo tratado com veículo, exposto ou não previamente com:  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etanol ou ambos;
- Grupo tratado com 2-APB, exposto ou não previamente com:  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etanol ou ambos;

Sendo assim, observamos um total de seis grupos experimentais. A concentração do fármaco e outros será definida com base na literatura e desenvolvimento do projeto.

### 3.4 Imunofluorescência

As culturas celulares serão analisadas por Imunofluorescência (IF). Para isso, o meio da placa de cultura será retirado e então colocaremos paraformaldeído (PFA) 4% nos poços. Em seguida, serão feitas duas lavagens de 5 minutos com PBS gelado.

Depois da segunda lavagem, colocaremos Triton 0,4% em PBS, por 40 minutos. A seguir, a placa será lavada com uma solução de PBS e 0,1% Tween 20, por 5 minutos. Então, a solução de bloqueio, Albumina 1% será adicionada nos poços e incubada por 30 minutos. A placa será lavada novamente com PBS, por 5 minutos e o anticorpo primário incubado à 4 °C *overnight*. Os anticorpos primários que serão utilizados são: Iba1 (Wako, 019-19741), vimentina (Millipore, AB1620) e IP3R1 (Millipore, AB5882).

No dia seguinte, o anticorpo primário será retirado e a placa lavada 3 vezes com PBS e 0,1% Tween 20, por 5 minutos cada lavagem. Então o anticorpo secundário será colocado por 3 horas na placa, que depois será lavada uma vez com PBS e 0,1% Tween 20 por 5 minutos e uma vez com PBS. A última lavagem será mantida na placa, para que possamos analisar as culturas posteriormente no microscópio.

### **3.5 Western Blotting**

A técnica de western blotting (WB) será realizada de acordo com protocolo estabelecido por Laemmli (Laemmli, 1970). As células serão extraídas e colocadas em tampão RIPA. O isolamento de proteínas será realizado de acordo com o protocolo de fabricante e as amostras homogeneizadas serão quantificadas por método BCA. As proteínas serão separadas por eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas serão bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão Salina Tamponada em Tris (TBST) por 2 horas à temperatura ambiente, posteriormente lavadas em TBST e com anticorpo primário durante a noite a 4 °C em agitação. Em seguida, as membranas serão lavadas em TBST e incubadas com anti-peroxidase por 2 horas à temperatura ambiente. A detecção de IP3R1 (Millipore, AB5882) irá ser obtida usando o transluminador (kit ECL; Amersham), que serão capturadas via Uvitec D8514-50. Medições de densidades ópticas (OD) realizadas usando o software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA). O anticorpo anti-beta actina (Millipore; Cat n: # MAB1501) será usado como um normalizador.

### **3.6 Análises estatísticas**

Para esse projeto, será utilizado o microscópio Nikon para capturar as imagens das culturas celulares, o *software* Image J com diversos plugins para quantificação das imagens e mensuração da densidade óptica dos experimentos de western blot.



Ainda, serão utilizados o Photoshop e Biorender para montar figuras e painéis. Para os painéis, as figuras serão manipuladas apenas em seu brilho e contraste.

#### 4. DESCRIÇÃO DA VIABILIDADE DO PROJETO

Esse projeto foi elaborado pensando em sua viabilidade de execução. O laboratório em que a discente está inserida possui todos os materiais e reagentes necessários para seu desenvolvimento. Além de possuir experiência com modelo retiniano e experimentos *in vitro* e possuir apoio técnico e teórico dos demais membros do laboratório. Além disso, a discente desenvolveu projeto no programa Pesquisando Desde o Primeiro Dia (PDPD) com tema relacionado ao levantamento bibliográfico para a obtenção de um protocolo de cultura de células puras de subtipos retinianos advindas de modelos animais. Ainda, reforça-se que a CEUA para o desenvolvimento do projeto já está em andamento, cuja escrita está sob supervisão de alunos de pós-graduação.

#### 5. RESULTADOS PRELIMINARES

Durante o período do PDPD, a discente reproduziu o protocolo para a obtenção de cultura de células puras que será utilizado nesse projeto. A partir disso, foram obtidas culturas puras de microglia com purezas de 96 a 99% e culturas puras de células de Müller com pureza de 93 a 97%, como mostradas na Fig. 2.

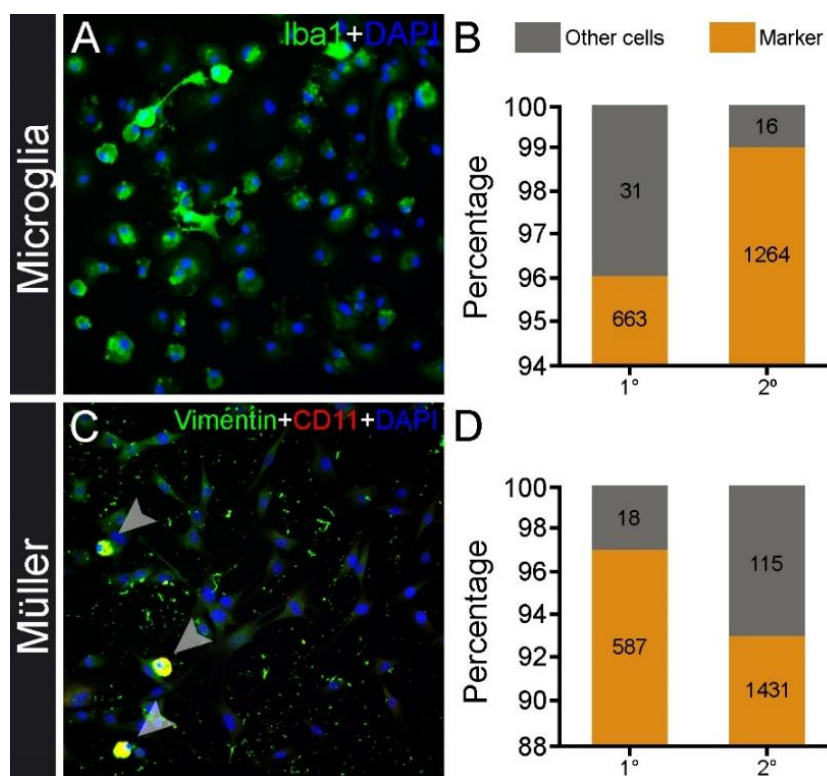


Figura 2: Análise da pureza das culturas de microglia e glia de Müller. (A) Imagem de imunofluorescência de cultura pura de microglias, que foram marcadas com Iba1 (verde), enquanto seus núcleos foram marcados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, azul). (B) Gráfico com a representação da pureza da cultura pura de microglias, que obtiveram purezas de 96 e 99%, sendo cada uma das colunas referentes à uma diferente cultura pura de microglias. (C) Imunofluorescência da cultura pura de células de Müller, que foram marcadas com Vimentina (verde) e CD11 (vermelho) e cujos núcleos também estão marcados com DAPI. As cabeças de seta indicam as células de Müller (D) Gráfico com a representação da pureza da cultura pura de Müller, que obtiveram purezas de 93 e 97%, sendo cada uma das colunas referentes à uma diferente cultura pura de Müller.

## 6. CRONOGRAMA

<b>Set, Out, Nov</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revisão de literatura</li> <li>- Co-cultura pura de células Müller e Microglias</li> <li>- Coleta de microglias</li> <li>- Tratamento celular e imunofluorescência</li> </ul>
<b>Dez, Jan, Fev</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revisão de literatura</li> <li>- Co-cultura pura de células Müller e Microglias</li> <li>- Coleta de microglias e glia de Müller</li> <li>- Tratamento celular</li> <li>- Imunofluorescência</li> <li>- Análise de dados e relatório parcial</li> </ul>
<b>Mar, Abr, Mai</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revisão de literatura</li> <li>- Tratamento celular</li> <li>- Imunofluorescência</li> <li>- Análise de dados e relatório parcial</li> </ul>
<b>Jun, Jul, Ago</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revisão de literatura</li> <li>- Análise de dados</li> <li>- Relatório final</li> <li>- Montagem do pôster para apresentação do Simpósio de Iniciação Científica.</li> </ul>

## REFERÊNCIAS

1. Roubéix C, Sahel JA, Guillonéau X, Delarasse C, Sennlaub F. Anatomie de la rétine. médecine/sciences [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Feb 9];36(6–7):594–9. Available from: [https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/full\\_html/2020/06/msc200130/msc200130.html](https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/full_html/2020/06/msc200130/msc200130.html)
2. Belecky-Adams TL, Chernoff EC, Wilson JM, Dharmarajan S. Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors. Neural Stem Cells - New Perspectives [Internet]. 2013 Apr 24 [cited 2022 Feb 9]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/44258>
3. García-Bermúdez MY, Freude KK, Mouhammad ZA, van Wijngaarden P, Martin KK, Kolko M. Glial Cells in Glaucoma: Friends, Foes, and Potential Therapeutic Targets. Frontiers in Neurology. 2021 Mar 16;12:169.
4. Pereiro X, Ruzafa N, Acera A, Urcola A, Vecino E. Optimization of a Method to Isolate and Culture Adult Porcine, Rats and Mice Müller Glia in Order to Study Retinal Diseases. Front Cell Neurosci [Internet]. 2020 Jan 29 [cited 2022 Feb 9];14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32082123/>
5. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. Glia [Internet]. 2013 May 1 [cited 2022 Feb 9];61(5):651–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23440929/>
6. Bohlen CJ, Bennett FC, Bennett ML. Isolation and culture of microglia. Curr Protoc Immunol [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Feb 15];125(1):e70. Available from: </pmc/articles/PMC6510657/>
7. Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in retinal degeneration. Frontiers in Immunology. 2019;10(AUG):1975.
8. Silverman SM, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034425> [Internet]. 2018 Sep 17 [cited 2022 Jun 4];4:45–77. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-vision-091517-034425>
9. Slusarski DC, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. Developmental Biology. 2007 Jul 1;307(1):1–13.
10. Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptors and their role in neuronal cell function. Journal of Neurochemistry [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2022 Jun 19];97(6):1627–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2006.03985.x>
11. Akopian A, Witkovsky P. Calcium and retinal function. Molecular Neurobiology 2002 25:2 [Internet]. 2002 [cited 2022 Jun 18];25(2):113–32. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/MN:25:2:113>
12. Itpr1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16438>
13. Mikoshiba K. The IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel and its cellular function. Biochem Soc Symp [Internet]. 2007 [cited 2022 Jun 25];74(74):9–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17233576/>

14. Mo G, Liu X, Zhong Y, Mo J, Li Z, Li D, et al. IP3R1 regulates Ca<sup>2+</sup> transport and pyroptosis through the NLRP3/Caspase-1 pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cell Death Discovery* 2021 7:1 [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 2022 Jun 19];7(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41420-021-00404-4>
15. Gorbatyuk MS, Starr CR, Gorbatyuk OS. Endoplasmic Reticulum Stress: New Insights into the Pathogenesis and Treatment of Retinal Degenerative Diseases. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Jun 19];79:100860. Available from: [/pmc/articles/PMC7541398/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33088888/)