

ANÁLISE DOS EFEITOS DA INTERLEUCINA 10 (IL-10) SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E MITOCONDRIAIS E SOBRE A ETIOPATOGENIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM CÉLULAS HIPOCAMPAIS HT22

Palavras-Chave: SAÚDE PÚBLICA, DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS, HIPÓTESE AMILÓIDE

Autores(as):

ANA BEATRIZ ARAÚJO BRANDÃO, FCA – UNICAMP

SCYLAS JOSÉ DE ANDRADE JÚNIOR, FCA – UNICAMP

Me. ANA PAULA MORELLI, FCA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). EDUARDO ROCHETE ROPELLE (orientador), FCA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência, responsável por 70% de todos os casos no mundo. Pode-se caracterizar como um estado persistente de deterioração cognitiva, incluindo perda de memória, dificuldade de comunicação e de compreensão, diminuição da capacidade de atenção; de deterioração funcional, incluindo problemas de coordenação e de percepção visual; e de deterioração emocional, incluindo sintomas depressivos, ansiosos, delírios, alucinações e agressividade (DAROFF; AL, 2012). No Brasil, a possibilidade é de que existam cerca de 1,2 milhão de pessoas com Alzheimer (PEDRO, 2020).

Estudos recentes apontam que a neuroinflamação esteja intimamente relacionada ao acúmulo de placas amilóides, de emaranhados neurofibrilares e também da disfunção mitocondrial e a hipótese amilóide tem sido a base para a maioria dos trabalhos sobre a patogênese da Doença de Alzheimer (HARDY, 2009). Dentre as características principais da patologia do Alzheimer estão as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares (NFTs), compostos principalmente de filamentos de proteína Tau hiperfosforilada. O acúmulo de oligômeros de β -amilóide leva tanto à biogênese quanto à hiperfosforilação da proteína Tau, acumulada em regiões de sinapses neuronais (LANE; HARDY; SCHOTT, 2017). A perda neuronal e de sinapses é paralela à formação dos emaranhados neurofibrilares (MIRRA et al., 1991).

Algumas das moléculas envolvidas nos processos inflamatórios são as citocinas, produzidas por diversos tipos de células em locais de lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteínas quinases por mitógenos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Algumas citocinas podem ter ações pró-inflamatórias (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), como a interleucina 10, de efeito anti-inflamatório e produzida pela contração muscular durante o exercício físico.

Como objetivo geral, o presente projeto pretende analisar os efeitos do tratamento com IL-10 recombinante sobre parâmetros inflamatórios, mitocondriais e morfológicos em células hipocampus HT22 expostas a oligômeros de beta-amilóide e LPS.

METODOLOGIA:

1. CULTURA DE CÉLULAS

Será utilizada a linhagem celular HT-22 (células neuronais hipocampus de camundongos), cultivada em meio de cultura DMEM (#12100046; Gibco, Thermo-Fisher Scientific) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (#12657029; Gibco, Thermo-Fisher Scientific) e 1% de Penicilina e Estreptomicina

(#15070063; Gibco, Thermo-Fisher Scientific). Para a diferenciação celular, as células serão plaqueadas e posteriormente mantidas em meio NeuroBasal contendo 2mM de glutamina e suplemento B27 por 24 e 48 horas antes do experimento (HE et al., 2013).

2. OLIGÔMEROS DE PEPTÍDEOS BETA-AMILÓIDE, LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS) E TRATAMENTO COM IL-10

Para o protocolo de oligomerização, células HT22 serão incubadas com 500 nM of A β Os ou o volume correspondente do veículo conforme previamente descrito (LOURENCO et al., 2019). A adição de IL-10 recombinante como tratamento será feita durante o período de diferenciação das células HT22, de aproximadamente 48h. Por alguns desafios encontrados no fornecimento e uso dos oligômeros, foram-se utilizados lipopolissacarídeos (LPS) para incubação com tratamento posterior com IL-10. O LPS tem atuação semelhante aos oligômeros de beta-amilóide na neuroinflamação e na contribuição da patologia do Alzheimer.

3. AVALIAÇÃO DE NEURITOS E ESTRUTURA MITOCONDRIAL

Células HT-22 serão plaqueadas em lamínulas preparadas em placas de 24 poços e previamente incubadas com oligômeros beta-amiloide + IL10. As mitocôndrias serão marcadas utilizando MitoTracker DeepRed (#8778, Cell Signaling Technologies). As fotos serão adquiridas em microscópio de fluorescência disponibilizado pelo INFABIC. O comprimento de neuritos será mensurado através do Software ImageJ.

4. ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTEICO POR WESTERN BLOTTING

Os extratos de células HT22 serão homogeneizados em tampão de lise e a proteína total será quantificada pelo método BCA (Thermo-Scientific). Os anticorpos primários e seus respectivos secundários serão preparados e incubados de acordo com instruções do fabricante. A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente será detectada e visualizada através de fotodocumentador e a intensidade das bandas será quantificada por densitometria utilizando o software ImageJ v1.53.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

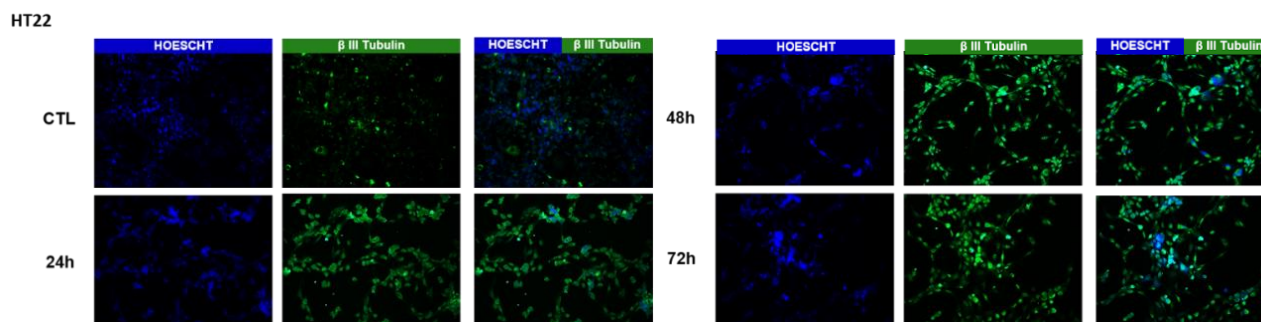
Os resultados são quantificados e analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) utilizando análise por Teste T, *One-Way ANOVA* ou *Two-Way ANOVA*, seguidas de pós-teste em adequação ao experimento realizado. Os dados serão expressos considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

• PADRONIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a utilização em experimentação, as células hipocampais tiveram a diferenciação induzida em meio NeuroBasal com suplemento B-27 com “time course” de 00h, 24h, 48h e 72h para análise estrutural e da viabilidade celular. Foi escolhido o tempo de 48h de diferenciação em meio NeuroBasal como ideal por meio da imunofluorescência.

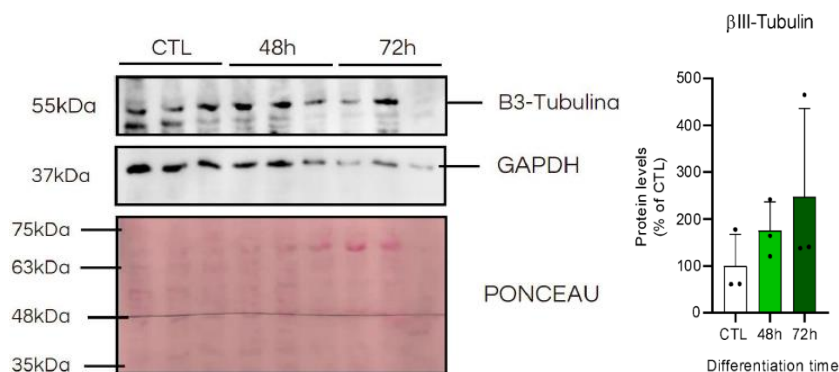
Figura 2. Imunofluorescência com marcação em HOESCHT para ácidos nucleicos e β III-Tubulina para neuritos com grupo controle (CTL) e períodos de 24h, 48h e 72h de diferenciação das células HT-22 em meio neurobasal.



- **ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR POR WESTERN BLOTTING**

Além da análise por imagem feita por imunofluorescência, a investigação do conteúdo celular por western blotting também foi realizada para confirmar os parâmetros percebidos na imunofluorescência. Houve um aumento da confluência (porcentagem da área do meio de crescimento coberto por células) que se tornou um fator limitante da viabilidade, reafirmando o tempo de 48h.

Figura 3. Western Blotting com análise das proteínas β III-Tubulina, de caráter estrutural em neuritos, e GAPDH, endógeno utilizado como controle, nos períodos de diferenciação controle (CTL), 48h e 72h em meio neurobasal.

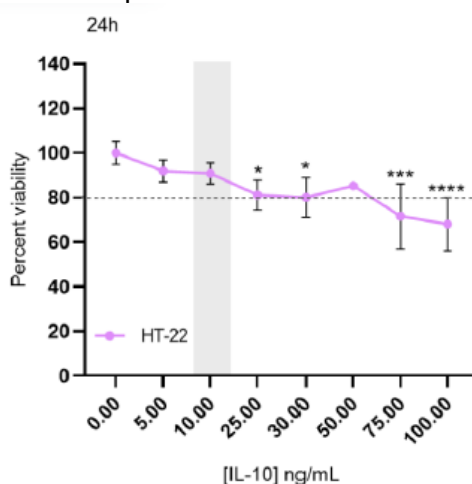


- **ENSAIO DE MTT - VIABILIDADE CELULAR**

A viabilidade celular frente à Interleucina 10 será avaliada pelo Ensaio de MTT, no qual as células HT-22 serão cultivadas e incubadas na presença e na ausência de IL-10 para padronizar a concentração ideal que seria utilizada em todo o experimento.

O resultado abaixo demonstra redução significativa da viabilidade celular pela diferenciação em meio adicionado de IL-10 a partir da concentração de 25 ng/mL em relação às células controle (CTL= 100.0 vs. IL-10 25 ng/mL= 81.11 p=0.0207, n=4) enquanto a concentração de 10 ng/mL não demonstrou alteração significativa da viabilidade (CTL= 100.0 vs. IL-10 10 ng/mL= 90.85 p=0.4858), sendo esta a concentração escolhida para os passos subsequentes.

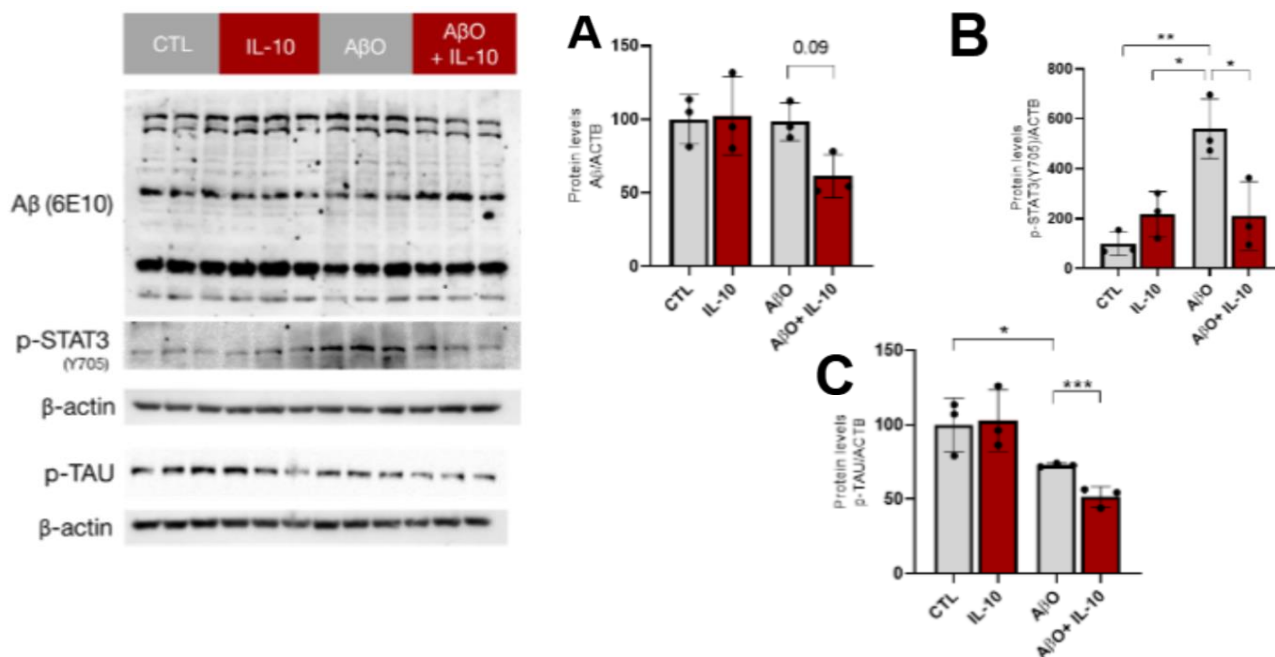
Figura 4. Curva de IL-10 em Ensaio de MTT com sete concentrações em ng/mL de meio de diferenciação neurobasal com análise do percentual de viabilidade celular.



- **TRATAMENTO COM BETA-AMILOIDE E IL-10 RECOMBINANTE**

O oligômero de beta-amiloide, substância de interesse principal neste projeto, se em grande quantidade e acumulado nas regiões de sinapses neuronais, é responsável pelos processos neurodegenerativos característicos da Doença de Alzheimer.

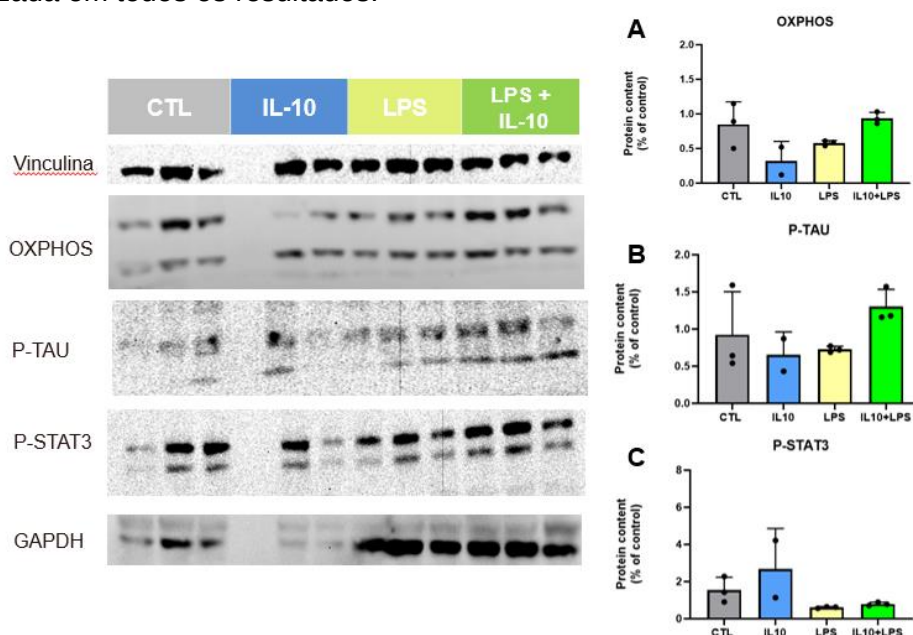
Figura 5. Western blotting (WB) das células HT-22 diferenciadas por 48h submetidas a IL-10 (10 ng/mL), A β O (500 nM) ou a combinação de ambos por 24h. Os gráficos mostram a densitometria das bandas observadas por WB para A β (A), p-STAT3 (B) e p-TAU (C). A análise de variância de um fator (One-Way ANOVA) foi utilizada em todos os resultados.



• TRATAMENTO COM LIPOSSACARÍDEOS E IL-10 RECOMBINANTE

Em revisão de literatura realizada por Zhan, Stamova e Sharp (2018), foi proposto que lipopolissacarídeos (LPS), encontrados na parede de todas as bactérias Gram-negativas, podem desempenhar um papel na etiopatogenia do Alzheimer, com a formação de amiloide extracelular, de forma semelhante aos oligômeros de beta-amiloide.

Figura 6. Western blotting (WB) das células HT-22 diferenciadas por 48h submetidas a IL-10 (10 ng/mL), LPS e à combinação de ambos por 24h. Os gráficos mostram a densitometria das bandas observadas por WB para OXPHOS (A), p-TAU (B) e p-STAT3(C). A análise de variância de um fator (One-Way ANOVA) foi utilizada em todos os resultados.



CONCLUSÕES:

Os AβOs aumentaram a fosforilação de STAT3, não apresentando o efeito esperado no acúmulo de Aβ ou p-Tau. Notavelmente, a IL-10 preveniu eficazmente a hiperfosforilação de STAT3 induzida por AβO. Este achado é relevante, visto que a ativação de STAT3 está implicada na transcrição de genes pró-inflamatórios.

Por mais que, graficamente (figura 6), o tratamento com IL-10 tenha promovido um aumento das proteínas OXPHOS e p-TAU se comparado aos outros grupos, este aumento não representou diferença estatística significativa. No entanto, a diminuição gráfica da p-STAT3 (figura 6.c) na presença de LPS – com ou sem tratamento – nos direciona a um olhar atento e investigativo para entender o contexto, bem como a diminuição da OXPHOS com tratamento de IL-10 recombinante em comparação aos grupos controle e LPS (figura 7).

BIBLIOGRAFIA

DAROFF, R. B.; AL, E. Bradley's neurology in clinical practice. Philadelphia, Pa: Elsevier/Saunders, 2012.

HARDY, J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. Journal of Neurochemistry, v. 110, n. 4, p. 1129–1134, 18 maio 2009.

HE, M. et al. Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. PubMed, 15 maio 2013.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. European Journal of Neurology, v. 25, n. 1, p. 59–70, 19 out. 2017.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery, v. 127, n. 2, p. 117–126, fev. 2000.

MIRRA, S. S. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology, v. 41, n. 4, p. 479–479, 1 abr. 1991.

PEDRO. Doença de Alzheimer: saiba mais sobre a principal causa de demência no mundo | InformaSUS-UFSCar. Disponível em: <<https://informasus.ufscar.br/doenca-de-alzheimer-saiba-mais-sobre-a-principal-cao-de-demencia-no-mundo/>>.

Zhan X, Stamova B, Sharp FR. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review. Front Aging Neurosci. 2018 Feb 22;10:42. doi: 10.3389/fnagi.2018.00042. PMID: 29520228; PMCID: PMC5827158.