

Importância relativa do MHC I neuronal e astrogial para o estabelecimento de sinapses *in vitro*.

Palavras-Chave: MHC class I, C6 cell, PC12 cell

Autores/as:

Estevão Henrique Cachioni (FCM - Unicamp)

Dr^a. Raffaella Silvestre Ignarro (LRN - IB Unicamp)

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (LRN - IB Unicamp)

INTRODUÇÃO:

O trauma de nervos periféricos e medula espinal leva a importante morbidade, afetando principalmente a população jovem, no auge de sua capacidade ativa. Esses eventos têm impacto direto sobre a qualidade de vida e capacidade laboral, pelas consequências funcionais e psicológicas, além de importantes gastos pessoais e públicos no tratamento destes pacientes. A abordagem terapêutica nos traumas periféricos consiste primordialmente em estratégias cirúrgicas, sendo a neurografia término-terminal a mais utilizada. Entretanto, esses métodos têm resultados muito variados, dependendo do tipo, extensão e cronologia da lesão, geralmente insatisfatórios. (1,2,3) Neste cenário, estratégias neuroregenerativas se tornam fundamentais na tentativa de otimizar os resultados terapêuticos e, conseqüentemente, impactar a vida de muitas pessoas afetadas por traumas do sistema nervoso.

Após a lesão nervosa periférica, uma seqüência de eventos ocorre nos neurônios afetados, denominada degeneração Walleriana. Tal seqüência de fenômenos envolve a remodelação do endoneuro, fragmentação axonal, proliferação e motilidade das células de Schwann, bem como secreção de citocinas, recrutamento de

macrófagos e fagocitose de resíduos de mielina. A formação das bandas de Büngner, pelas células de Schwann e suas membranas basais direciona o crescimento axonal advindo do coto proximal, permitindo a reinervação de tecidos alvo. Esse processo, apesar de permitir a reconexão de axônios lesados e seus sítios terminais de inervação, ocorre de maneira pouco específica, por vezes levando à inervação cruzada ou mal direcionada, o que contribui grandemente com o estabelecimento de sequelas sensorio-motoras. (4)

Nos últimos anos, vem sendo sugerida a atuação de diversas moléculas do sistema imune em processos de plasticidade e regeneração nervosa, que podem potencialmente melhorar esse processo e permitir novas estratégias de intervenção terapêutica (5, 6, 7, 8). Dentre estas moléculas, destaca-se o complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC classe I), um importante receptor do sistema imunológico, que atua na apresentação de antígenos para células T CD8⁺ (9), além de ter função no neurodesenvolvimento (6).

Neste sentido, Oliveira et al. (10) investigaram o processo de eliminação de sinapses que ocorre após a axotomia do nervo isquiático em camundongos adultos. Foi observado que em camundongo sem a expressão de MHC classe I

(*knock out* para a subunidade $\beta 2$ microglobulina do MHC classe I), houve maior perda de sinapses nos corpos celulares dos motoneurônios medulares lesados do que em animais selvagens. Além disso, observou-se que essa perda foi direcionada a terminais inibitórios que perderam sua disposição em agrupamentos, afetando negativamente a regeneração axonal.

Estudos posteriores reforçaram a ideia do MHC classe I como molécula neuroprotetora, através de experimentos que superexpressaram tal molécula, tratando camundongos com interferon-beta (IFN- β) no modelo de esmagamento ou transecção do nervo isquiático. Foi demonstrado que a administração de IFN- β levou ao aumento de expressão de MHC classe I tanto na superfície neuronal, quanto no neurópilo adjacente, no corno ventral da medula lombar, após uma semana da lesão periférica. Interessantemente, nestes animais a perda sináptica também foi aumentada e direcionada aos terminais inibitórios isolados, entretanto, aqueles dispostos em “clusters” se mantiveram preservados. (11, 12) Esse fenômeno exerce sua função no processo de regeneração, pois permite que o motoneurônio lesado sofra menor efeito da excitotoxicidade, além de permitir que seu metabolismo se direcione à sobrevivência e regeneração ao invés de transmissão sináptica, o que é benéfico (10). Dessa forma, observou-se que, no modelo de lesão por esmagamento, estas alterações sinápticas foram acompanhadas de crescimento axonal e melhora funcional significativamente mais pronunciados (12).

No neurópilo, outro elemento fundamental com sua importância evidenciada é a glia que envolve o corpo celular do neurônio lesado e seus terminais pré-sinápticos. A função da glia, formada principalmente por astrócitos, é diversa. Uma delas é se interpor entre os terminais pré e pós-sinápticos e agir na retração desses inputs. Além disso, age através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, que podem influenciar na dinâmica de sinapses e da regeneração neuronal. (8, 11, 13)

Neste cenário, considerando que a literatura atual é bastante focada no estudo do papel do MHC classe I em neurônios, o presente

estudo utilizou o tratamento com IFN- β como ferramenta para investigar uma possível modulação do MHC classe I nas células de linhagem glial. O objetivo principal foi avaliar o efeito de tal modulação de MHC classe I e/ou a possível ação das substâncias secretadas pelas células de linhagem glial, C6, tratadas com IFN- β sobre as sinapses formadas pelas células da linhagem neuronal, PC12, amplamente utilizadas como modelo de estudo de neuroplasticidade *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS:

No presente estudo, foram utilizadas células de linhagem neuronal (PC12 #CRL-1721 ATCC®, derivada de feocromocitoma de rato) e linhagem glial (C6, ATCC®, #CCL-107, derivada de glioma murino). Ambas foram mantidas em incubadora contendo 5% de CO₂ a 37°C e sempre adicionou-se aos meios de cultivo 1% de penicilina/estreptomicina (Vitrocell, #P0403)

Os experimentos consistiram inicialmente na estimulação de células PC12 com fator de crescimento do nervo (nerve growth factor - NGF, Gibco™, #13290-010) para que ocorresse diferenciação para perfil neuronal com emissão de neuritos e formação sinapses em rede (14). O processo de diferenciação foi realizado em placas de 24 poços (Sarstedt®, #833922) usando meio Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco™, #31985070), contendo 4% de soro fetal bovino e 500 ng/ml de NGF. Utilizou-se a densidade celular inicial de 1250 células/cm² e as células foram diferenciadas por 9-12 dias. O meio de cultura completo contendo Opti-MEM, NGF e antibióticos foi renovado a cada 48 horas.

Em outra etapa realizou-se a exposição das células C6 ao IFN- β (500 UI/mL, Betaferon, Bayer®) para de estimular a expressão de MHC classe I. Esta abordagem se baseou nos dados anteriores da literatura sobre MHC classe I em cultura de astrócitos corticais, nos quais após uma semana de tratamento dos astrócitos de camundongos neonatos com 500 e 1000 UI/ml de IFN- β , observou-se através de imunofluorescência, aumento da expressão proteica de MHC classe I e GFAP, além de

hipertrofia astrocitária e aumento da quantidade de prolongamentos (11, 15).

Os grupos experimentais com células C6 foram mantidos com e sem IFN- β (controle), além de dois grupos sem células, apenas com meio de cultivo (com e sem IFN- β). Este último foi feito para avaliarmos a interação direta do IFN- β nas células PC12 que receberam o meio condicionado posteriormente. Cada garrafa (Sarstedt® T75, #833911302) abrigou inicialmente um plaqueamento de 3000 células/cm² e 10 mL de meio de cultivo e cada falcon abrigou 20 mL apenas de meio de cultivo sem células. O meio utilizado foi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Vitrocell, #D0072) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, #200811) e antibióticos. Além dos grupos empregados na produção de meio condicionado, as células foram paralelamente cultivadas em uma placa de 24 poços (Sarstedt®, #833922) com lamínulas no fundo (para realização de ensaios de imunocitoquímica), divididas em dois grupos (células C6 com 500 UI/mL de IFN- β e células C6 apenas com meio de cultivo). Cada poço abrigou 1500 células/cm². A placa foi tratada seguindo o mesmo cronograma e procedimentos dos grupos experimentais.

Dessa forma, foram feitos três experimentos independentes com as células C6 com o objetivo de coletar seu meio condicionado, seguindo a sequência abaixo:

Etapa 1: plaqueamento celular (2 garrafas T75 cm²/grupo, 10 ml por garrafa)

Etapa 2: retirada de meio de plaqueamento e primeira adição de meio com IFN- β (D0)

Etapa 3: apenas adição de IFN- β (D1)

Etapa 4: coleta parcial (coleta de 70% do meio), adição de meio de cultivo e IFN- β (D2)

Etapa 5: apenas adição de IFN- β (D3)

Etapa 6: coleta total de meio de cultivo e encerramento do experimento (D4).

Cada etapa foi feita com intervalo de 24h da anterior. A placa mantida paralelamente foi encerrada em D3 (72h de estimulação), devido à alta confluência de células.

O meio de cultivo de todos os grupos foi coletado, identificado e armazenado a -20°C.

Após estabelecimento adequado das células PC12 já diferenciadas para perfil neuronal e com rede de sinapses desenvolvida, esse meio de cultivo condicionado de células C6 foi aplicado à cultura de células PC12 e sua interferência na dinâmica de sinapses avaliada.

Com o objetivo de avaliar a influência de IFN- β nas células C6 e expressão proteica de MHC classe I, foram feitos ensaios de imunocitoquímica das células cultivadas em placa. Foi utilizado o anticorpo OX18 (mouse anti-rat MHC class I RT1A antibody, clone OX-18, Serotec®, #MCA51G, 1:200), que reconhece um determinante monomórfico de MHC classe I, além de anticorpos secundários anti-mouse (Alexa Fluor 488, AffiniPure, donkey anti-mouse IgG, Jackson Immuno Laboratories, #715-545-150) e corante fluorescente nuclear DAPI.

Após imunomarcção, as lamínulas com células foram observadas e fotografadas por microscópio invertido (Leica®, #DM5500B) e câmera com filtros específicos para imunofluorescência (Leica®, #DFC345FX), sendo feita a captura de imagens de cinco áreas representativas por lamínula, em aumento de 20x, totalizando vinte imagens por grupo. Em seguida, as imagens foram quantificadas no programa Image J (versão 1.53e, NIH), que determina a densidade integrada de pixels. A quantificação das imagens geraram dados de densidade integrada de pixels, e foi normalizada pela quantidade de núcleos existentes para se evitar que confluências diferentes interferissem nos resultados obtidos. Foram realizados dois experimentos independentes para a quantificação de MHC classe I. Os resultados obtidos estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ (teste t não pareado de Student; Software GraphPad Prism® 5.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após diversas tentativas de padronização do processo de diferenciação das células PC12 para um fenótipo neuronal, conseguimos estabelecer um protocolo eficiente em formar

neuritos longos, abundantes e que parecem promover a comunicação entre as células (Fig. 1).

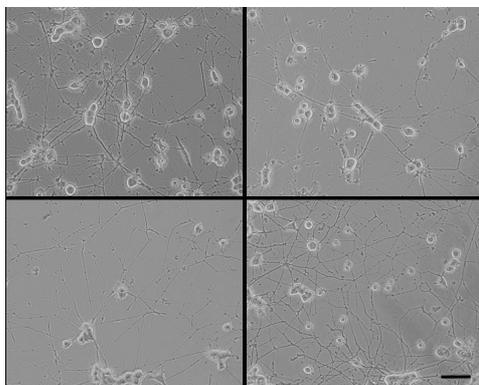


Figura 1. Imagens ilustrativas de células PC12 submetidas ao processo de diferenciação neuronal e formação de neuritos após 10 dias na presença de NGF nas condições citadas anteriormente.

Em relação à quantificação de MHC classe I por densidade integrada de pixels, observou-se que o tratamento das células C6 com IFN- β (500 UI/ml) por 72 horas não alterou a expressão desta proteína, quando comparado ao grupo controle (0 UI/mL IFN- β), sendo os dados estatísticos expressos na Figura 2. Ainda, a observação das células dos dois grupos experimentais ao microscópio invertido de campo claro não evidenciou diferenças em relação ao tamanho e/ou morfologia celulares (Fig. 3).

Além disso, foi feita a contagem, em hemocítmetro, das células em garrafas de ambos os grupos experimentais ao término do experimento e não se observou diferença significativa no número de células, indicando que o IFN- β não teve influência sobre a taxa de crescimento celular.

Esses achados não se alinham com resultados prévios, obtidos em culturas primárias de astrócitos corticais de camundongos neonatos, que demonstraram aumento da expressão de MHC classe I nestas células gliais (11).

Uma possível explicação para esse achado é o tipo celular empregado no presente estudo, um astrocitoma. Por se tratar de uma linhagem celular neoplásica, essa parece agir no sentido de suprimir a expressão de proteínas envolvidas na maquinaria de processamento antigênico e apresentação de antígeno via MHC classe I. Com isso, haveria

imunoproteção contra a ação citotóxica de células T CD8+, prolongando a sobrevivência tumoral. Ainda, observou-se que linhagens celulares de

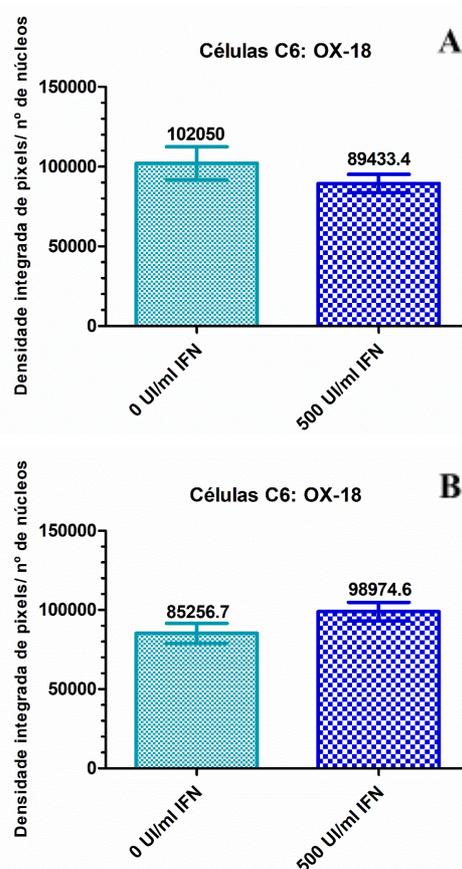
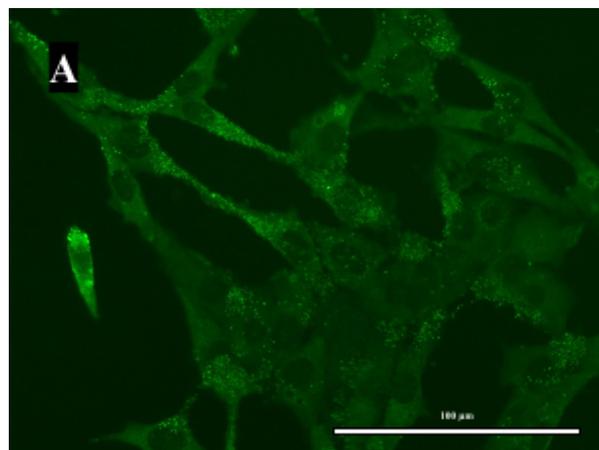


Figura 2. Gráfico paramétrico da média dos valores de densidade integrada de pixels/número de núcleos de cada imagem de ambos os grupos do primeiro (A) e segundo (B) experimentos.

astrocitomas humanos respondem com menor intensidade do que células controle em relação ao fato de citocinas inflamatórias aumentarem a expressão proteica de β -2 microglobulina de MHC classe I. (16) É plausível supor que a linhagem C6, sendo derivada de um glioma de rato, também possa apresentar esta tal redução da



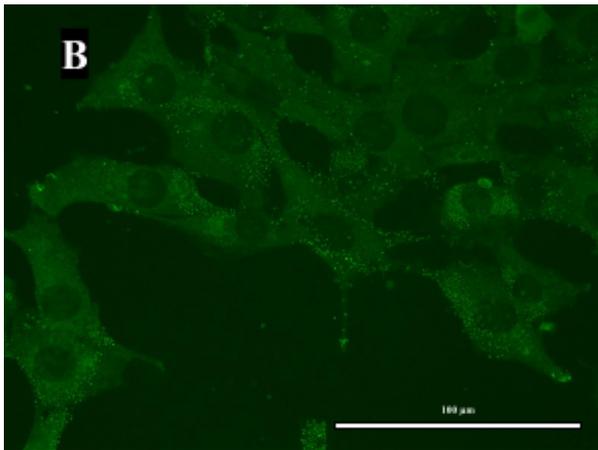


Figura 3. Imunomarcaco com anticorpo OX18 de grupo sem estimulaco de IFN- β (A) e de grupo sob estimulaco de 500UI/mL de IFN- β (B), 40x.

modulaco de MHC classe I por IFN- β , como parte de um mecanismo utilizado para evasão do sistema imune.

CONCLUSÃO:

Este estudo sugere que, em células astrogliais neoplásicas murinas, a exposico ao IFN- β não influencia no aumento da expressão de MHC classe I. Apesar disso, diferenças podem se dar no produto de secreco dessas células, influenciando, de forma indireta, na plasticidade sináptica. Entretanto, a análise dessa possível modulaco apenas poderá ser confirmada em experimentos futuros, após uso do meio condicionado de células C6 estimuladas por IFN- β em culturas de células PC12 diferenciadas em perfil neuronal.

REFERÊNCIAS:

- Castillo-Galván ML, Martínez-Ruiz FM, de la Garza-Castro O, Elizondo-Omaa RE, Guzmán-López S. Estudio de la lesión nerviosa periférica en pacientes atendidos por traumatismos [Study of peripheral nerve injury in trauma patients]. *Gac Med Mex.* 2014 Nov-Dec;150(6):527-32. Spanish. PMID: 25375283.
- Winfrey CJ. Peripheral nerve injury evaluation and management. *Curr Surg.* 2005 Sep-Oct;62(5):469-76. doi: 10.1016/j.cursur.2005.03.008. PMID: 16125601.
- Brito LM, Chein MB, Marinho SC, Duarte TB. Epidemiological evaluation of victims of spinal cord injury. *Rev Col Bras Cir.* 2011 Sep-Oct;38(5):304-9. English, Portuguese. PMID: 22124640.
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011 Aug 30;8:110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110. PMID: 21878126; PMCID: PMC3180276.
- Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science.* 2000 Dec 15;290(5499):2155-9. doi: 10.1126/science.290.5499.2155. PMID: 11118151; PMCID: PMC2175035.
- Elmer BM, McAllister AK. Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends Neurosci.* 2012 Nov;35(11):660-70. doi: 10.1016/j.tins.2012.08.001. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22939644; PMCID: PMC3493469.
- Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron.* 2009 Oct 15;64(1):93-109. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.001. PMID: 19840552.
- Spejo AB, Oliveira AL. Synaptic rearrangement following axonal injury: Old and new players. *Neuropharmacology.* 2015 Sep;96(Pt A):113-23. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.002. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25445484.
- Abul K, Abbas AHL, Shiv Pillai. *Imunologia celular e molecular.* 8^o ed. Rio de Janeiro, 2015.
- Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hkfelt T, Krre K, Lind H, Cullheim S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 21;101(51):17843-8. doi: 10.1073/pnas.0408154101. Epub 2004 Dec 10. PMID: 15591351; PMCID: PMC539738.
- Zanon RG, Oliveira AL. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Exp Neurol.* 2006 Aug;200(2):521-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.03.004. Epub 2006 Apr 21. PMID: 16631171.
- Zanon RG, Cartarozzi LP, Victrio SC, Moraes JC, Morari J, Velloso LA, Oliveira AL. Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010 Oct;36(6):515-34. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01095.x. PMID: 20831746.
- Cartarozzi LP, Perez M, Kirchoff F, Oliveira ALR. Role of MHC-I Expression on Spinal Motoneuron Survival and Glial Reactions Following Ventral Root Crush in Mice. *Cells.* 2019 May 21;8(5):483. doi: 10.3390/cells8050483. PMID: 31117227; PMCID: PMC6563038.
- Incio RF, Zanon RG, Verinaud L, de Oliveira AL. Interferon beta modulates major histocompatibility complex class I (MHC I) and CD3-zeta expression in PC12 cells. *Neurosci Lett.* 2012 Apr 4;513(2):223-8. doi: 10.1016/j.neulet.2012.02.046. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22387456.
- Mohsenzadegan M, Fayazi MR, Abdolmaleki M, Bakhshayesh M, Seif F, Mousavizadeh K. Direct immunomodulatory influence of IFN- β on human astrocytoma cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015 Apr;37(2):214-9. doi: 10.3109/08923973.2015.1014559. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25689952.
- Mehling M, Simon P, Mittelbronn M, Meyermann R, Ferrone S, Weller M, Wiendl H. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):111-9. doi: 10.1007/s00401-007-0231-8. Epub 2007 May 31. PMID: 17541610,...