

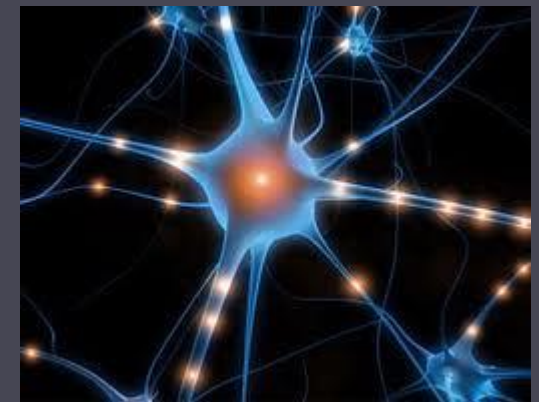
Universidade Federal de Pelotas
Curso de Graduação em Biotecnologia
Disciplina de Cultura de Tecido



CULTIVO DE CÉLULAS NEURAIS



Josiane Tessmann
Marina Valle
Patrícia Trentin



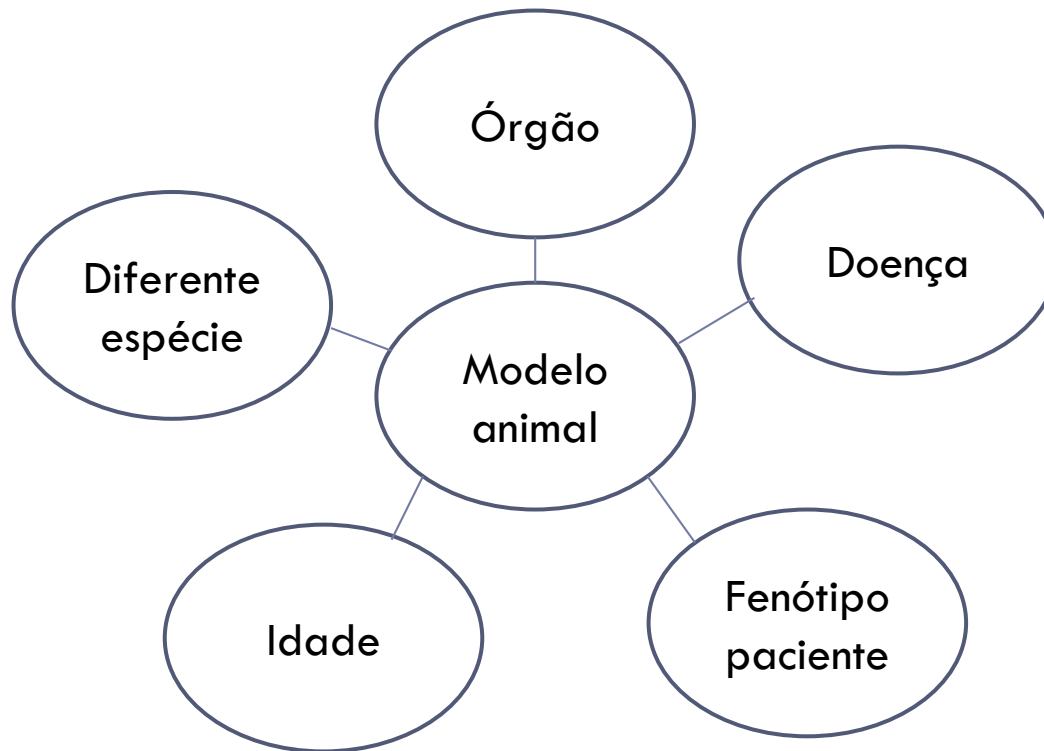
- Introdução
- Modelos de estudo
- Cultura de células:
microglia, astrócito, oligodendrócito e neurônios
- Limitações
- Células tronco neurais

□ Neurogênese



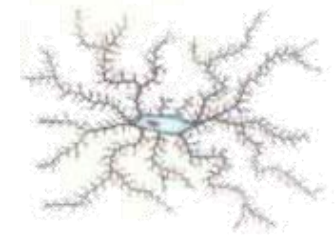
Introdução

- Estudo sobre função, sinalização e terapias neurais



Cultura de células neurais adultas humanas

- Método de gota em suspensão - 1940
- Dissociação mecânica e enzimática – 1960
- Marcadores Imunocitoquímicos
 - Astrocitos: Glutamina sintase, Proteína ácida glial fibrilar
 - Microglia: EBM/11, Leu-M5
 - Oligodendrocitos: Galactocerebrosídeos
 - Fibroblasto: Fibronectina
- Imortalização



Micróglia

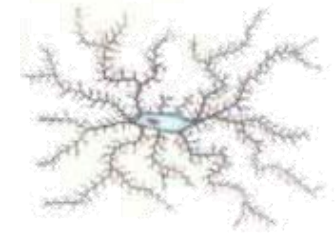
- São os macrófagos residentes no SNC.
- Correspondem de 5% a 20% das células gliais.

Estado Normal → marcador CD11b ↓ expressão de MHC

 Mudanças no microambiente

Estado Ativo → mudanças na morfologia, bioquímica e função
↑ expressão de MHC

Micróglia



- Micróglia ativada: citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6) ou moléculas pró-inflamatórias.

↑ danos no SNC

- Fenotipicamente e funcionalmente diversificado.

↪ resultados benéficos e prejudiciais

- Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington e epilepsia do lobo temporal

Isolamento

- Alta capacidade de aderência a garrafa de cultivo.
- Tipos não aderentes podem ser removidos.
- Varia de 2hr a 1 semana.
- Alto nível de pureza microglial.
- Pode ser purificado novamente.

Cultivo

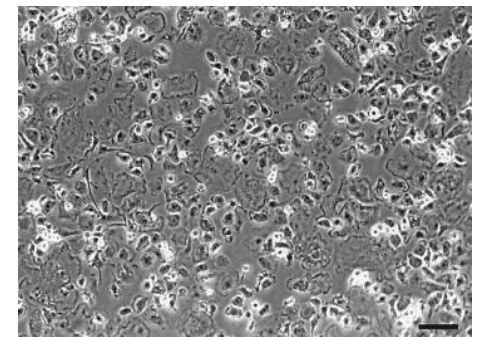
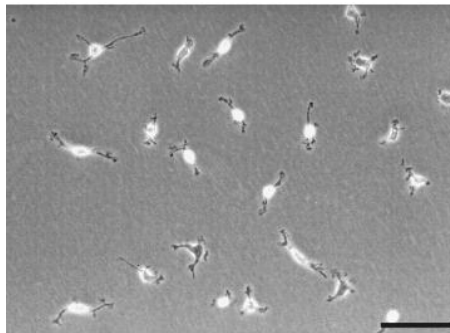
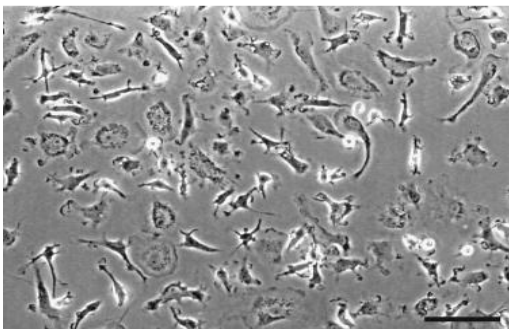
- Meios comerciais
- Cultivo com astrócitos – M-CSF (Fator estimulante de colônia de fagócito mononuclear)
- Cultivo apenas com M-CSF.

Caracterização

- Morfológicas
- Ensaio imunocitoquímico
- Funcionais

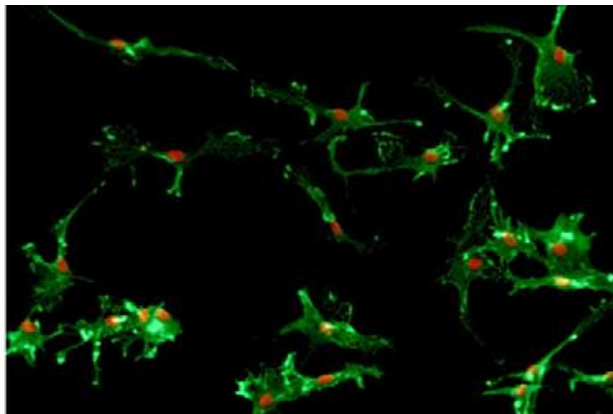
Morfológica

- 1. Grande achatado - oval.
- 2. Aparência longa, quase tubular ou em forma de bastonete.
- 3. Redondas grandes, com aparência vacuolizada.
- 4. Semelhante ao tipo III, mas com um perfil circular irregular.
- 5. Muito pequenas e redondas.
- 6. Forma de estrela.
- 7. Ramificada com ramos curtos.



Ensaio imunocitoquímico

- Marcadores que reconhecem CD45, CD68, CD11b and CD14.
- HLA-DP, DQ,DR(MHCII) and CD11c que indicam a capacidade de apresentar antígenos.
- Iba1 – peptídeo produzido pela micróglia ativada.
- PU.1 – presente em micróglia em níveis elevados.



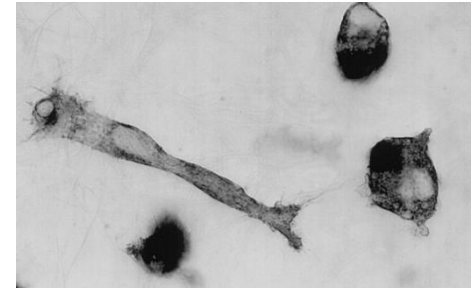
Marcador de CD45 (verde)
Marcador nuclear PU.1 (vermelho)

Ensaio imunocitoquímico

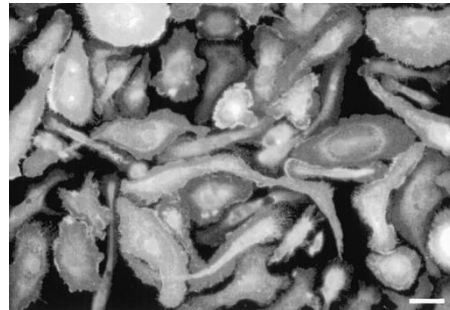
- Problema: nem todos os marcadores são específicos.
- Executar mais de um tipo de ensaio.
- Utilização de marcadores não – microglial.

Outras técnicas...

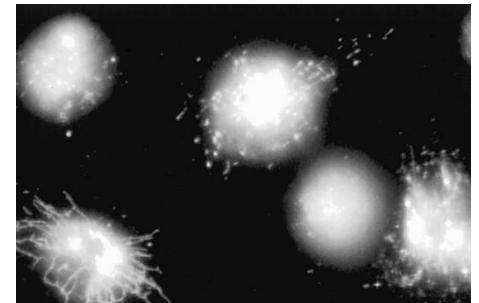
- Griffonia simplicifolia Lectin Stain



- Receptores Scavenger



- Imunocitoquímica Usando Anticorpo F4/80



Ensaio Funcionais

- Função Fagocitária - utilizando esferas de látex.
- Motilidade - altamente móveis, movimento em tempo real.
- Proliferação – aumento na proliferação

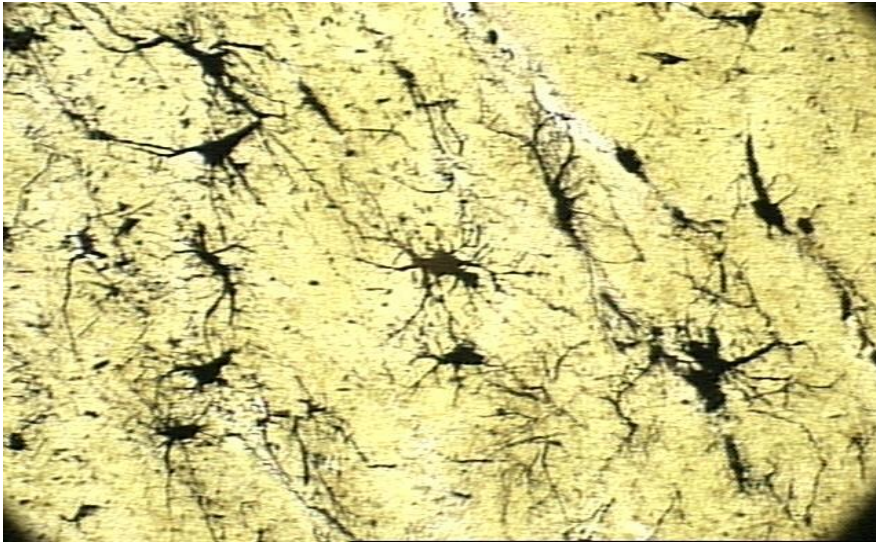
Aplicação

- Testar potenciais agentes anti-inflamatórios;
- Benefícios de anti- inflamatórios – ibuprofeno;
- Alzheimer
- Parkinson – alguns estudos revelam que a micróglia pode desempenhar um papel de seletividade por neurônios DA (Mastroeni et al., 2009).

Astrócitos

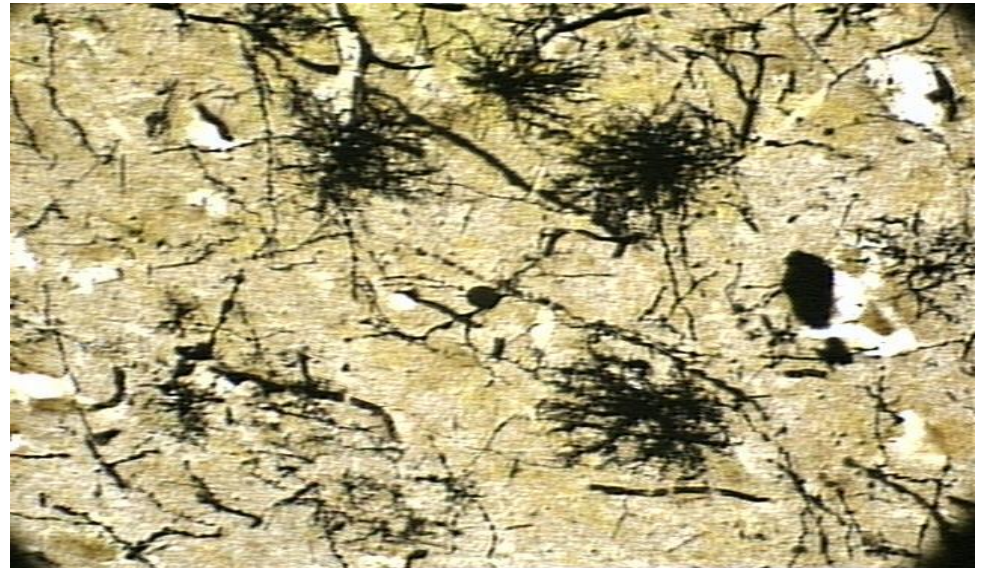
- São vários tipos de células em forma de estrela (de onde lhes vem o nome: *astro*= estrela, *cito*= célula).
- Os astrócitos, são as células da neurógliia que possuem as maiores dimensões. Existem dois tipos de astrócitos: os protoplasmáticos e os fibrosos.
- Os astrócitos protoplasmáticos predominam na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos predominam na substância branca do cérebro.

Astrócito Fibroso



<http://www.nucleodeaprendizagem.com.br/>

Astrócito Protoplasmático



<http://www.nucleodeaprendizagem.com.br>

Os astrócitos, desempenham funções muito importantes, como a sustentação e a nutrição dos neurônios.

- Além disto evidências provam que estes desempenham papéis importantes na manutenção que incluem:
 - dd
 - modulação da comunicação sináptica
 - função intracelular via gliotransmissão e junções tipo GAP
 - regulação do fluxo sanguíneo cerebral
 - manutenção do ambiente extracelular

- Podem sofrer alterações morfológicas e funcionais em resposta a doenças específicas, e estímulos têm sido implicados em:
- ✓ AD(DOENÇA DE ALZHEINMER), PD(DOENÇA DE PARKINSON), HD(DOENÇA DE HUNTINGTON) e ELA (esclerose lateral amiotrófica).

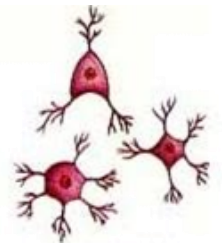
- Imunoquimicamente astrócitos podem ser rotulados com anticorpos contra GFAP, um marcador utilizado extensivamente para este tipo de célula.
- Ou em combinação com outros marcadores astrocíticos tais com; glutamina sintetase ou vimentina.
- Uma característica de astrócitos adultos é que eles têm uma baixa taxa de proliferação basal, mas que pode ser aumentada em resposta a IFN.

- ❑ Astrócitos tendem a se concentrar em mecanismos celulares ou processos imunes / inflamatórios em geral, ao invés de uma doença específica .
- ❑ No contexto de inflamação, os pesquisadores examinaram a expressão de receptores específicos e os efeitos de citocinas e outros mediadores inflamatórios do modo como eles podem regular a ativação de astrócitos.

- ❑ Por exemplo, o receptores metabotrópico do glutamato em astrocíticos tem se mostrado em sinergia com a IL-1 para aumentar a produção da IL-6, citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que ele pode desempenhar um papel na regulação das respostas inflamatórias no cérebro.

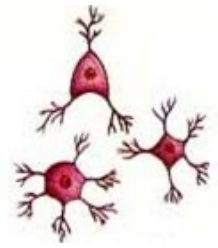
- ❑ Estudos sugerem que os astrócitos desempenham um papel central na manutenção de um estado inflamatórios. No entanto, os astrócitos também podem ser neuroprotetores.
- ❑ Isto tem sido demonstrado por um estudo mostrando que a ativação de Toll-like receptor-3 em astrócitos ,induz a expressão de uma série de mediadores neuroprotetores que poderiam melhorar a sobrevivência neuronal, salientando assim a diversidade de papéis desenvolvidos por astrócitos no cérebro.

Oligodendrócitos



- Responsáveis pela formação, e manutenção da bainha de mielina dos axônios do SNC.
- Condução rápida do impulso nervoso.
- Representam 30% da glia.
- Doenças inflamatórias desmielinizantes do SNC.

Oligodendrócitos

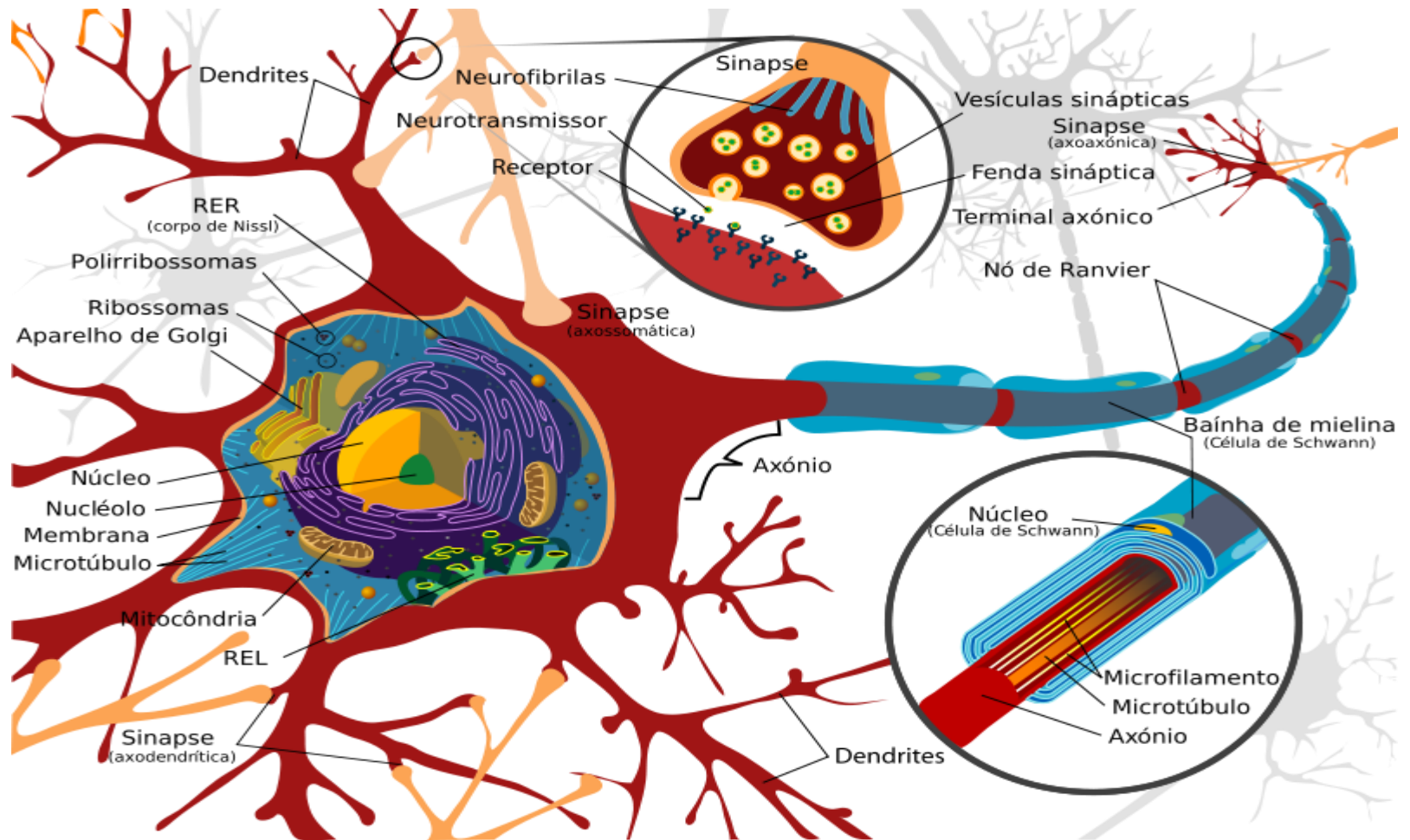


- Isolamento - falta de aderência
- Morfologicamente – células pequenas e redondas que começam a estender os processos depois de alguns dias em cultura.
- Marcadores – galactocerebroside (GC); 2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNPase); proteína básica de mielina.
- População mista de oligodendrócitos em culturas.

Aplicação

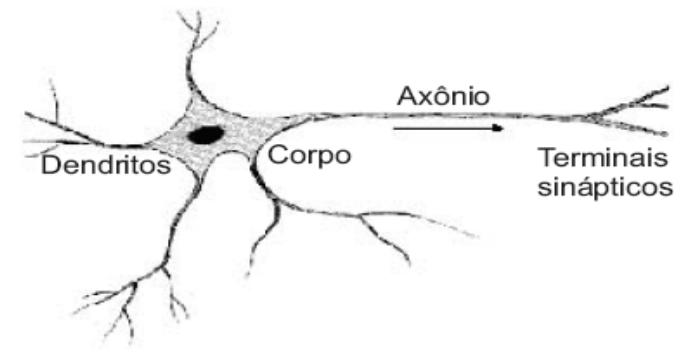
- Principalmente estudos para EM.
- Oligodendrócitos + citocinas como (TNF) = danos nucleares (D'Souza et al., 1995).
- TNF se liga a um de seus 'receptores morte' que levam a morte celular.
- IFN, foi considerada que ele poderia mediar a expressão de faz.
- Oligodendrócitos + IFN = oligodendrócitos mais suscetíveis a apoptose (Pouly et al., 2000).

Neurônios



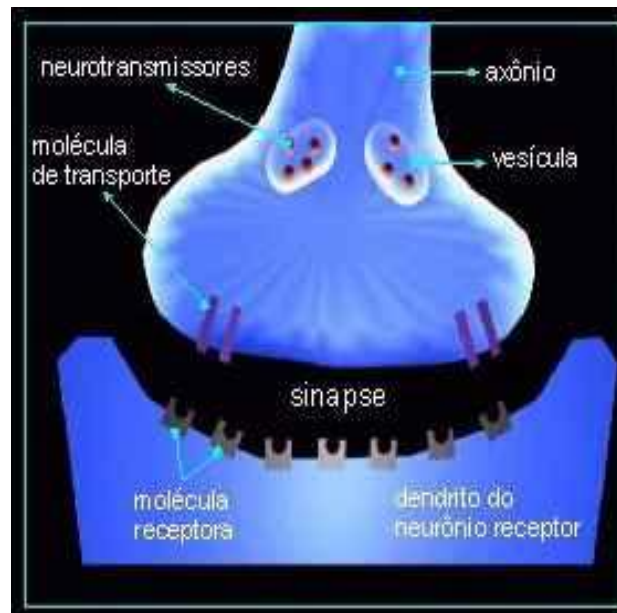
- Neurônios, ou células nervosas, são células altamente especializadas no SNC que processam e transmitem informações.
- A perda de neurônios e sua conectividade é a causa central dos transtornos cerebrais, tais como AD, PD, HD .

FIGURA 1
Representação simplificada de um neurônio



- ❑ O neurônio pode ser considerado a unidade básica da estrutura do cérebro e do sistema nervoso.
- ❑ A membrana exterior de um neurônio toma a forma de vários ramos extensos chamados dendritos, que recebem sinais elétricos de outros neurônios, e de uma estrutura a que se chama um axônio que envia sinais elétricos a outros neurônios.


- ❑ O espaço entre o dendrito de um neurônio e os telodendritos de outro é o que se chama uma fenda sináptica: os sinais são transportados através das sinapses por uma variedade de substâncias químicas chamadas neurotransmissores.




- ❑ Os neurônios recebem continuamente impulsos nas sinapses de seus dendritos vindos de milhares de outras células.
- ❑ Os impulsos geram ondas de corrente elétrica (excitatória ou inibitória; cada uma num sentido diferente) através do corpo da célula até a uma zona chamada a zona de disparo, no começo do axônio.

- A doença depende sobre a localização e a função dos neurônios sensíveis.
- Compreensão dos mecanismos de toxicidade neural e pesquisas de formas para se proteger contra a morte celular neuronal é um tema central na pesquisa em neurociência.
- Protocolos para isolar neurônios do cérebro humano adulto foram publicados , embora existam poucos quando comparados com estudos utilizando culturas de células gliais.

- ✓ Este pode ser um indicativo da complexidade de seu isolamento e manutenção em cultura, seu fenótipo pós-mitótico e sua sensibilidade às mudanças no ambiente.
- ✓ Métodos de isolamento de tecidos frescos ou congelados para biópsia e / ou post-mortem de tecidos utilizados para dissociação mecânica e filtração, seguido por centrifugação de densidade para obter frações celulares contendo neurônios .

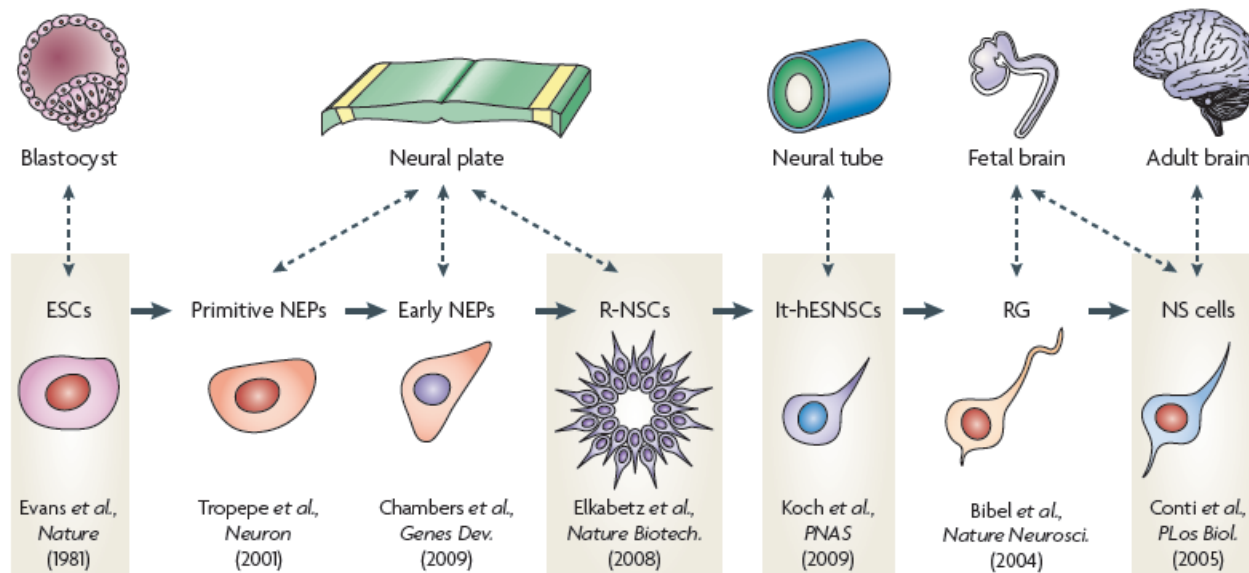
- 
- ✓ Mais recentemente, pesquisadores demonstraram a capacidade de manter a cultura dos neurônios humanos adultos a partir de tecido cirúrgico, utilizando protocolos desenvolvidos anteriormente para os neurônios de ratos adultos.

- ❑ Fibroblastos humano recombinante, fator de crescimento e hormônio esteróide dehidroepiandrosterona 3 – sulfato, em neurônios de roedores adultos, os pesquisadores descobriram que em cerca de 40% dos casos, em média de 20% das células viáveis foram imunopositivas para o neurofilamento neural e proteína associada microtúbulos (MAP) -2 e Tau e poderia ser mantido em por muitas semanas em cultura .

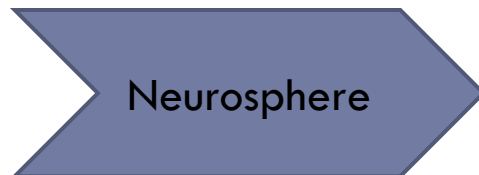
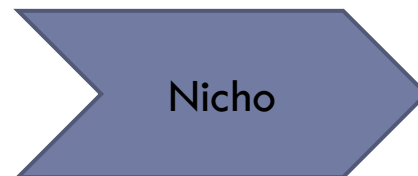
- 
- A porcentagem de neurônios que manteve seu fenótipo e função na cultura pode ser aumentada para cerca de 80% por enriquecimento usando uma classificação imunomagnética DNA linker- técnica.

Células tronco neurais (NSC)

- Auto-renovação
- Multipotência
- Capacidade de gerar/regenerar tecido

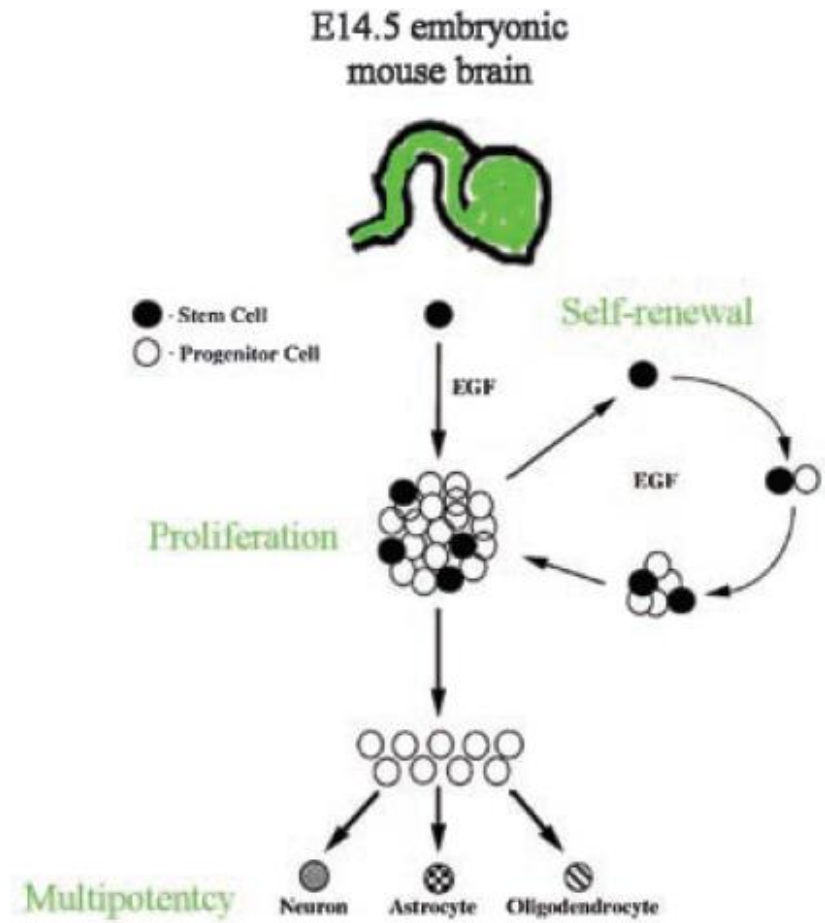


Cultivo celular



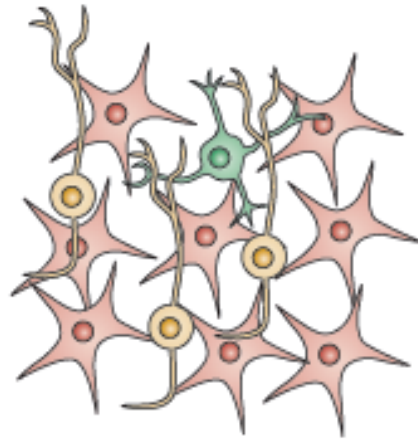
Neurosphere (NS)

- Descrita em 1992 [Reynolds e Weiss]
- Teoria: NS são susceptíveis de ser NSCs
- Auto-renovação e multipotência



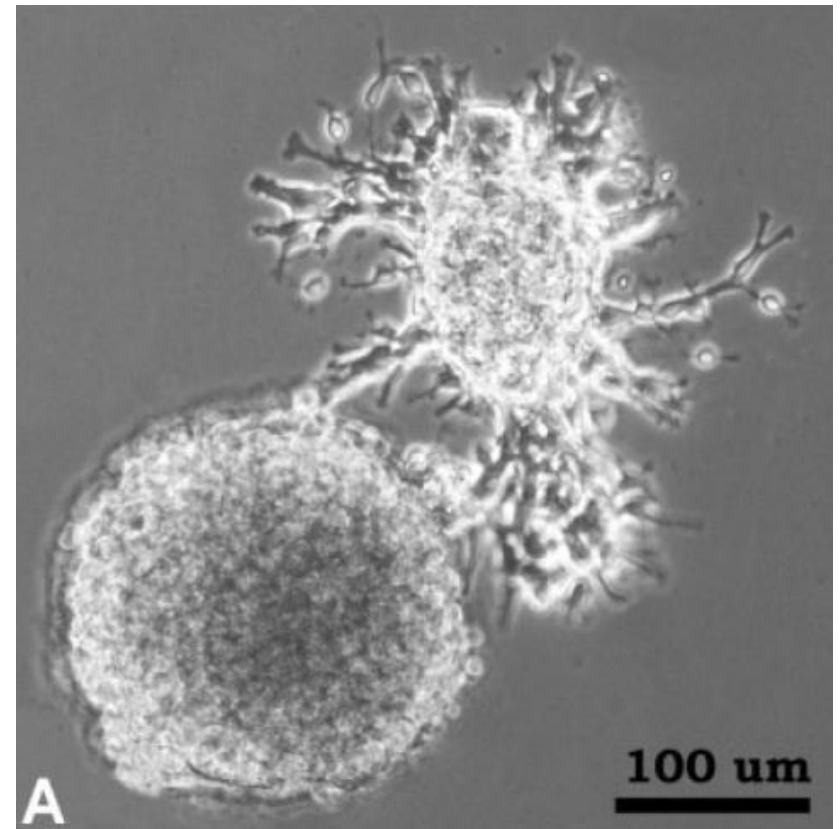
Neurosphere (NS)

- Diferentes tipos celulares (heterogeneidade)
- Sem organização espacial
- Interações célula-célula não específicas
- Estrutura tridimensional



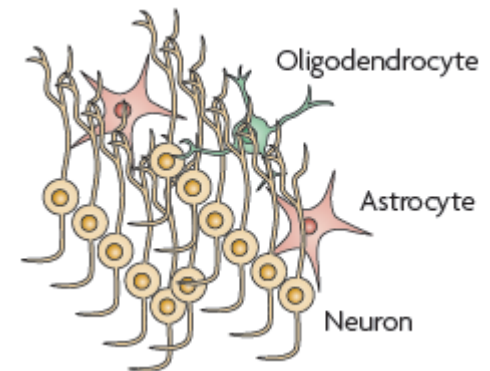
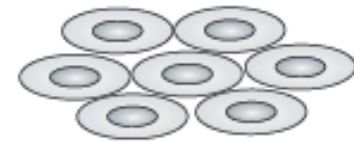
Perspectivas NS

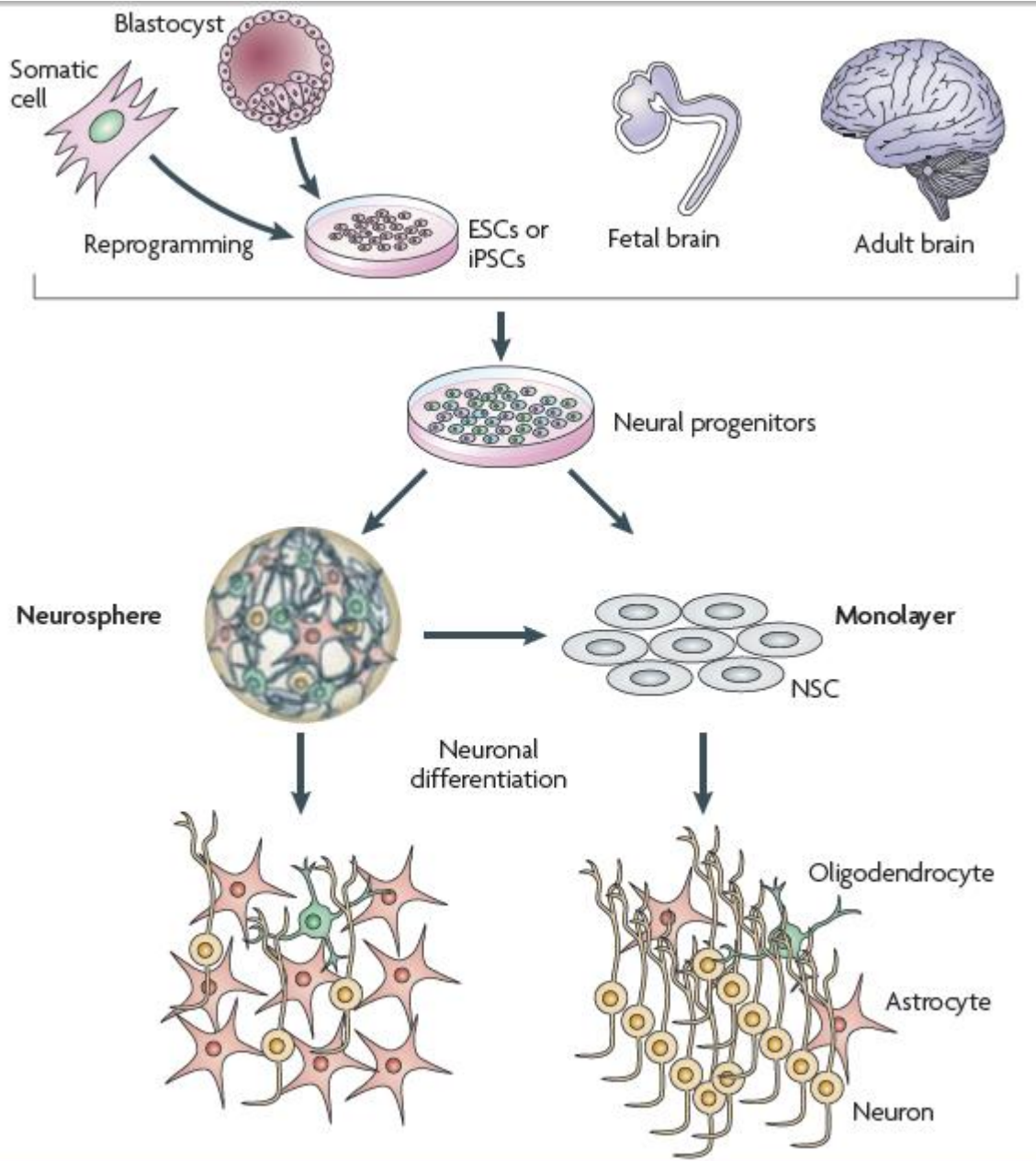
- Natureza dinâmica do nicho NSCs
- Estímulos ambientais
- Marcadores definidos para NSCs



Monolayer

- NS + EGF e FGF2
- Derivação e propagação
- Alta competência
- Bidimensional
- Homogeneidade da população aderente
- Minimizar a diferenciação espontânea





Aplicações

□ Terapia celular → Doenças degenerativas

1. Gerar células (quantidade e especificidade)
2. Considerar degeneração ambiente / sobrevivência
3. Regenerar circuitos

Referências

- Ahmed, Sohail. The Culture of Neural Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* v.106, pg 1-6, 2009, Singapura.
- Conti, Luciano; Cattaneo, Elena. Neural stem cell systems: physiological players or *in vitro entities*? *Nature Reviews*, v. 11, p 176-188, 2010, Itália.
- Dobrenis, Kostantin. Microglia in Cell Culture and in Transplantation Therapy for Central Nervous System Disease. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, v. 16, p. 320-344, 1998.
- Gibbons, Hannah M; Dragunowa, Mike. Adult human brain cell culture for neuroscience research. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 42, p. 844–856, 2010, Nova Zelandia.
- Ponomarev, Eugene D; Novikova, Marina; Maresz, Katarzyna; Shriver, Leah, P; Dittel, Bonnie, N. in the resting state. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance *Journal of Immunological Methods*, p. 32-46, 2005.
- Rosenstiel, Philip; Lucius, Ralph; Deuschl Günther; Sievers, Jobst; Wilms, Henrik. From Theory to Therapy: Implications From an In Vitro Model of Ramified Microglia. *Microscopy Research and Technique*, v. 54, p. 18–25, 2001.
- Saura, Josep. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *Journal of Neuroinflammation*, 2007.
- Mitrecic ,Dinko; Gajovic ,Srec Ko; Pochet1 ,Roland. Toward the Treatments with Neural Stem Cells: Experiences from Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Anatomical Record* v.292 pg.1962–1967, 2009, Croacia.

Referências

- <http://anatpat.unicamp.br/taneutecnervnl.html>
- <http://www.nucleodeaprendizagem.com.br>
- http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Complete_neuron_cell_diagram_pt.svg
- <http://www.scielo.br>
- <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-nervoso/neuronios-6.php>
- <http://www.hcanc.org.br/index.php?idTipoCancer=32&page=14>

Obrigada!

