



Papel da ativação do fator de transcrição NRF2 na diferenciação de células SH-SY5Y mediada por Ácido Retinóico.

Introdução

Ácido Retinóico (AR), um derivado de Vitamina A com alta atividade biológica, é bem conhecido pela sua importância no desenvolvimento de tecidos e na diferenciação celular. As propriedades morfogênicas desta molécula vêm sendo usadas em diferentes terapias, desde doenças neurodegenerativas até alguns tipos de câncer como leucemia promielocítica e neuroblastoma. Entretanto, grande parte das vias de sinalização responsáveis pelos efeitos do AR permanecem desconhecidas. Para investigar tais vias, utilizamos a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y que, quando tratadas com doses farmacológicas de AR, passam por fases iniciais de diferenciação neuronal. Estudos recentes mostram a participação de espécies reativas e estresse oxidativo em efeitos subsequentes do tratamento com AR nesta célula. Também foi demonstrado que a ativação do fator de transcrição NRF2, uma das principais vias redox-sensíveis, possui relevância para o efeito morfogênico mediado pelo AR.

Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo investigar as vias de regulação do NRF2 assim como o envolvimento das mesmas na viabilidade e diferenciação de células SH-SY5Y tratadas com AR.

Metodologia

Cultura celular

Células da linhagem SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo meio DEMEM/F12 (1:1) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução de antibiótico/antimicótico 1x (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas em uma incubadora umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂.

Ensaio

Para medir a ativação do NRF2 foi usado o kit Signal Antioxidant Response (ARE) Reporter Assay (Luciferase) da Qiagen e western blot. A produção intracelular de espécies reativas foi quantificada indiretamente pela oxidação da molécula 2',7'-Dichlorofluorescina (DCFH). A viabilidade celular foi medida pelos ensaios de Sulforhodamina B como medida de porcentagem de células viáveis, extravasamento de LDH no meio de cultura como medida de morte celular e capturação de iodeto de Propídio.

Resultados

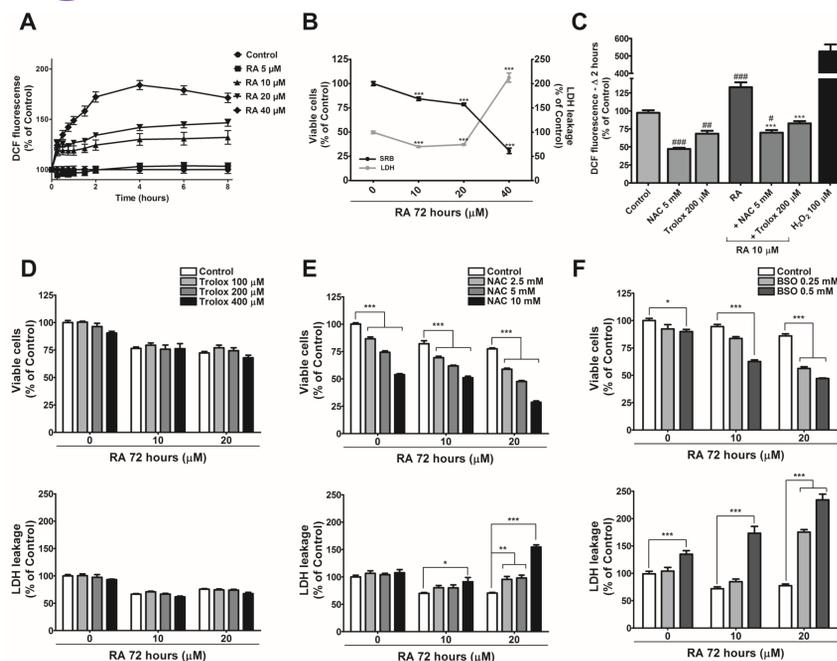


Figura 1. Tratamento com NAC diminui proliferação do neuroblastoma e aumenta a citotoxicidade do AR. (A) Monitoramento do fluorescência do DCF por 8 horas após o tratamento das células SH-SY5Y com doses crescentes de AR. (B) Viabilidade das células SH-SY5Y 72 horas depois de incubação com 10, 20 e 40 uM de AR. (C) Aumento na fluorescência do DCF no intervalo de duas horas (Δ 2 horas) em células tratadas com AR com ou sem o pré-tratamento com NAC e trolox. (D) Porcentagem de células viáveis e extravasamento de LDH depois de 72 horas de tratamento com Trolox, (E) NAC e (F) BSO combinados com AR.

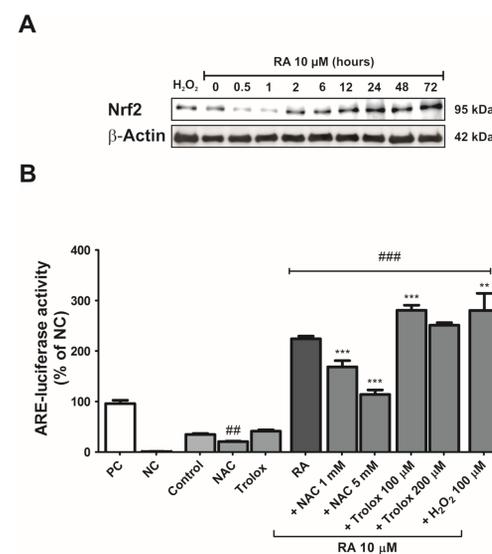


Figura 2. Ativação de NRF2 induzida pelo AR é atenuada pelo NAC. (A) Curva tempo-resposta do imunocônteuo de NRF2 em células SH-SY5Y exposta a 10 uM de AR. (B) Atividade de ARE-luciferase 24 horas após tratamento com AR combinado com NAC e Trolox. # = diferente do controle e * = diferente do AR.

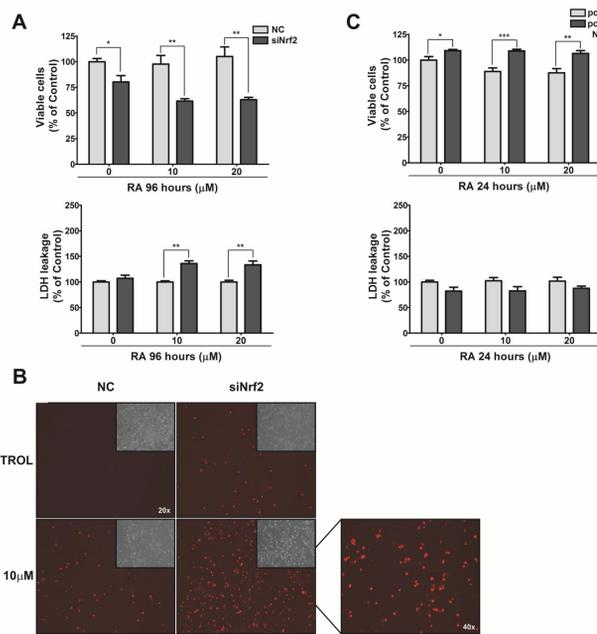


Figura 4. Ativação do NRF2 em células SH-SY5Y é importante para a proliferação celular e para a sobrevivência ao tratamento com AR. (A) Porcentagem de células viáveis e extravasamento de LDH 96 horas após tratamento com AR em células transfectadas com siRNA para NRF2. (B) Imagens de capturação de Iodeto de Propideo em células com NRF2 diminuído. (C) Porcentagem de células viáveis e extravasamento de LDH 96 horas após tratamento com AR em células transfectadas com pcDNA_NRF2 (NRF2 superexpresso).

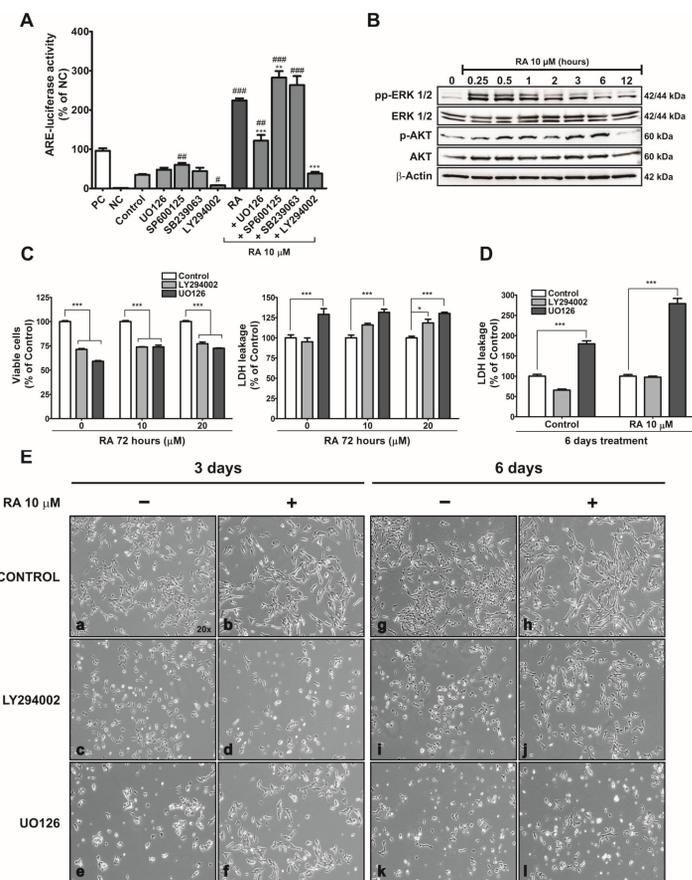
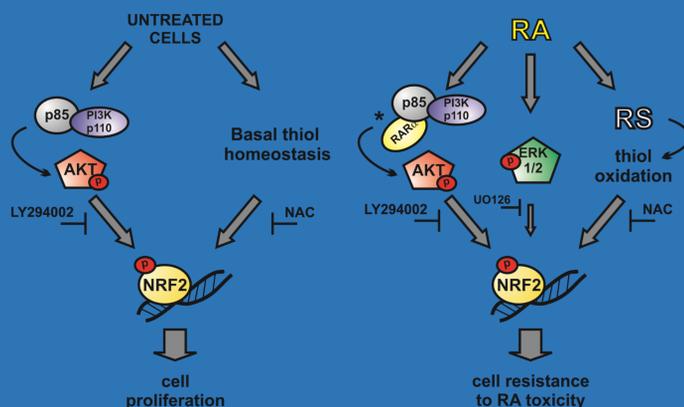


Figura 4. Ação do AR sobre ERK 1/2 e PI3K regula a ativação de NRF2, sobrevivência celular e neurogênese. (A) Atividade de ARE-luciferase 24 horas após tratamento com AR combinado com os inibidores farmacológicos para as vias MEK/ERK1/2 (UO126), p38MAPK (SB203580), JNK1/2 (SP600125) and PI3K/Akt (LY294002). # = diferente do controle e * = diferente do AR. (B) Western blot representando curva tempo-resposta da fosforilação de ERK 1/2 e AKT mediada pelo tratamento com 10 uM de AR. (C) Viabilidade celular (SRB e LDH) 72 horas após tratamento com AR combinado com LY294002 e UO126. (D) Atividade de LDH no meio de cultura 6 dias após tratamento com AR combinado com LY294002 e UO126. (E) Fotos de contraste de fase de células SH-SY5Y tratadas com AR e co-tratadas com LY294002 e UO126 por 3 e 6 dias.

Conclusão



Estes dados correlacionam a atividade de NRF2 com a proliferação das células de neuroblastoma assim como sua resistência ao tratamento com AR. Sendo assim, esta via de sinalização pode ser um alvo em potencial para otimizar respostas de neuroblastoma a quimioterapia assim como a otimização de protocolos de diferenciação neuronal *in vitro*.