



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Diferenciação *in vivo* de células-tronco mesenquimais de
placenta humana em fenótipo neural e seu potencial
terapêutico para o tratamento de Acidente Vascular
Cerebral**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva

Departamento de Biologia Celular,
Embriologia e Genética – CCB/UFSC

MARISTELA MARIA MARTINI

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética –
CCB/UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martini, Maristela Maria

Diferenciação in vivo de células-tronco mesenquimais de placenta humana em fenótipo neural e seu potencial terapêutico para o tratamento de Acidente Vascular Cerebral / Maristela Maria Martini ; orientador, Márcio Alvarez Silva - Florianópolis, SC, 2013.

88 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Célula-tronco mesenquimal. 3. Diferenciação neural. 4. Placenta humana. I. Silva, Márcio Alvarez. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Diferenciação *in vivo* de células-tronco mesenquimais de
placenta humana em fenótipo neural e seu potencial
terapêutico para o tratamento de Acidente Vascular
Cerebral**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Neurociências, Área de Concentração II –
Neurobiologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva

Departamento de Biologia Celular,

Embriologia e Genética – CCB/UFSC

MARISTELA MARIA MARTINI

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética –

CCB/UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2013

MARISTELA MARIA MARTINI

**“DIFERENCIAÇÃO *IN VIVO* DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA EM
FENÓTIPO NEURAL E SEU POTENCIAL
TERAPÊUTICO PARA O TRATAMENTO DE ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL”.**


Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 19 de fevereiro de 2013.



Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues

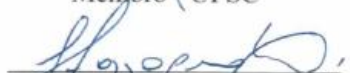
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

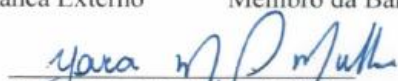

Prof. Márcio Alvarez da Sila
Orientador – UFSC


Prof. Andreza Fabro de Bem
Membro - UFSC


Prof. Cristine Maria Bressan
Membro-UFSC


Prof. Fabricio D. Mozzaquatro
Membro da Banca Externo


Prof. Mari Cleide Sogayar
Membro da Banca Externo


Prof. Yara Maria Rauh Müller
Membro - UFSC

“Muito obrigada a você que iluminou os meus olhos, que enriqueceu a minha mente, que encheu de amor e ternura o meu coração. Que me animou, que sorriu para mim, que me deu a mão. Muito obrigada a você, não importa quantos nomes você tenha”.

(Autor desconhecido).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Márcio Alvarez Silva, pela constante orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho. Pela amizade, carinho, pelo apoio.

A DEUS, por ter me dado forças e ânimo durante a realização de minhas tarefas.

A minha família, por compreender minha ausência, tanto no dia-a-dia quanto em datas especiais. Pelo constante apoio e carinho que sempre me deram. À minha irmã Graci pela amizade, carinho, pelas conversas e conselhos, por estar sempre perto e disponível para as horas boas e ruins.

Ao meu marido Juliano, que sempre esteve do meu lado me dando apoio, carinho e força. Obrigada por entender meus dias de mau humor. Por cuidar de mim e estar do meu lado quando eu mais precisei; por tudo que passamos neste último ano, mas mesmo com tantas dificuldades, continuamos unidos e felizes. Eu te amo!

Aos meus sogros, que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todas as dificuldades que passei. Pelo carinho, amizade, amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de apoio técnico e pelo apoio financeiro aos projetos.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), PRONEX/CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro aos projetos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI, Brasil), pela bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro aos projetos.

Aos amigos e professores Márcio e Andréa, pela amizade, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos, muito obrigada!

Aos professores Giordano e Ricardo, pelo apoio, pelos ensinamentos e carinho.

A amiga Gio que sempre esta ao meu lado, pelas risadas e cervejinhas no final de semana. À todos amigos, pelas risadas, pelos finais de semana, pela companhia.

Ao pessoal do Hospital Veterinário, em especial ao Mateus e Ewerton, pela amizade, carinho, conversas e risadas. Por compreender minhas ausências.

Ao Nivaldo, pela constante disponibilidade em resolver as nossas dúvidas e dificuldades.

Galera do laboratório: difícil falar... Obrigada a todos pela ajuda, apoio, conversas, risadas, pela amizade. Obrigada em especial à todos que confiaram a mim o voto e título de miss simpatia do laboratório....

A Andréa, pelas dicas, por ajudar a tirar dúvidas ao longo dos experimentos.

Bem, se esqueci de alguém por favor me perdoe, é a correria de final de tese.

A TODOS, obrigada pelo carinho, compreensão, amizade. Pelas festas, pelos churrascos, momentos de descontração e alegrias. Pelas longas conversas, pelos segredos confiados. Por dividirem os momentos tristes e alegres, pelos conselhos. Pelo apoio e paciência, pelos risos e lágrimas. Com certeza sem todos vocês eu não estaria aqui!!!! OBRIGADA!

RESUMO

As células-tronco (CTs) são células indiferenciadas com habilidade de se autorrenovar, e que em condições apropriadas podem gerar diversos tipos celulares maduros. As células da placenta possuem características morfológicas, imunofenóticas e funcionais, similares as células tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea (MO), porém é improvável que estas células possuam o mesmo potencial de diferenciação e proliferação de CTs embrionárias. Estas células são ainda de origem fetal e podem ser superiores a CTs somáticas em muitos aspectos. Juntamente com o seu fácil acesso, ausência de problemas éticos e abundância celular, as CTMs da placenta podem ser uma alternativa atrativa de progenitores de CTs para pesquisa básica e aplicações clínicas. O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacitação no Brasil, trazendo altos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS), sendo então de grande importância estudos que permitam melhorar este quadro. Também é importante o estudo do microambiente, pois este e as CTs regulam-se de forma dinâmica e também, torna-se relevante o estudo de fatores de crescimento que podem estar envolvidos na diferenciação das CTMs onde são escassos os estudos. Nesta tese investigamos o potencial de diferenciação das CTMs de placenta humana, *in vitro* e *in vivo*, utilizando modelo de co-cultura e AVC respectivamente. Para alcançarmos nossos objetivos, foram realizadas culturas de CTMs de placenta humana, bem como cultura mistas de cerebelo e córtex de ratos neonatos. Foram realizados experimentos de co-cultura para verificação da importância do microambiente neural na diferenciação de CTMs, bem como injeção de CTMs em animais que sofreram lesão causada pelo AVC para possível regeneração da área lesionada. Também investigamos os fatores de crescimento expressos pelas culturas mistas que poderiam estar envolvidos no processo de diferenciação de CTMs para fenótipo neural. As análises dos experimentos se deram por RT-PCR e imunofluorescência, utilizando marcadores de células precursoras neurais, células gliais e neurônios. Nossos resultados demonstram que as CTMs quando em microambiente favorável, têm a potencialidade para diferenciar-se em fenótipos

neurais, estes resultados são vistos quando as CTMs são co-cultivadas com culturas mistas de cerebelo e córtex de ratos neonatos, bem como quando injetadas no encéfalo de animais lesionados experimentalmente por AVC, demonstrando a potencialidade das CTMs da placenta humana na diferenciação neural. Além de apresentarem expressão gênica, estas células possuem a expressão protéica de Nestina, GFAP e B-Tubulina III e também as alterações morfológicas necessárias na diferenciação. Sugerimos a participação na diferenciação o fator de crescimento EGF e transcrição FOXD3 que deixam de ser expressos em culturas mistas de córtex após o co-cultivo com CTMs. Este trabalho demonstrou que CTMs de placenta humana possuem interação com o microambiente indutivo, podendo apresentar morfologia neural; e quando enxertadas em animais que sofreram lesão isquêmica, podem migrar para o local da lesão e diferenciar em células neurais *in situ*, podendo assim ter utilização terapêutica na medicina regenerativa.

Palavras chave: Células-tronco mesenquimais. Placenta humana. Diferenciação neural.

ABSTRACT

Stem cells (SCs) are undifferentiated cells with the ability to self-renew and under appropriate conditions may generate various differentiated cell types. Placental cells have morphological, functional and immunophenotypic similar to mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow (BM), but it is unlikely that these cells have the same potential for differentiation and proliferation of embryonic SCs. These cells are also of fetal origin and may be superior to somatic SCs in many ways. Along with its easy access, lack of ethical problems and cell abundance, MSCs from the placenta can be an attractive alternative for parents of SCs for basic research and clinical applications. The Cerebral Vascular Accident (CVA) is a major cause of death and disability in Brazil, bringing high costs to the National Health System (SUS), which is of great importance studies to improve this situation. Also important is the study of microenvironment, as this and SCs are regulated dynamically and also becomes relevant to the study of growth factors that may be involved in the differentiation of MSCs where there are few studies. We investigated the differentiation of human placenta MSCs *in vitro* and *in vivo* using co-culture model and experimental stroke in mice respectively. We performed cultures of MSCs from human placenta and carried out co-cultures on rat cerebellum or cortex cells from newborn rats. In co-culture assays the importance of the microenvironment was checked as an inducer for neural differentiation of MSCs. Alternatively the graft of MSCs in mice with moderate brain injury in experimental stroke to test for possible regeneration of damaged area. We also investigated growth factors expressed by mixed cultures that could be involved in the differentiation of MSCs to neural phenotype. We analyzed the expression or neural markers in MSCs by RT-PCR and immunohistochemistry. Our results demonstrated that MSCs in contact to brain microenvironment have the potential to differentiate to neural phenotypes. MSCs expressed nestin, GFAP and Tubulin III-B. These results were observed when MSCs were co-cultured with mixed cultures of cerebellum and cortex from newborn rats or when they were injected into the brain of animals injured by experimental stroke. This seemed to be under control of EGF and the transcription factor FoxD3 that failed to be expressed in mixed

cultures of cortex after co-culture with MSCs. This work demonstrated that MSCs from human placenta have inductive interaction with the microenvironment may present neural morphology, and when grafted into animals undergoing ischemic injury, can migrate to the site of injury and differentiate into neural cells in situ and may thereby have therapeutic use in regenerative medicine.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Human placenta. Neural differentiation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC: Acidente Vascular Cerebral
BEG/CCB/UFSC: Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/ Centro de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Santa Catarina
 β -Tubulina: Beta-Tubulina
CD: do inglês *Cluster of differentiation*
cDNA: DNA complementar
CEUA: Comissão de ética no uso de animais
CEPSH/PRPG: Comitê de ética em pesquisa com seres humanos/ Programa de Pós-Graduação
CFU-F: Unidade formadora de colônias fibroblásticas
cm²: Centímetros quadrados
CO₂: Dióxido de carbono
CT: Célula-tronco
CTE: Célula-tronco embrionária
CTH: Célula-tronco hematopoética
CTM: Célula-tronco mesenquimal
CTS: Célula-tronco somática
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EDTA: Etileno-dinitrilo-tetracético
EGF: Fator de crescimento epidermal
ESC: Células-tronco embrionárias
FGF: Fator de crescimento fibroblástico
FGFR1: Fator de crescimento fibroblástico – Receptor 1
FGFR2: Fator de crescimento fibroblástico – Receptor 2
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FoxD3: Fator de transcrição da família Forkhead
g: grama
GAPDH: Gliceraldeído 6 fosfato desidrogenase
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HU-UFSC: Hospital Universitário - UFSC
ICAM-1: do inglês *intercellular adhesion molecule*
IgG: Imunoglobulina G
IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
IP: Via Intraperitoneal

ISCT: Sociedade Internacional para Terapia Celular
IV: Infusão intravenosa
LACERT: Laboratório de Células-tronco e reparo tecidual
LIF: Fator inibidor da leucemia
MEC: Matriz extracelular
mg/kg: miligramas/quilo
mL: Mililitros
MO: Medula óssea
MSC: Célula-tronco mesenquimal
NeuN: Núcleo neuronal
NSE: Enolase específica de neurônio
OCT-4: do inglês *Octamer-4*
Pb: Pares de base
PBS: Tampão fosfato salino
PCR: Reação de polimerização em cadeia
RNA: Ácido ribonucleico
RT-PCR: Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SFB: Soro fetal bovino
SIH: Hemorragia intracraniana sintomática
SNC: Sistema Nervoso Central
STAT-3: Sinal transdutor e ativador de transcrição-3
SUS: Sistema Único de Saúde
TPA: Plasminogênio tecidual ativador da plasmólise intravenosa
TTC: Cloreto de trifeniltetrazólio
TXRD: Vermelho do Texas
UFC-F: Unidade formadora de Colônia fibroblástica
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
µL: Microlitros
WHO: Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem e potencialidade das CTs.....	21
Figura 2. Estrutura anatômica da placenta humana.....	25
Figura 3. Desenho esquemático ilustrando a cultura de células-tronco mesenquimais de placenta humana.....	40
Figura 4. CTMs: Morfologia das CTMs de placenta humana controles em cultura.....	45
Figura 5. Expressão gênica de CTMs controle, sem indução..	46
Figura 6. Desenho esquemático ilustrando a obtenção e cultura de células neurais de camundongos neonatos.....	48
Figura 7. Culturas mistas realizadas através da extração de cerebelo e córtex de camundongos.....	50
Figura 8. Controle de especificidade dos oligonucleotídeos utilizados em CTMs.....	51
Figura 9. Desenho esquemático mostrando o procedimento de co-cultura..	52
Figura 10. Co-cultura.....	57
Figura 11. Expressão gênica de CTMs co-cultivadas.....	58
Figura 12. Expressão de fatores de crescimento /receptores de fatores de crescimento e transcrição pelas células neurais de camundongos.....	60
Figura 13. Marcação da lesão causada pelo AVC com TTC..	64
Figura 14. Marcações das CTMs com Qtracker.....	65
Figura 15. Enxerto de CTMs em animais que sofreram lesão causada pelo AVC - nestina.	66
Figura 16. Animais que sofreram lesão causada pelo AVC sem enxerto de CTMs - nestina.....	67
Figura 17. Enxerto de CTMs em animais que sofreram lesão experimental causada pelo AVC - GFAP.....	68
Figura 18. Animais que sofreram lesão causada pelo AVC sem enxerto de CTMs - GFAP.....	69
Figura 19. Enxerto de CTMs em animais que sofreram lesão experimental causada pelo AVC - NSE.....	70

Figura 20. Animais que sofreram lesão experimental causada pelo AVC sem enxerto de CTMs - NSE..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários específicos humanos para realização das imunocitoquímicas.	42
Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos humanos utilizados para realização das RT-PCR.	43
Tabela 3. Anticorpos primários com especificidade por células de camundongos para realização das imunocitoquímicas.	49
Tabela 4. Anticorpos primários específicos humanos para realização das imunocitoquímicas.	53
Tabela 5. Oligonucleotídeos específicos humanos utilizados para realização das PCR.	54
Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados para realização das PCR. específicos para camundongos.....	55
Tabela 7. Anticorpos primários específicos humanos para realização das reações imunohistoquímicas.....	63

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 CÉLULAS-TRONCO.....	19
1.1.1 CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL	21
1.2 PLACENTA HUMANA	24
1.3 O MICROAMBIENTE.....	27
1.3.1 FATORES DE CRESCIMENTO E TRANSCRIÇÃO	28
1.3.2 CONTATO CELULAR	30
1.4 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	31
1.5 TERAPIA CELULAR.....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	39
4.1 OBJETIVO 1:.....	39
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.2.1 OBTENÇÃO DA PLACENTA HUMANA	39
4.2.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA	39
4.2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA	40
4.2.4 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA E TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)	42
4.3 RESULTADOS	44
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS	44
4.4 OBJETIVO 2:.....	46
4.4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	47

4.4.2 ANIMAIS	47
4.4.3 CULTURA DE CÉLULAS NEURAIS	47
4.4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA	48
4.5 RESULTADOS	49
4.5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS MISTAS DE CEREBELO E CÓRTEX DE CAMUNDONGOS	49
4.6 OBJETIVO 3 E 4:	51
4.6.1 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.6.2 CO-CULTURA	51
4.6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA	52
4.6.4 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA VIA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)	53
4.7 RESULTADOS	56
4.7.1 CO-CULTURAS	56
4.7.2 EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO	58
4.8 OBJETIVO 5:	60
4.8.1 GRUPO AVC	61
4.8.2 MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.8.3 OCLUSÃO DA ARTÉRIA MÉDIA CEREBRAL (OAMC) PARA REALIZAÇÃO DO AVC	61
3.8.4 ENXERTO DE CTMs	62
3.8.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DOS ENCÉFALOS	62
4.9 RESULTADOS	63
4.9.1 LESÃO DO AVC	64

4.9.2 MARCAÇÃO DAS CTMS PARA ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DESTAS A ÁREA DE LESÃO CAUSADA PELO AVC.....	64
4.9.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS CTMs INJETADAS EM ANIMAIS QUE SOFRERÃO LESÃO CAUSADA PELO AVC.....	65
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO a – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	86
ANEXO b – Artigo publicado	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS-TRONCO

“Os mamíferos são organismos complexos povoados por uma cidade cosmopolita de células. Assemelhando aos componentes individuais de uma metrópole, as células são os blocos de construção essenciais de todos os tecidos e órgãos em um organismo, que vão desde a construção delicada do ouvido interno ao fêmur resistente. Como tijolos em um arranha-céu, a identidade, o papel e posição de cada célula devem ser cuidadosamente regulados, para assegurar o desenvolvimento de órgãos funcionais. No entanto, enquanto os edifícios têm de serem concebidos e construídos, alguns tijolos em cada multicelular organismo podem mediar a autorrenovação, e são comumente identificado como células-tronco (CTs)” (JOEL SNG and THOMAS LUFTIN, 2012).

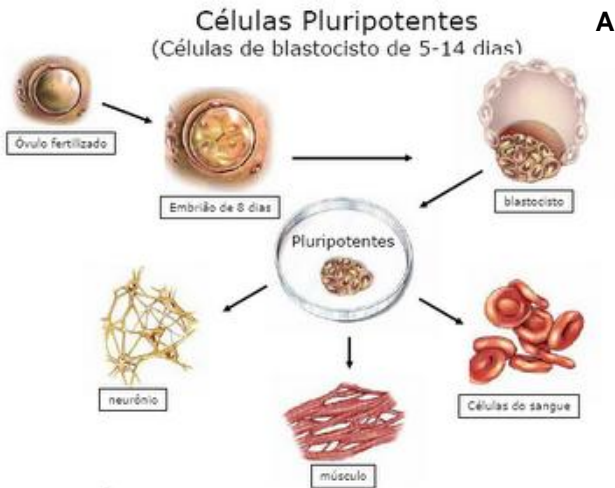
A produção e a manutenção da maioria das linhagens de células em organismos adultos são conduzidas através de uma cadeia de processos altamente regulados que envolvem a proliferação, migração, diferenciação e a maturação de células, sendo a célula precursora desta cadeia denominada de células-tronco (CTs) (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001). As CTs são células indiferenciadas e que em condições apropriadas podem gerar diversos tipos celulares maduros (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

A característica de autorrenovação das CTs é mantida tanto por divisões simétricas quanto assimétricas. Quando há divisão simétrica, as duas novas células geradas, células filhas, são idênticas à CT de origem ou precursora; na divisão assimétrica, somente uma célula será idêntica a CT de origem e a outra seguirá na via para a diferenciação (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

As CTs podem ser divididas em dois grandes grupos conforme o tecido de origem: Células-Tronco Embrionárias (CTEs) e Células-Tronco Somáticas (CTSs). CTSs são originadas dos mais diversos tecidos adultos, e fetais após a fase de gastrulação, enquanto CTEs são derivadas da massa celular

do blastocisto (Figura 1A) (TAUPIN, 2006).

Conforme a potencialidade de diferenciação, as CTs são classificadas em pluripotente ou multipotente. As CTEs são células pluripotentes porque podem originar todas as células do embrião, ou seja, são capazes de originar tipos celulares derivados dos folhetos embrionários: mesoderme, ectoderme e endoderme, porém não são consideradas totipotentes, pois não possuem a capacidade de gerar os tecidos extra embrionários necessários para o desenvolvimento fetal. Já as CTSs são CTs que dão origem a mais de um fenótipo sendo caracterizadas como células multipotentes (Figura 1B). Tradicionalmente são consideradas CTs comprometidas com tecidos ou órgãos específicos, e acredita-se que estão relacionadas principalmente com a manutenção da funcionalidade e reparo tecidual (SANDERS *et al.*, 2006).



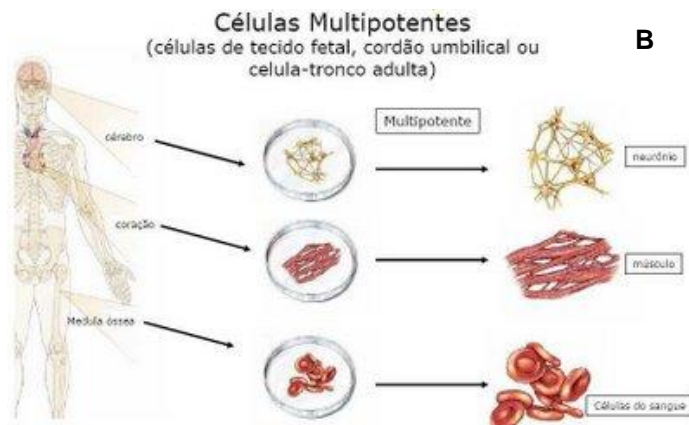


Figura 1. Origem e potencialidade das CTs. A) CTEs: CTs originadas da camada interna do blastocisto, pluripotentes. B) CTSs: CTs originadas de tecidos fetais e adultos, multipotentes.

Fonte: Mingroni-Netto e Dessen (2009).

Fukuchi e colaboradores descreveram que a medula óssea (MO) contém duas populações de CTs: as células-tronco hematopoiéticas (CTHs), que dão origem as células sanguíneas e as células-tronco mesenquimais (CTMs), que dão suporte as células estromais da MO e ainda, dão origem a derivados mesenquimais, tais como estroma medular e adipócitos. Já é bem descrito que as CTMs podem se diferenciar em diversos fenótipos, como adipócitos, condrócitos, osteócitos e cardiomiócitos (FUKUCHI *et al.*, 2004).

1.1.1 CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL

O termo CTMs foi definido por Caplan, em 1991. CTMs são definidas como a classe das CTs que tem o potencial de autorrenovação e diferenciação em linhagens de células múltiplas. A presença de CTMs na MO, foi hipotetizada por Cohnheim em 1860. Em 1920, Maximow e colaboradores postularam a importância do tecido do estroma da medula em apoiar o desenvolvimento e manutenção de sangue e órgãos

hematopoiéticos. No entanto, a confirmação da existência destas células ocorreu somente na década de 1960. Em 1960, Friedenstein foi o primeiro a demonstrar que as células do estroma podem ser isoladas a partir de todo aspirado de MO com base na diferenciação de adesão do tecido em garrafas de cultura de plástico (SABAPATHY *et al.*, 2012).

Próximo ao ano de 1970, estas células passaram a ser descritas como células fibroblastóides, e que além da MO poderiam também ser isoladas do baço. Vários estudos evidenciaram que estas células se comportavam de forma diferente quando comparadas com as CTHs da MO, porque demonstravam aderência e morfologia fibroblastóide em cultura. Além disso, foi descrito que estas células, em sistemas de cultura de células suspensas, formavam colônias constituídas inicialmente por uma única célula, denominada de unidade formadora de colônias fibroblásticas (CFU-F - do inglês, *Colony Forming Unit Fibroblast*). Após serem testadas e aplicadas em transplantes *in vivo*, estas células demonstraram capacidade de gerar alguns tecidos como osso, cartilagem, tecido adiposo e tecido fibroso, gerados experimentalmente, a partir de CTMs da MO (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

A demonstração destes fatos indicou que havia um segundo tipo de CT presente na MO, a qual foi denominada inicialmente de CT estromal da MO. Em 2005, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT – do inglês, *International Society for Cellular Therapy*) indicou uma nova nomenclatura para esta população de células fibroblastóides aderentes ao plástico isoladas de diferentes tecidos, com capacidade de diferenciação multipotencial: células mesenquimais estromais multipotentes. Esta sociedade ainda propõe que as CT compõem uma subpopulação destas células aderentes, e a sigla CTM (MSC – do inglês, *Mesenchymal Stem Cell*) pode ser utilizada para designar estas células. Atualmente, portanto, o conceito das CTMs agrega a maioria destas nomenclaturas citadas ao longo do tempo, sendo então a CTM uma população de células aderentes e fibroblastóides, com capacidade para diferenciar em no mínimo células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (DOMINICI *et al.*, 2006).

O painel de expressão imunofenotípica das CTMs já está caracterizado, porém não é específico desta população de células. Neste painel, está descrito que as CTMs não expressam

marcadores hematopoiéticos como CD45 e CD34. Também não expressam marcadores endoteliais como o CD31. Expressam positivamente, com intensidade variável, marcadores como CD73, CD90, CD105, Stro-1, e algumas moléculas de adesão, como CD29 e ICAM-1 (molécula de adesão célula-célula) (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Este painel de caracterização pode sofrer alterações de acordo com as diferentes fontes de obtenção, métodos de isolamento e cultivo destas células, isto porque as CTMs podem apresentar variações no seu padrão de expressão gênica de acordo com estas variáveis já citadas (GREGORY *et al.*, 2005). Além disso, a expressão destes marcadores *in vitro* nem sempre pode ser a mesma observada *in vivo* (GRONTHOS *et al.*, 2001).

Há grande interesse no estudo das CTMs devido à possibilidade da aplicação das mesmas na medicina regenerativa. A facilidade de isolamento, cultivo celular e a sua alta capacidade de expansão *in vitro*, tornam as CTMs muito atrativas para aplicação em protocolos experimentais em estudos de diferenciação celular, terapia celular e terapia gênica (CAPLAN, 2007).

Vale ressaltar que o seu potencial uso terapêutico é ainda acrescido de propriedades importantes, tais como: secreção de citocinas pro-angiogênicas e anti-apoptóticas, e propriedades imunossupressoras, essenciais na aplicação terapêutica devido as propriedades de diferenciação, tornando CTMs uma ótima possibilidade na medicina regenerativa. Dentre as várias fontes de CTMs, a principal é a MO é atualmente a mais utilizada. No entanto, devido à natureza invasiva na aspiração da MO e na capacidade proliferativa limitada, os esforços estão em curso para identificar fontes abundantes e confiáveis de CTMs para aplicações clínicas.

As CTMs podem ser obtidas de tecidos fetais e pós-natal. CTMs pós-natais ou adultas, são isoladas a partir de MO, sangue periférico, rins, pulmões, fígado, gordura, entre outros. CTMs fetais são isoladas da placenta, fluido amniótico, cordão umbilical e no sangue do cordão umbilical (SABAPATHY *et al.*, 2012). Alguns autores sugerem que as CTMs estão intimamente ligadas a rede vascular, possivelmente sob forma de pericitos, explicando sua prevalência nos diferentes tecidos (JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004; MEIRELLES; CHAGASTELLES, NARDI, 2006).

A placenta fornece uma das mais confiáveis e abundantes fontes de CTMs. Dado que os tecidos placentários são descartados após o nascimento, por conseguinte estes tecidos podem ser utilizados eficazmente para investigação, bem como a aplicação clínica visto que são mínimas as limitações éticas (SABAPATHY *et al.*, 2012).

1.2 PLACENTA HUMANA

A placenta humana é um anexo materno-fetal, contendo uma região de origem fetal, o córion viloso, e uma de origem materna, a decídua basal. Este anexo, além de inúmeras funções desempenhadas durante o desenvolvimento, também assume a função de órgão endócrino durante o desenvolvimento. Sua formação é um processo crítico na embriogênese, e o desenvolvimento normal e funcional da placenta é importante para o desenvolvimento embrionário e fetal (YEN *et al.*, 2005).

No organismo humano, aproximadamente no sexto e sétimo dia após a fertilização inicia a implantação do blastocisto no útero e conseqüentemente o início do desenvolvimento da placenta como uma estrutura de suporte para o desenvolvimento embrionário. Nesta etapa, o blastocisto é constituído por uma massa celular interna que mais tarde irá gerar o embrião, cordão umbilical e o epitélio amniótico, sendo este blastocisto também constituído por células do trofoblasto que circundam externamente a sua estrutura. Após a implantação do blastocisto na cavidade uterina, as células trofoblásticas proliferam de modo intenso, proporcionando a formação de uma bicamada trofoblástica: a camada interna denominada de citotrofoblasto, e a camada externa chamada de sinciotrofoblasto. Com a proliferação destas duas camadas celulares, são formados os vilos coriônicos da placenta e, por volta do quarto mês de gestação, a placenta está estruturalmente formada (ILANCHERAN; MOODLEY; MANUELPILLAI, 2009; MAROSTICA, 2011.).

Com relação a sua estrutura, a placenta a termo é dividida em duas regiões: uma porção fetal denominada de placa coriônica, e outra porção materna, a placa basal, sendo o único órgão humano constituído por células de dois indivíduos. O

processo de trocas fisiológicas entre o sangue da mãe e do feto ocorre entre as vilosidades coriônicas e os septos placentários (PAROLINI *et al.*, 2008) (Figura 2). Em nosso estudo, isolamos as CTMs da porção fetal da placenta, na região da placa coriônica, próximo da inserção do cordão umbilical.

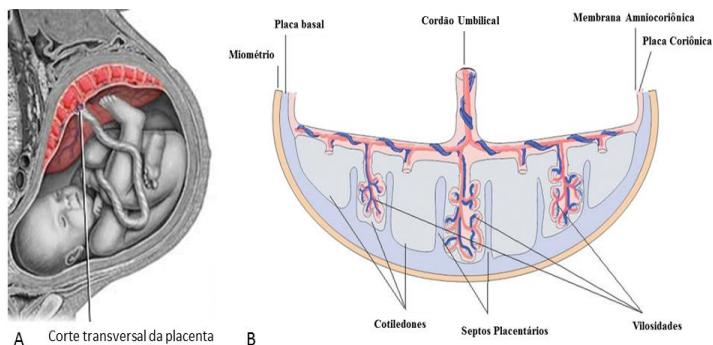


Figura 2. Estrutura anatômica da placenta humana. (A) Estrutura anatômica. (B) Esquema demonstrando as duas porções componentes da placenta humana: a parte fetal representada pela placa coriônica próxima ao cordão umbilical e a parte materna representada pela placa basal (Adaptado de PAROLINI *et al.*, 2008).

Diversos estudos apontam a placenta como uma promissora fonte de CTs. Já foram descritos o isolamento de diferentes populações de CTs a partir deste órgão, como as CTHs (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003), CTMs, progenitores endodermis e CTs epiteliais amnióticas (PAROLINI *et al.*, 2008).

Na placenta, diferentes partes, bem como o cordão e o sangue umbilical, abrigam CTMs. Estas podem ser isoladas, mecânica e enzimaticamente, e cultivadas *in vitro*. Entretanto, as CTMs isoladas das membranas amnióticas e coriônicas, são as que têm atraído maior atenção, por ser uma estrutura contendo uma população celular enriquecida em CTMs (SEMENOV *et al.*, 2010).

Da mesma forma que as CTMs derivadas da MO e outros tecidos, as derivadas da placenta devem seguir alguns critérios para serem assim classificadas. Estes critérios incluem: 1) a adesão ao plástico, 2) formação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (UFC-F), 3) expressão de marcadores de superfície descrito para CTMs, 4) potencial de diferenciação para uma ou mais linhagens celulares e 5) demonstrar origem fetal (PAROLINI *et al.*, 2008). Todavia, quanto ao último critério, estudos relatam que CTMs de origem materna possuem as mesmas características que as fetais, apresentando potencial de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens (IN'T ANKER *et al.*, 2004; SABAPATHY *et al.*, 2012).

A placenta é descartada após o parto, após ter executado sua função necessária de nutrir o embrião e o feto. As CTMs isoladas da placenta têm uma série de vantagens, embora seja improvável que estas possuam os potenciais de diferenciação e proliferação de CTEs. Ainda, estas células podem ser superiores em diversos aspectos quando comparadas as CTs, pois apresentam uma origem fetal. O principal deles é a baixa rejeição imunológica, que abre possibilidades de utilização clínica imediata. Nenhum procedimento invasivo é necessário para obtenção deste órgão, uma vez que este é expelido após o nascimento do neonato. Além disso, não apresenta os complexos conflitos éticos existentes quanto ao uso de CTEs, visto que o órgão é descartado após o parto (YEN *et al.*, 2005).

Pelo fato da placenta ser originada durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, reforça a possibilidade deste tecido conter células com grau de plasticidade semelhante às células dos estágios mais precoces do desenvolvimento embrionário. A placenta é fundamental para a manutenção da tolerância feto-materna durante a gestação, sugerindo que células presentes neste tecido apresentam características imunomodulatórias. Assim, estas células poderão ser capazes de diferenciar em tipos celulares variados e ainda, serem utilizadas em enxertos alogênicos (quando o órgão, tecido ou célula utilizada no transplante provém de outro indivíduo) (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

As CTMs obtidas da MO adulta são uma população escassa (aproximadamente 0,001% - 0,01%), sendo que este

número diminui significativamente com o avanço da idade (FUKUCHI *et al.*, 2004). Sabe-se hoje que as células da placenta possuem características morfológicas, imunofenotípicas e funcionais similares as CTMs da MO (ZHANG *et al.*, 2004). Devido as CTMs da placenta exibirem muitos marcadores das CTMs da MO, e devido sua capacidade de diferenciação, esta se torna uma fonte experimental atrativa para futuras aplicações clínicas (MIAO *et al.*, 2006).

O MICROAMBIENTE

O termo microambiente tem sido amplamente utilizado para designar a composição celular e molecular do local onde as células residem, o qual pode exercer influência em diferentes processos da vida celular, como: migração, proliferação, diferenciação ou o metabolismo típico da célula. O microambiente é normalmente constituído por fatores de crescimento, matriz extracelular (MEC) e pelas próprias células residentes no microambiente (KENDALL, 1991; FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004; ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006).

Há muito tempo tem sido sugerido que a maioria das células indiferenciadas de vertebrados responde aos constituintes do microambiente, durante a escolha do destino de diferenciação, através de eventos de interação (ou comunicação) celular (célula-célula, célula-matriz, célula-fatores). Esta comunicação celular é mediada por receptores celulares como integrinas, receptores acoplados a proteína G, canais iônicos, selectinas, caderinas, mucinas e certas imunoglobulinas, entre outros (LODISH *et al.*, 2002). Todos estes receptores agem de modo a provocar respostas específicas a uma gama de estímulos do microambiente.

Um sistema interessante para exemplificar a importância do microambiente é o nicho celular, modo como é chamado o microambiente de CTs em diferentes tecidos (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004). Neste nicho, CTs presentes em tecidos não embrionários se relacionam intimamente com células adjacentes, através de junções aderentes (SONG *et al.*, 2002), onde as células vizinhas a CT

são as principais responsáveis por modular sua migração, autorrenovação e diferenciação (ZHAO *et al.*, 2002).

Caracteriza-se, desta forma, um plano em que o microambiente e as CTs se regulam de forma dinâmica: os fatores produzidos por uma destas células (proteínas solúveis, MEC ou mesmo proteínas relacionadas a membranas celulares) influenciam a célula próxima e geram uma resposta mútua contínua (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

No encéfalo, os astrócitos são células importantes na formação do microambiente, uma vez que atuam na regulação da diferenciação celular (TRENTIN; MOURA NETO, 1995; LIM; ALVAREZ-BUYLLA, 1999; TRENTIN *et al.*, 2001; MARTINEZ; GOMES, 2005; TRENTIN, 2006), além das funções classicamente definidas como astrocitárias: regulação do metabolismo e da atividade neuronal adulta, suprimento de glicose, concentração iônica extracelular, fluxo sanguíneo cerebral, nível de neurotransmissores e liberação de substâncias neuroativas (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006).

Atualmente é evidente que as funções cerebrais dependem de uma íntima sinalização entre neurônio e células da glia, que se influenciam reciprocamente durante a diferenciação celular, desenvolvimento e metabolismo. Desta forma, os astrócitos guiam a migração neuronal e o crescimento axonal além de modularem a diferenciação neuronal (GARCIA-SEGURA; CHOWEN; NAFTOLIN, 1996). Essas interações neurônio-glia, particularmente neurônio-astrócitos, exercem um importante papel na manutenção da homeostase energética e plasticidade no cérebro (MENDES DE AGUIAR, 2008).

1.3.1 FATORES DE CRESCIMENTO E TRANSCRIÇÃO

O interesse nas pesquisas com CTs é crescente especialmente nos mecanismos moleculares envolvidos na determinação e diferenciação dos tipos celulares durante o desenvolvimento. A descoberta de fatores intrínsecos e extrínsecos que conduzem à diferenciação em ectoderma, endoderma e mesoderma durante os primeiros estágios do desenvolvimento; e a identificação dos fatores que são

responsáveis pela posterior diferenciação em tipos celulares mais restritos durante o desenvolvimento, permitirá uma compreensão melhor dos mecanismos que controlam a plasticidade fenotípica das CTs (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005). Foi demonstrado que astrócitos de cérebro fetal de ratos secretam alguns fatores de sinalização que direcionam a diferenciação de CTMs de MO para glia e neurônio (LEI *et al.*, 2007).

O fator de crescimento epidermal (EGF do termo em inglês *epidermal growth factor*) desempenha um papel importante na regulação do crescimento celular, proliferação e diferenciação. Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs do termo em inglês *fibroblast growth factor*) foram recentemente implicados como reguladores de vários processos-chave durante o início de desenvolvimento neural. Transcrições para FGFR1 e FGFR2 estão presentes durante o período de indução neural. (WALSHE-MASON, 1999).

FoxD3, fator de transcrição da família Forkhead, é altamente expresso em células de camundongos e em CTE pluripotentes do embrião. FoxD3 ativa o promotor de Nanog através de um intensificador de CTE-específicas. Nanog é também um efetor direto ajudante do LIF (fator inibidor da leucemia do termo em inglês *leukemia inhibitory factor*), STAT3 (sinal transdutor e ativador de transcrição-3) na manutenção da pluripotência de CTEs. Além disso, a sinalização BMP (Bone Morphogenetic Protein) também regula a expressão Nanog (SABIOSCIENCES, 2011)

O fator de transcrição FoxD3 tem múltiplas funções durante a embriogênese de vertebrados e na crista neural em desenvolvimento. A expressão de FoxD3 está presente em ratos e células-tronco humanas, em trofoblasto de camundongos. FoxD3 também é necessário e suficiente para a expressão de vários genes relacionados e/ou dependentes à via de sinalização Nodal que regulam, entre outros, o desenvolvimento da mesoderme. Vários grupos têm estudado em peixes a função neural do FoxD3 no desenvolvimento da crista neural e determinaram que FoxD3 é necessário para a diferenciação de derivados da crista neural, incluindo cartilagem craniofacial, neurônios periféricos, glia e células de pigmentação. As proteínas Nodal são conservadas e expressas em todos os vertebrados e necessitam de proteínas EGF-CFC como cofatores

(Chang, 2009).

O fator de transcrição Slug tem um papel essencial no desenvolvimento de linhagens neuronais derivadas de CTs. Os fatores de transcrição Snail e Slug são requeridos para a diferenciação neuronal e manutenção das CT neuronais, também são requeridos para a diferenciação de linhagens celulares como: adipócitos, condrócitos e osteoblastos.

1.3.2 CONTATO CELULAR

Cada tipo celular apresenta um conjunto de receptores proteicos que permite à célula responder a um conjunto de moléculas sinalizadoras correspondentes, produzidas por outras células. Estas moléculas trabalham em combinações para regular o comportamento celular; muitas células requerem sinais múltiplos para sobreviver, dividir ou ainda para diferenciar. No desenvolvimento embrionário, por exemplo, a sinalização dependente de contato tem um papel importante nos tecidos onde as células adjacentes, que são inicialmente semelhantes, precisam se tornar especializadas em diferentes fenótipos (ALBERTS *et al.*, 2002).

Foi demonstrado em experimento de co-cultura uma sinalização parácrina capaz de modular a diferenciação de CTMs em neurônios (MAURI *et al*, 2012). Esse fenômeno foi suportado pela observação que CTMs secretam fatores neurotróficos. Já é conhecido que as CTMs liberam uma grande variedade de substâncias tróficas, incluindo citocinas, quimiocinas e antioxidantes, que agem de forma parácrina para promover sobrevivência neuronal e diminuir a apoptose. Também já foi demonstrado que CTMs estimulam a proliferação astrocitária necessária para sobrevivência neuronal e diferenciação morfológica e funcional em co-cultura de neurônios hipocámpais de ratos (MAURI *et al*, 2012).

Em 2007, Lei e colaboradores demonstraram que CTMs de MO quando co-cultivadas sobre astrócitos, podem se diferenciar em células da glia, demonstrando que CTMs são uma população de CTs multipotentes, que podem diferenciar, em condições apropriadas, para fenótipo neural, dependendo do seu protocolo de indução.

Um efeito direto de CTMs em neurônios foi reportado por Fuhrmann e Coll, que demonstraram que CTMs indiferenciadas humanas são capazes de suportar e direcionar o crescimento axonal.

1.4 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O sistema nervoso pode ser afetado por muitas doenças, como: Parkinson, Alzheimer, e doenças genéticas, como Batten e Gaucher, sendo que a doença neural mais comum é o Acidente Vascular Cerebral (AVC) (ANDRÉ *et al.*, 2006).

O AVC foi definido pela *World Health Organization* (WHO) como sendo uma disfunção neurológica aguda, de origem vascular, seguida da ocorrência súbita ou rápida de sinais e sintomas relacionados ao comprometimento de áreas focais no cérebro (COSTA, SILVA E ROCHA, 2011).

No AVC ocorre uma interrupção da irrigação sanguínea no cérebro que pode se manifestar de duas formas: a causada por rompimento de um vaso (AVC hemorrágico) ou pelo bloqueio do vaso por um coágulo ou placa de gordura (AVC isquêmico). Em ambas as situações, os neurônios da região atingida morrem, resultando na perda da função correspondente à área afetada (TARANTINO E COSTA, 2011).

A incidência do AVC vem crescendo devido ao aumento da expectativa de vida, causando mudanças no estilo de vida da população. O AVC é a causa de 9% das mortes em todo o mundo, ficando em segundo lugar, depois apenas das doenças cardíacas isquêmicas. A proporção de mortes por AVC é de 10% – 12% em países ocidentais, sendo 12% dessas mortes em pessoas com menos de 65 anos. No Brasil, a distribuição dos óbitos por doenças do aparelho circulatório vem apresentando crescente importância entre os adultos jovens, já a partir dos 20 anos, assumindo patamar de primeira causa de óbito na faixa dos 40 anos e predominando nas faixas etárias subsequentes (COSTA, SILVA E ROCHA, 2011). No Brasil, a taxa de prevalência é de 156 casos a cada 100.000 habitantes, representando uma taxa de 6,2% e uma taxa de mortalidade de 111 óbitos a cada 100.000 habitantes.

Quanto ao prognóstico e reabilitação de pacientes com AVC, para os eventos isquêmicos, a mortalidade nos primeiros três meses de diagnóstico é de 15%. Dos pacientes que sobrevivem ao evento, 33% a 50% ficam com sequelas graves e a reabilitação pode durar de meses a anos. Com relação aos eventos hemorrágicos, 30% a 50% dos pacientes morrem nos primeiros 30 dias de diagnóstico. O risco de recorrência do evento é de 25% (RUFKA *et al.*, 2009).

O AVC é uma doença comum e de grande impacto na saúde pública mundial, por ser a principal causa de incapacidades neurológicas e de importantes disfunções motoras e cognitivas. Os sobreviventes do AVC geralmente têm de enfrentar incapacidades residuais tais como paralisia dos músculos, rigidez das partes do corpo afetadas, perda da mobilidade das articulações, dores difusas, problemas de memória, dificuldades na comunicação oral e escrita e incapacidades sensoriais (COSTA, SILVA E ROCHA, 2011).

Após o diagnóstico de AVC hemorrágico, a conduta terapêutica resulta em drenar o sangue extravasado, evitando o aumento da pressão intracraniana. No AVC isquêmico, dentre os vários fármacos administrados, o principal são os trombolíticos que visam dissolver o coágulo sanguíneo que interrompeu o fluxo sanguíneo. A janela de tempo para que os efeitos benéficos ocorram é muito pequena, de quatro a cinco horas após o AVC. Atualmente, 75% das pessoas que sofrem um AVC ficam com algum tipo de sequela (TARANTINO E COSTA, 2011).

Atualmente, o plasminogênio tecidual ativador da trombólise intravenosa (TPA) é a única terapia aprovada para AVC isquêmico, destinada a recanalização arterial. No entanto, o uso de tal terapia tem sido relativamente baixa, em parte devido a sua estreita janela terapêutica, mas também por causa de preocupações sobre o risco de hemorragia intracraniana sintomática (SIH), que pode estar associada com deterioração clínica e morte (COUGO-PINTO *et al.*, 2012).

O encargo financeiro e social de dependência funcional devido a doença cerebrovascular é um importante foco de discussão em saúde pública, particularmente entre os países com poucos recursos. Embora as taxas de mortalidade por AVC variam muito, países de baixa renda são os mais afetados. Apesar do crescimento econômico rápido em algumas regiões, o Brasil tem a maior taxa das Américas de mortalidade por AVC.

Uma revisão recente de fatores socioeconômicos e AVC revela evidências que sugerem uma forte relação entre situação socioeconômica e um aumento do risco de mortalidade por AVC. Outros agravos que resultam em sequelas mais severas pós-AVC: idade, AVC recorrente, gravidade, a localização anatômica da lesão cerebral, e ter um alto nível de dependência funcional de se libertar do hospital (FERNANDES *et al.*, 2012).

A eficácia de terapias baseadas no uso de CTs já é bem aceita em várias doenças neurológicas agudas como em danos traumáticos do cérebro e danos da medula espinhal (KRANZ, 2010). Tendo em vista que o sistema nervoso central (SNC) possui CTs em algumas regiões, como a zona subventricular e o hipocampo, pesquisadores têm procurado meios de utilizar este potencial para reparar os danos causados pelo AVC.

Lesões agudas no SNC induzem a proliferação de células progenitoras neurais em cérebros adultos, como uma tentativa endógena de autorreparação. Acredita-se que a introdução de CT exógenas possa agir em conjunto com as endógenas, provocando melhorias na zona lesionada (MILLER, 2006, LIU *et al.*, 2009).

1.5 TERAPIA CELULAR

No ano de 2000, surgiu o termo medicina regenerativa, que foi cunhado por Willian A. Haseltine, hoje utilizado para descrever maneiras de curar o corpo através da estimulação de células endógenas para reparar tecidos danificados, transplante de células ou tecidos de engenharia para substituir os doentes ou feridos. Determinado número de tecidos em mamíferos incluindo epitelial, medular e muscular apresenta algum grau de regeneração, mantendo a integridade do tecido, após a perda de células ou lesões, devido a normal renovação celular. Em outras espécies de mamíferos, incluindo humanos, lesões teciduais são normalmente reparadas por formação de tecido cicatricial fibroso. Assim, desvendar os mecanismos de regeneração pode eventualmente ajudar em métodos de terapia celular e a regeneração de tecidos. Os mecanismos moleculares subjacentes de regeneração não estão totalmente elucidados, no entanto, dois mecanismos gerais, mediados por CTs ou de

desdiferenciação de células linhagem específica têm um papel na regeneração (RIANZI, KWON, STANFORD, 2009).

Tem sido postulado que as CTMs podem ser eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas, seja por substituição de células perdidas, através de diferenciação em tecido neural funcional; modulação do sistema imunológico para evitar o agravamento da neurodegeneração, e/ou prestação de apoio trófico para o sistema nervoso doente. As CTs derivadas da MO são capazes de lograr o sistema imunológico alógeno, bem como supressão de respostas imunes dirigidas contra as células de terceiros, após administração infusão intravenosa (IV). Além disso, quando infundida na circulação, as CTMs têm a capacidade de migrar especificamente para locais de lesão cerebral, visando assim locais para a reparação neural (KEMP K. *et al.*, 2010). Também estes transplantes não resultam na formação de teratomas quando testados em ensaios clínicos e são relativamente seguros (SNG J. and LUFKIN T., 2012).

Estudos mostram que CTMs derivadas da MO, quando infundidas em ratos, migram para o cérebro lesionado e sobrevivem (XIONG, MAHMOOD, CHOPP, 2010). Em terapia com estas células em ratos que sofreram AVC, injetadas via intravenosa um mês após o ocorrido, demonstraram benefícios terapêuticos, incluindo uma recuperação significativa no comportamento e um aumento nas células em proliferação ao longo da zona subventricular. Estas CTMs também induzem células intrínsecas do parênquima a produzir fatores de crescimento. Estes fatores tróficos melhoraram a angiogênese e ocorre estabilização vascular na zona de fronteira da lesão, em que a maioria das CTMs que sobrevivem no cérebro estão localizados (XIONG, MAHMOOD, CHOPP, 2010).

As CTMs, juntamente com outros tipos de CTs e células progenitoras podem ter potencial para uso terapêutico em aplicações cardiovasculares. Estudos *in vivo* com animais mostraram resultados promissores em terapias cardíacas e vasculares, com CTMs promovendo a vascularização, podendo se diferenciar no tipo celular necessário (PARK *et al.*, 2007).

A utilização de CTMs em terapias celulares, tem sido investigada principalmente em pacientes afetados com doenças neurodegenerativas, em razão ao seu potencial de diferenciação em progenitores neuro-gliais. Proteínas como nestina e neurofilamento são expressos durante o desenvolvimento do

SNC em células neuroepiteliais. Tal expressão também ocorre em CTs neurais de mamíferos adultos, podendo ser usada para identificar, em cultura, progenitores neurais de adultos. Estudos com CTMs de placenta têm relatado a expressão de diversos destes marcadores neurais como nestina. Alguns destes marcadores são expressos quando as células são induzidas a expressar este fenótipo. No entanto, outros marcadores são expressos sem tratamento específico (TONDREAU *et al.*, 2004). Apesar deste mecanismo não ser ainda bem compreendido, os estudos com CTMs visando à diferenciação neural podem desempenhar um papel de suma importância na medicina regenerativa.

2 JUSTIFICATIVA

A doença que mais leva a óbitos em vários países, entre eles o Brasil, é o AVC, e é a principal causa de incapacitação do mundo. Na ocorrência deste, a agilidade no atendimento é essencial, isso porque o tamanho do dano está diretamente associado à sua extensão. Quanto maior a área, maiores as sequelas. O tratamento eficaz tem de ser realizado logo após a lesão, devido a esse fator, calcula-se que apenas 5% das pessoas chegam ao hospital dentro da janela de tempo prevista para o sucesso da terapia (TARANTINO e COSTA, 2011).

Segundo dados da secretaria de saúde, um paciente com AVC custa para o Sistema Único de Saúde (SUS), em média, R\$ 6 mil, valor que varia de acordo com a gravidade do caso. O paciente que recupera completamente o déficit neurológico terá necessidade de um período de internação curto (3 a 5 dias), a um custo de aproximadamente R\$ 640. Porém, nos casos em que o paciente fica com sequelas graves, o período de internação pode ser de mais de um mês, gerando um custo de R\$ 32 mil por paciente.

Neste contexto, faz-se necessário uma alternativa de tratamento que possa ser realizada após um maior tempo recorrido, com menor custo e que recupere os danos ocasionados pelo AVC.

As CTMs da placenta humana têm sido alvo de estudo para regeneração de células e tecidos, devido à capacidade de diferenciação destas células, estas podem ser importantes no uso terapêutico.

Estudos em nosso laboratório demonstraram que CTMs obtidas de placenta humana possuem potencialidade para diferenciação, e estas quando induzidas, podem se diferenciar em diversos fenótipos, como adipócitos e condrócitos. Com base nestas observações, nos perguntamos se as CTMs fossem mantidas em um microambiente neural, se poderiam se diferenciar para o fenótipo neural.

Com o fácil acesso à placenta humana, juntamente com a ausência de problemas éticos e abundância celular, as CTMs de placenta podem ser uma alternativa atrativa para obtenção de CTs para pesquisa básica e aplicações clínicas.

Neste mesmo contexto, o presente trabalho visa analisar o potencial de diferenciação das CTM da placenta humana *in situ*, utilizando para isso uma estratégia de injetar as CTMs na lesão causada pelo AVC, acompanhando sua migração até o local da área lesionada, bem como a ocorrência de sua diferenciação em células neurais. As CTMs também serão induzidas a diferenciar sob estímulo direto do microambiente neural, este fornecido por cultura de células neurais de cerebelo e córtex de camundongos. Este trabalho é desenvolvido sob essa ótica de investigação dos efeitos do microambiente neural na diferenciação de CTMs derivadas de placenta humana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho têm por objetivo avaliar a diferenciação *in vitro* e *in vivo* de células-tronco mesenquimais de placenta humana em fenótipo neural e seu potencial terapêutico para o tratamento de Acidente Vascular Cerebral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar as culturas de placenta humana;
2. Caracterizar as culturas primárias de cerebelo e córtex de camundongos;
3. Co-cultivar células da placenta humana sobre culturas primárias de camundongos, analisando como estas células se comportam quando em ambiente cerebral;
4. Análise dos fatores liberados pelas culturas primárias dos camundongos;
5. Avaliar a diferenciação de CTMs da placenta humana para o fenótipo neural *in vivo*.

4 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 OBJETIVO 1:

Caracterizar as culturas de placenta humana.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 OBTENÇÃO DA PLACENTA HUMANA

As placentas foram obtidas através de colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), no qual pacientes com saúde qualificada doaram suas placentas, após apresentação do termo de consentimento (Anexo a). Tal termo têm por objetivo esclarecer às doadoras, a linha de pesquisa, a segurança e seriedade com que esta será realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através de número de protocolo 1962/11-CEPSH/PRPG.

A placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril e térmico, contendo salina tamponada por fosfato (PBS) e encaminhada para cultura no Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (LACERT). Para realização das culturas, foi utilizada apenas uma pequena parte da região da placenta, localizada na parte fetal do anexo embrionário, próxima ao cordão umbilical.

Para realização das culturas de placenta utilizadas nesta tese, foram doadas 30 placentas.

4.2.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA

Fragmentos de placenta (aproximadamente 2 cm^2) foram dissociados mecanicamente e digeridos enzimaticamente com pancreatina, por aproximadamente 20 minutos, em temperatura ambiente. O tecido foi dissociado homogeneamente e submetido à centrifugação (500g) durante 5 minutos e o *pellet* ressuspenso em IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), penicilina/estreptomicina (Gibco) conforme orientações do fabricante. Logo após, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm^2 (Corning) e mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO_2 (Figura 3). Após 4 dias o meio de cultura foi trocado e as células não aderidas foram descartadas. A troca do meio ocorreu periodicamente (3-4 dias), sempre havendo remoção das células não aderentes, selecionando, assim, as CTMs por sua adesão ao plástico.

Após duas semanas de cultura, quando a monocamada estava confluenta (80 a 90%), as células aderentes foram retiradas usando solução de tripsina e EDTA, lavadas com PBS e re-plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL em IMDM suplementado com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina (passagem 1).

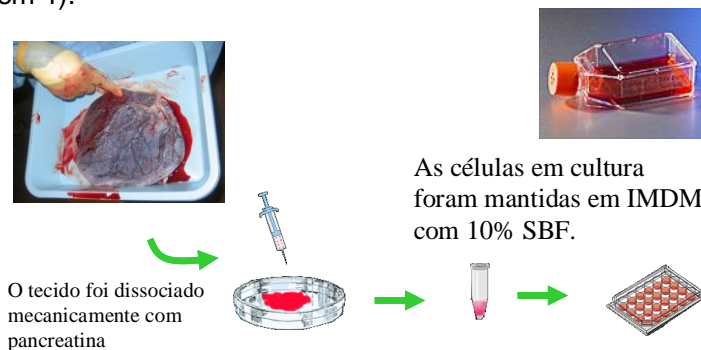


Figura 3. Desenho esquemático ilustrando a cultura de células-tronco mesenquimais de placenta humana.

4.2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA

Para análise morfológica, as células da placenta em passagem baixa, aproximadamente P4, e passagem alta, aproximadamente P12, foram visualizadas em microscópio de contraste de fases e invertido.

Para análise imunofenotípica, as culturas foram lavadas por três vezes com PBS 1x, fixadas com paraformaldeído 4% durante uma hora, e submetidas à reação imunocitoquímica, onde foram utilizados marcadores específicos para os diferentes fenótipos, incluindo principalmente marcadores de fenótipo neural, utilizando anticorpos específicos para células humanas.

As células foram fixadas durante 30 minutos em temperatura ambiente e lavadas posteriormente com PBS 2X, sendo 3 banhos de 5 minutos. Tais células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,25%), durante 20 minutos e lavadas 3 vezes com PBS Tween 20 (0,1%). Sítios não específicos foram bloqueados com 5% de SBF diluído em PBS. Logo após, estas células foram incubadas durante 1 hora, a temperatura ambiente em câmara úmida, com anticorpos primários específicos humanos para determinados fenótipos. Após, foram realizadas lavagens com PBS Tween e posteriormente as células foram incubadas com anticorpo secundário durante 1 hora, em temperatura ambiente.

O núcleo das células foi visualizado com o corante nuclear 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI), na concentração 1:1000, diluído em PBS, durante 1 minuto. Para as marcações de células humanas foram utilizados os anticorpos primários específicos para células humanas listados na tabela 1, previamente testados quanto a sua especificidade. Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ao Texas Red (TXRD) ou Alexa. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus BX 40.

Todos experimentos de imunocitoquímica constantes nesta tese foram realizados em triplicatas.

Tabela 1. Anticorpos primários específicos humanos para

FENÓTIPO	ANTICORPO PRIMÁRIO	DILUIÇÃO	FABRICANTE	SECUNDÁRIO
Precursor neural	Anti-nestina	1:100	Santa Cruz	GAM IgG1 Txred
Glial	Anti-GFAP (anti proteína fibrilar ácida glial)	1:50	Dako	GAM IgG1 Txred
Neuronal	Anti- β -Tubulina III	1:2000	Promega	GAM IgG1 Txred

realização das imunocitoquímicas.

4.2.4 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA E TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

As culturas foram preparadas segundo os procedimentos descritos anteriormente e após atingirem aproximadamente a P4 foram analisadas a expressão de diferentes genes através da extração de RNA total para ensaios de RT-PCR. O meio de cultura foi removido e os RNAs totais destas amostras foram purificados utilizando reagente TRIZOL™, de acordo com as orientações do fabricante. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total, obtido pela extração do RNA, utilizando um *Kit* para transcrição reversa ThermoScript RT-PCR System, conforme especificações do fabricante. Para a PCR foi utilizado o cDNA sintetizado e o produto da PCR foi visualizado em gel de agarose corado com *blue green* e fotografado. Foi analisada a expressão de genes expressos em células neurais e CTs: nestina, GFAP, β -tubulina III, Nanog e OCT-4 (Tabela 2) usando oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem exclusivamente as sequências humanas. Para todos os experimentos de RT-PCR foram realizados controle positivo das amostras com GAPDH, para confirmar a presença do cDNA, e controle negativo dos

iniciadores para descartar a possibilidade de contaminação dos mesmos.

Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos humanos utilizados para realização das RT-PCR.

Gene	Primers	Condições da PCR	Pb
Neuronal: β -Tubulina III	5'-AGATGTACGAAGACGACGAGGAG-3' 5'-GTATCCCCGAAAATATAACA CAAA-3'	34 ciclos: 58.5°C	31 2
Precursor neural: Nestina	5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3' 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'	35 ciclos: 64°C	20 8
Células gliais: GFAP	5'-GTGGGCAGGTGGGAGCTTGA TTCT-3' 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGACA-3'	34 ciclos: 65°C	38 7
Células indiferenciadas: Nanog	5'-TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT-3' 5'-GTTTCAGGATGTTGGAGAGTTC-3'	34 ciclos: 54°C	28 6
Células indiferenciadas: OCT-4	5'-CTCCTGAAGCAGAAGAGGATCAC-3' 5'-CTTCTGGCGCCGGTTACAGACCA-3'	34 ciclos: 58°C	39 5

Controle positivo: GAPDH	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC- 3'- 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTTC- 3'	34 ciclos: 60°C	22 6

4.3 RESULTADOS

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As CTMs controle, provenientes da placenta humana, quando em cultura, sem indução, selecionadas pela sua aderência a placa, apresentaram morfologia fibroblastóide, tanto em células de baixa passagem (P4), quanto de alta passagem (P12) (Figura 4A e 4B respectivamente). Através de imunocitoquímica, observamos que estas células expressaram Nestina (Figura 4C, D) e β -tubulina III (Figura 4E, F), mas não expressaram GFAP (não demonstrado). A expressão de Nestina e β -tubulina III ocorreu em células de morfologia fibroblastóide, sugerindo que não houve diferenciação para o fenótipo neural.

Devido não haver diferença morfológica e imunofenotípica entre as CTMs de alta e baixa passagem, passaremos a utilizar somente células de baixa passagem, aproximadamente P4.

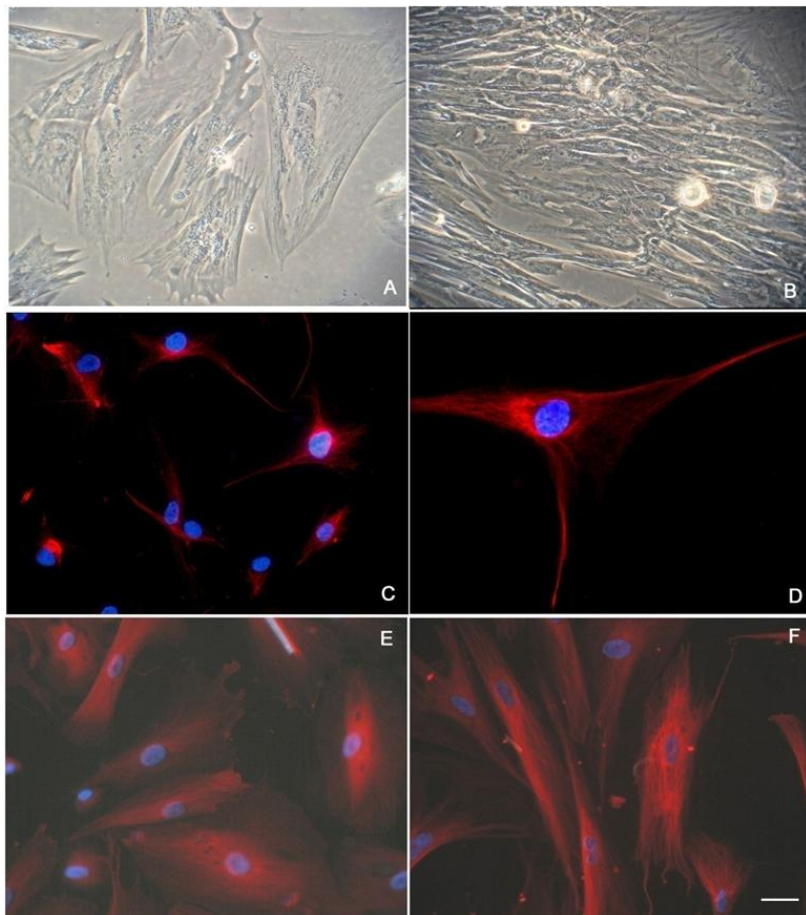


Figura 4. CTMs: Morfologia das CTMs de placenta humana controles em cultura. Em A células de baixa passagem e em B células de alta passagem. Microscópio de contraste de fases. As CTMs expressam marcadores como nestina (C,D) e β -tubulina III (E,F). C, E células de baixa passagem (P4). D, F células de alta passagem (P12). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho temos as marcações celulares e em azul os núcleos contra corados com DAPI. Barra: 40 μ m.

Também analisamos a expressão gênica das CTMs controle, em cultura, para os genes: β -tubulina III, nestina, GFAP, nanog, Oct-4 e GAPDH.

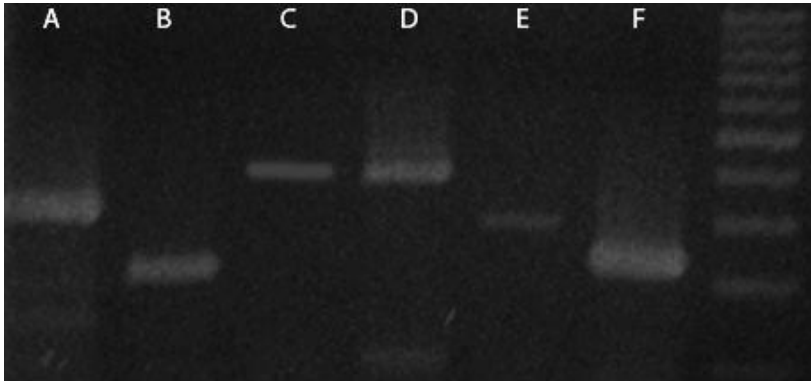


Figura 5. Expressão gênica de CTMs controle, sem indução. Expressão dos genes: A- neuronais (β -tubulina III), B- precursor neural (Nestina), C- células gliais (GFAP), D- células indiferenciadas OCT-4 e E- células indiferenciadas Nanog. Em F- Controle positivo GAPDH.

As CTMs da placenta humana em cultura expressaram os genes humanos mostrados na figura 5. A expressão dos genes Nanog e Oct-4 sugere a manutenção do estado da autorrenovação e pluripotência destas células, enquanto β -tubulina, nestina e GFAP a potencialidade para diferenciação, quando não colocadas sob indução em microambiente indutivo.

Observamos também que as CTMs não apresentaram a expressão protéica de GFAP, mas sim a expressão gênica, sugerindo que este gene poderá ser traduzido após uma indução.

4.4 OBJETIVO 2:

Caracterizar as culturas primárias de cerebelo e córtex de camundongos.

4.4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.2 ANIMAIS

Para a realização das culturas de células neurais foram utilizados camundongos da linhagem C57/BL6, recém-nascidos (dia 0) de ambos os sexos. Os animais foram obtidos do biotério setorial do BEG/CCB/UFSC. Os animais foram sacrificados por decapitação, de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pelo CEUA (337) e UFSC (23080.007341/2005-81). Foram utilizados 40 animais.

4.4.3 CULTURA DE CÉLULAS NEURAIS

As culturas primárias de células neurais foram obtidas de cerebelos e córtex (separadamente) de camundongos neonatos. Após decapitação os encéfalos foram retirados da caixa craniana em fluxo laminar, em PBS-glicose. Os cerebelos e córtex foram separados e as meninges retiradas. O tecido foi picotado e dissociado manualmente com pipeta pasteur em PBS-glicose. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF, glicose (0,6%) e glutamina (2mM). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, preparadas previamente com poli-l-lisina em solução 0,1mg/mL de poli-l-lisina em PBS, na densidade de $2,5 \times 10^5$ células (Figura 6).

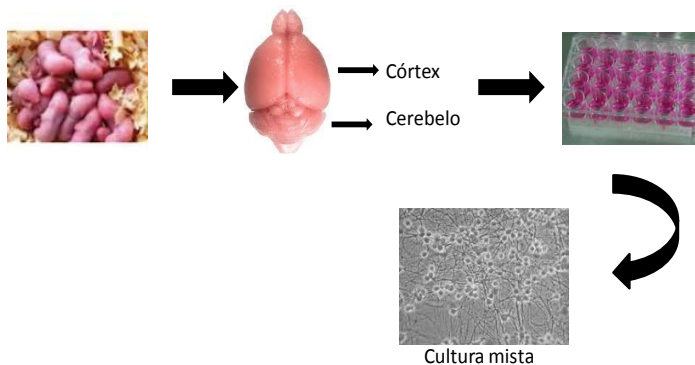


Figura 6. Desenho esquemático ilustrando a obtenção e cultura de células neurais de camundongos neonatos.

4.4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA

Para análise imunofenotípica, o procedimento utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, apenas os anticorpos aqui utilizados reconhecem células animais.

O núcleo das células foi visualizado com o corante nuclear 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI). Para as marcações de células neurais foram utilizados os anticorpos primários específicos para células animais, listados na tabela 1, previamente testados quanto a sua especificidade. Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ao Texas Red (TXRD) ou Alexa. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus BX 40. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Anticorpos primários com especificidade por células de camundongos para realização das imunocitoquímicas.

FENÓTIPO	ANTICORPO PRIMÁRIO	DILUIÇÃO	FABRICANTE	SECUNDÁRIO
Glial	Anti-GFAP (anti proteína fibrilar ácida glial)	1:400	ABCAM	GAR IgG Fitc
Neuronal	Anti- NeuN Anti- β -tubulina III	1:50 1:2000	Chemicon Promega	GAM IgG1 Txred

4.5 RESULTADOS

4.5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS MISTAS DE CEREBELO E CÓRTEX DE CAMUNDONGOS

Após a realização das culturas mistas, foi analisada a expressão fenotípica destas, para análise dos tipos celulares presentes, em cerebelo de camundongos (Figura 7 A, C e E) e córtex (Figura 7 B, D e F). Estas culturas expressam marcadores de células neuronais como β -tubulina III (Figura 7A e B) e NeuN (Figura 7E e F), marcadores gliais GFAP (Figura 7C e D) .

Estes resultados demonstraram que as culturas de células realizadas da extração do cerebelo e córtex de camundongos podem ser utilizadas para mimetizar um nicho neural, por apresentarem expressão de marcadores de células neurais, podendo ser utilizadas como objeto de estudo para analisar como as CTMs se comportam quando co-cultivadas com estas. Estas culturas de células neurais de camundongos passarão a ser chamadas de culturas mistas.

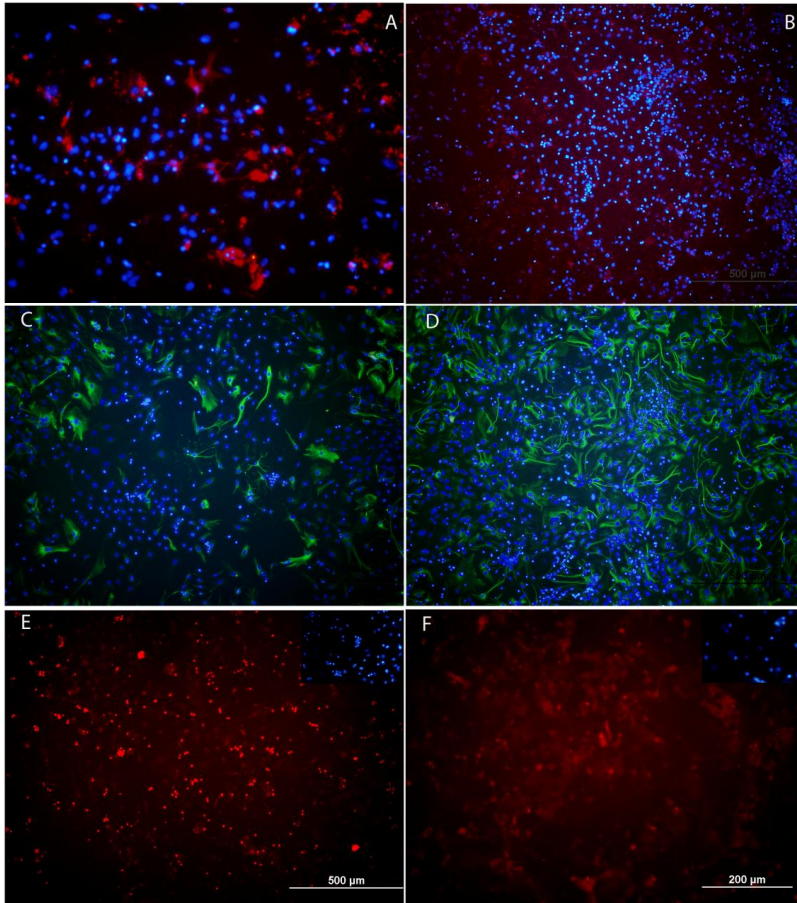


Figura 7. Culturas mistas realizadas através da extração de cerebelo e córtex de camundongos. Expressão de marcadores imunofenotípicos em culturas mistas de cerebelo (A, C e E), e córtex (B, D e F). As culturas mistas expressaram marcadores como β -tubulina III (A, B), GFAP (C, D) e NeuN (E, F). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho e verde temos as marcações celulares e em azul os núcleos contra corados com DAPI.

Os genes analisados em CTMs da placenta humana foram testados nas culturas mistas de camundongos para garantir a especificidade destes pelas células humanas (Figura 7). Isso devido na metodologia seguinte, onde usaremos os dois

tipos celulares, humano e animal, juntos. Observamos que apenas o gene Oct-4 não têm especificidade só pelas células humanas, não podendo ser utilizado quando ambas serão co-cultivadas.

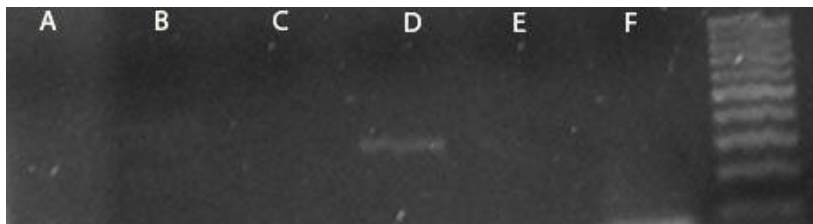


Figura 8. Controle de especificidade dos oligonucleotídeos utilizados em CTMs. Expressão destes em culturas mistas de camundongos. Expressão dos genes: A- neuronais (B-tubulina III), B- precursor neural (Nestina), C- células gliais (GFAP), D- células indiferenciadas OCT-4 e E- células indiferenciadas Nanog. Em F- Controle positivo GAPDH.

4.6 OBJETIVO 3 E 4:

Co-cultivar células da placenta humana sobre culturas primárias de camundongos, analisando como estas células da placenta se comportam quando em ambiente cerebral.

Análise dos fatores liberados pelas culturas primárias dos camundongos.

4.6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.6.2 CO-CULTURA

Após confluência da cultura de células neurais de camundongos (80–90%), o que ocorre por volta de 2 dias, as CTMs da placenta humana foram plaqueadas sobre a

monocamada destas células, na quantidade de 10^4 células por poço, em placas de 24 poços, e mantidas em co-cultura durante 4 dias, suplementadas em IMDM com 10% SBF, totalizando 6 dias totais, para posterior análise da influência do contato celular entre CTMs e células neurais de camundongos (Figura 9). Durante a realização das co-culturas foram testados traçadores celulares nas CTMs para que pudessemos usar anticorpos que não fossem específicos humanos, onde ampliaria as possibilidades, mas estes não permaneceram o tempo suficiente, da co-cultura à fixação e imuno (dados não mostrados).

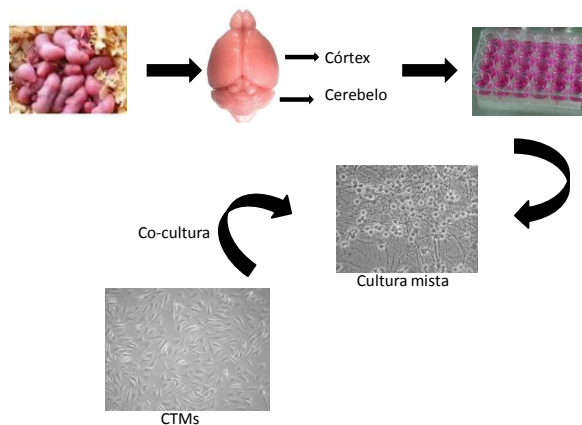


Figura 9. Desenho esquemático mostrando o procedimento de co-cultura. Temos a co-cultura onde as CTMs humanas são plaqueadas sobre a monocamada de células neurais de camundongos.

4.6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA

As co-culturas foram fixadas e submetidas à imunocitoquímica, conforme descrito anteriormente. Foram utilizados marcadores específicos para os diferentes fenótipos, utilizando anticorpos específicos para células humanas.

O núcleo das células foi visualizado com o corante nuclear 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI). Para as

marcações de células humanas foram utilizados os anticorpos primários específicos para células humanas listados na tabela 4, previamente testados quanto a sua especificidade. Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ao Texas Red (TXRD) ou Alexa. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus BX 40. Todos experimentos foram realizados em triplicatas.

Tabela 4. Anticorpos primários específicos humanos para realização das imunocitoquímicas.

FENÓTIPO	ANTICORPO PRIMÁRIO	DILUIÇÃO	FABRICANTE	SECUNDÁRIO
Precursor neural	Anti-nestina	1:100	Santa Cruz	GAM IgG1 Txred
Glial	Anti-GFAP (anti proteína fibrilar ácida glial)	1:50	Dako	GAM IgG1 Txred
Neuronal	Anti- β -Tubulina III	1:2000	Chemicon Promega	GAM IgG1 Txred

4.6.4 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA VIA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

As co-culturas foram preparadas segundo os procedimentos descritos anteriormente e após 6 dias foi analisada nas CTMs da placenta humana, a expressão de diferentes genes através da extração de RNA total para ensaios de RT-PCR, conforme anteriormente descrito. Foram analisadas nas CTMs, co-cultivadas sobre a monocamada de células mistas de camundongos, a expressão de genes marcadores, como nestina, GFAP, β -tubulina III e Nanog (Tabela 5), Oct-4 não foi avaliado devido o iniciador não ser específico para células humanas conforme mostrado anteriormente. Também foram

analisados os receptores dos fatores de crescimento expressos pelas células neurais dos camundongos, na presença ou ausência de co-cultura, entre eles: EGF, FGFR1, FGFR2, Snail, Slug, S100 β e FOXD3 (Tabela 6). Para todos os experimentos de RT-PCR foram realizados controle positivo das amostras com GAPDH, para confirmar a presença do cDNA, e controle negativo dos primers para descartar a possibilidade de contaminação dos mesmos. Todos os primers possuem especificidade para células humanas ou animais. Todos experimentos foram realizados em triplicatas.

Tabela 5. Oligonucleotídeos específicos humanos utilizados para realização das PCR.

Gene	Primers	Condições da PCR	Pb
Neuronal: β -Tubulina III	5'-AGATGTACGAAGACGACGAG GAG-3' 5'-GTATCCCCGAAAATATAAACA CAAA-3'	34 ciclos: 58.5 $^{\circ}$ C	312
Precursor neural: Nestina	5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGAT G-3 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGAC TGG-3'	35 ciclos: 64 $^{\circ}$ C	208
Células gliais: GFAP	5'-GTGGGCAGGTGGGAGCTTG ATTCT-3' 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGAC A-3'	34 ciclos: 65 $^{\circ}$ C	387
Células indiferenciadas: Nanog	5'-TGCAATGTCTTCTGCTGAGA T-3' 5'-	34 ciclos: 54 $^{\circ}$ C	286

	G TTCAGGATGTTGGAGAGTT C-3'		
Controle positivo: GAPDH	5'- GAAGGTGAAGGTCCGAGTC- 3' 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTTC- 3'	34 ciclos: 60°C	226

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados para realização das PCR. específicos para camundongos

Gene	Primers	Condições da PCR	Pb
EGF	5'- ATGTCTGCCAATGCTCAGAAGG-3' 5'- TAGGACCACAAACCAAGGTTGGG- 3'	45 ciclos: 56,4°C	616
FGFR 1	5'-CGATGATGATGACTCCTCC-3' 5'-TTCCGTAGATGAAGCACC-3'	45 ciclos: 50,1°C	602
FGFR 2	5'-GGTGGAGAATGAATACGGGTC- 3' 5'- CTGTTACCACCATACAGGCGATTA A-3'	45 ciclos: 55,1°C	487
Snail	5'-ACCCCGCCGGAAGCCCAACT- 3' 5'- AGCGGCGGGGTTGAGGACCTC-3'	45 ciclos: 66,8°C	127
Slug	5'-CTCACCTCGGAGCATAACAGC- 3' 5'- TGAAGTGTCAGAGGAAGGCGGG- 3'	45 ciclos: 58,5°C	146

S100B	5'-AGAGGACTCCAGCAGCAAAGG-3' 5'-AGAGAGCTCAGCTCCTTCGAG-3'	45 ciclos: 57,2°C	432
FOXD 3	5'- CGACGACGGGCTGGAGGAGGAG AA-3' 5'-ATGAGCGCGATGTAAGGGTAG-3'	45 ciclos: 58°C	326

4.7 RESULTADOS

4.7.1 CO-CULTURAS

As CTMs da placenta humana foram co-cultivadas com as culturas mistas de cerebelo (Figura 10A, C, E) e córtex (Figura 10B, D, F) de camundongos; após 4 dias de co-cultura, as CTMs foram analisadas e vimos que expressam marcadores como β -tubulina III (A, B), GFAP (C, D) e Nestina (E, F), além de apresentarem alterações morfológicas, sugerindo sua diferenciação, através da influência do nicho, tanto de córtex quanto de cerebelo.

Foram analisadas também nas CTMs co-cultivadas com culturas mistas de cerebelo e córtex de camundongo, separadamente, a expressão dos genes: A- neuronais (β -tubulina III), B- precursor neural (Nestina), C- células gliais (GFAP), D- células indiferenciadas Nanog, em E- Controle positivo GAPDH (Figura 11).

Podemos ver que em ambas as imagens da figura 11, o marcador de células indiferenciadas Nanog, expresso em CTMs sem indução, deixa de ser expresso quando estas são co-cultivadas tanto com células do cerebelo quanto do córtex, sugerindo diferenciação.

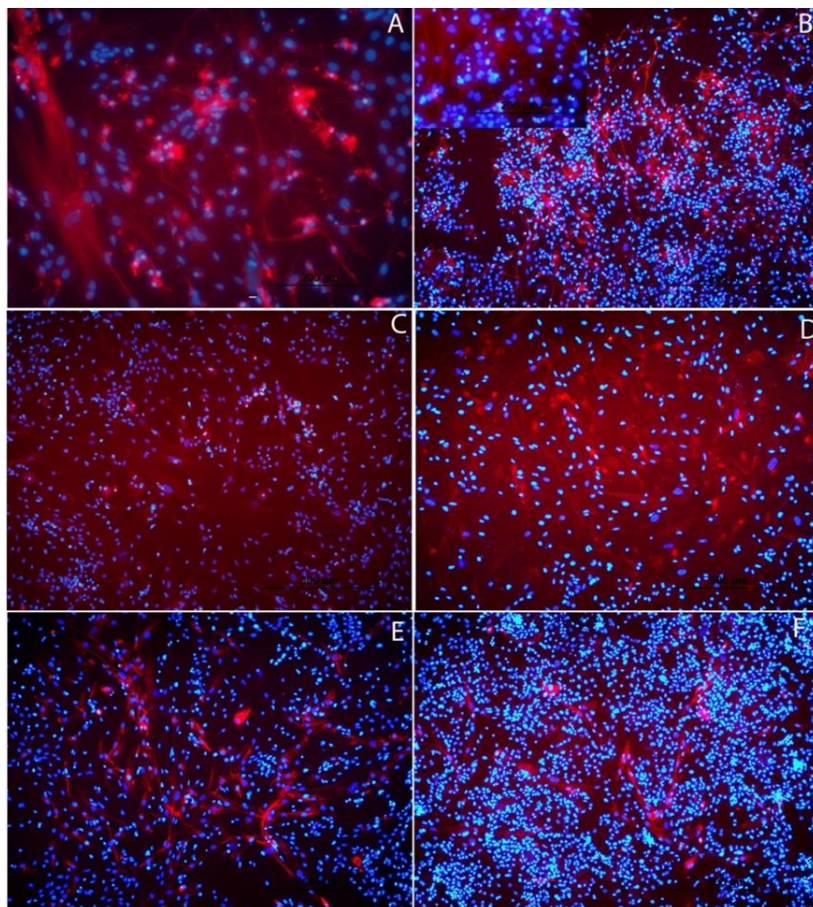


Figura 10. Co-cultura. Expressão de marcadores imunofenotípicos pelas CTMs quando co-cultivadas com culturas mistas de cerebelo (A, C e E), e córtex (B, D e F). As CTMs expressaram marcadores como β -tubulina III (A, B), GFAP (C, D) e Nestina (E, F). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho temos as marcações celulares e em azul os núcleos-DAPI.

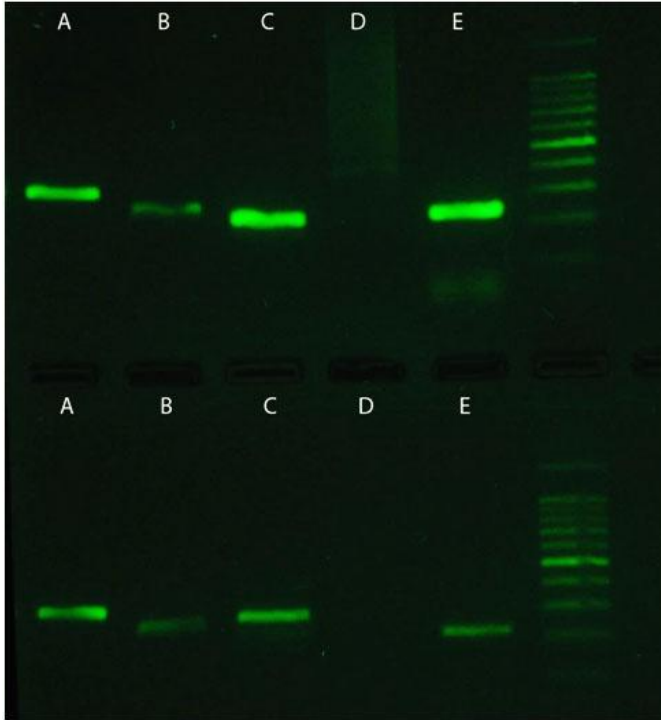
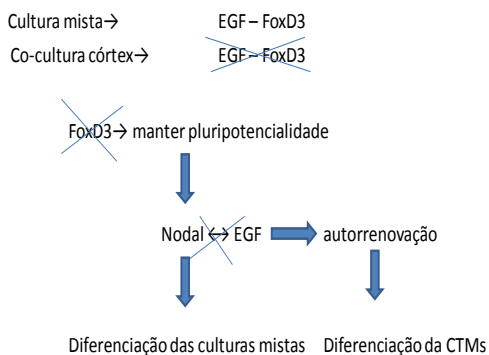


Figura 11. Expressão gênica de CTMs co-cultivadas. Expressão gênica de CTMs co-cultivadas com culturas mistas de cerebelo (Imagem superior) e córtex (Imagem inferior). Expressão dos genes: A- neuronais (β -tubulina III), B- precursor neural (Nestina), C- células gliais (GFAP), D- células indiferenciadas Nanog, E- Controle positivo GAPDH, em ambas as imagens.

4.7.2 EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Quando analisamos os fatores expressos pelas células provenientes de culturas mistas de cerebelo (desenvolvimento mais tardio) e córtex (desenvolvimento mais precoce) de camundongos, na figura 12, sozinhas ou em co-cultura com CTMs, vimos que estas expressam FGFR1, FGFR2, Snail e Slug em todas as condições estudadas, já os fatores EGF e FOXD3

deixam de ser expressos pelas culturas mistas de córtex, quando estas células são co-cultivadas com CTMs, o que sugere que quando as culturas mistas deixam de expressar FOXD3, ocorre a diferenciação das culturas mistas. Também a não expressão de FOXD3 e conseqüentemente de EGF, fator liberado envolvido na diferenciação, faz com que as CTMs se diferenciem.



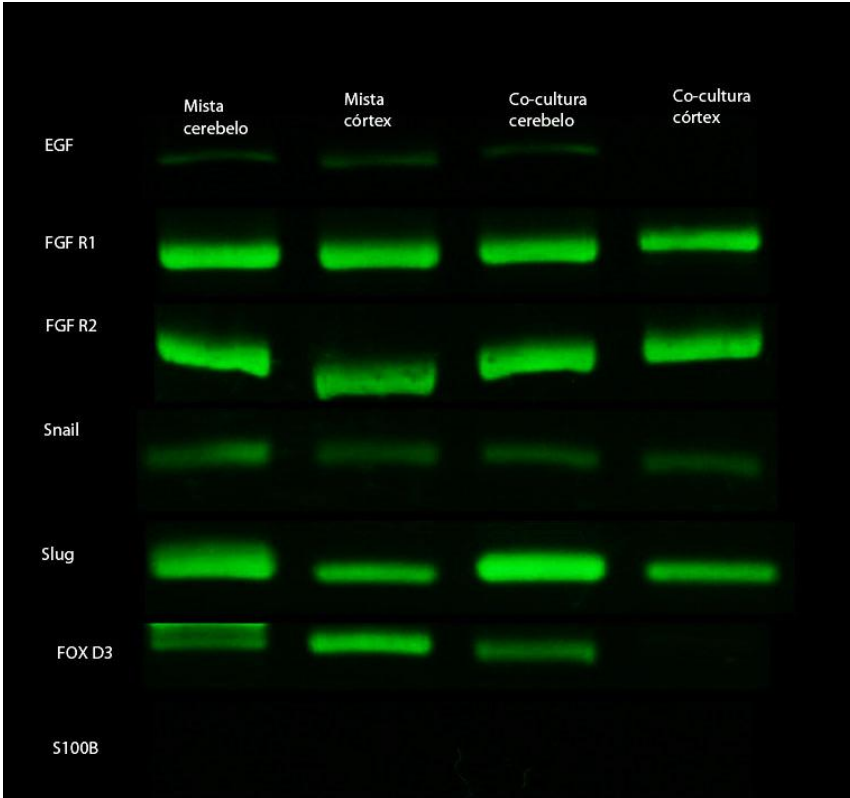


Figura 12. Expressão de fatores de crescimento /receptores de fatores de crescimento e transcrição pelas células neurais de camundongos. Expressão de EGF, FGFR1, FGFR2, Snail, Slug e FOXD3 em células provenientes de culturas mistas de cerebelo e córtex de camundongos, sozinhas ou co-cultivadas com CTM. S100B controle negativo. Oligonucleotídeos específicos para células murinas.

4.8 OBJETIVO 5:

Injetar CTMs da placenta humana em camundongos que sofreram AVC, para analisar se ocorre a diferenciação destas em células neurais.

4.8.1 GRUPO AVC

O grupo que está estabelecendo a metodologia de AVC experimental é composto por mestrandos e doutorandos que em conjunto estudam uma possível terapia celular para o tratamento desta doença. Cada aluno estuda um assunto diferente sobre o tema, entre eles a marcação das CTMs para injeção na lesão, migração das CTMs da placenta para a área lesionada, fatores liberados pelas CTMs quando no ambiente lesionado, zona de penumbra da região isquêmica do encéfalo, bem como fatores liberados pelas células endógenas próximas a lesão. Também a recuperação motora após enxerto das CTMs.

Meu objetivo no projeto foi avaliar especificamente a migração de CTMs de placenta humana para a área lesada, resultante da lesão isquêmica. Estudamos ainda o potencial de diferenciação das CTMs para o fenótipo neural através da expressão de marcadores neurais.

4.8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.8.3 OCLUSÃO DA ARTÉRIA MÉDIA CEREBRAL (OAMC) PARA REALIZAÇÃO DO AVC

Foram utilizados camundongos machos, linhagem C57/BL6, de dois meses de idade, pesando em torno de 50g. Os animais foram primeiramente anestesiados com 10 a 15 mg/Kg de Xilasina + 100 a 150 mg/Kg de Quetamina misturadas na mesma seringa, via intraperitoneal (IP), sendo então encaminhados para a cirurgia. No primeiro momento, os animais tiveram a artéria média cerebral exposta através de um corte na pele em forma de V invertido, de aproximadamente 1 cm no lado esquerdo da cabeça, entre o olho e a orelha. Após, o músculo temporal também foi cortado, expondo o crânio do animal, que foi cuidadosamente perfurado, com o auxílio de uma broca, na junção entre o osso zigomático e o escamoso. A artéria foi então visualizada e ocluída através de eletrocauterização. O grupo controle passou pelo mesmo procedimento, exceto a oclusão da

artéria. Após, os animais foram suturados e colocados em caixas devidamente identificadas, com ração e água *ad libitum* (ETCHEVERRIA, 2010).

3.8.4 ENXERTO DE CTMs

Nos animais que sofreram o AVC experimental, decorrido uma semana da lesão, foi realizado o enxerto de CTMs não diferenciadas. As CTMs foram selecionadas após a 4ª passagem e suspensas em PBS suplementado com penicilina e estreptomicina. Foram injetadas cerca de 10 µl da suspensão, que continha 10⁴ células (grupo experimental). Os animais foram anestesiados novamente com Xilasina e Quetamina, via IP, e as células injetadas em PBS via endovenosa, na veia caudal. Para controle, um grupo que também passou pelo processo do AVC, recebeu uma injeção via endovenosa contendo 10 µl de PBS (grupo controle). Decorridas 168 horas após o enxerto os animais foram sacrificados para avaliação das modificações das CTMs (ETCHEVERRIA, 2010).

3.8.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DOS ENCÉFALOS

Dos animais que foram submetidos à procedimento experimental de AVC, foram selecionados grupos de animais para a análise imunohistoquímica para avaliar a diferenciação das CTMs; para isso foram utilizados anticorpos específicos humanos, entre eles: GFAP, nestina e NSE (Enolase específica de neurônio), com a análise iniciando-se 168 horas após o enxerto. Os animais foram novamente anestesiados com Xilasina + Quetamina nas mesmas condições anteriormente descritas, e perfundidos via artéria aorta, para a primeira fixação, com 50 ml de PBS e 50 ml de paraformaldeído 4%. O encéfalo foi removido e pós-fixado em paraformaldeído 4% por 12 horas, sendo mantido a 4°C. Estes foram emblocados com parafina (Vetec). Após foram realizados os cortes histológicos com micrótomo, em uma espessura de 5mm, sendo estes colocados em lâminas silanizadas, e secos em estufa. Para a

imunohistoquímica, os tecidos foram trazidos à temperatura ambiente. Primeiramente as lâminas foram desparafinadas com banhos de xilol (3 banhos de 5 minutos), álcool 100, 95 e 70, respectivamente, sendo 1 banho de 5 minutos cada um, água destilada (1 banho de 5 minutos) e 1 banho de PBS por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram tritonados e bloqueados os sítios inespecíficos com PBT e SBF (20%). Após este processo, os cortes foram incubados com os anticorpos específicos para os antígenos expressos em células neurais por 12 horas a 4°C. Os cortes foram lavados com PBS e os anticorpos primários utilizados foram os descritos abaixo. Os anticorpos secundários foram incubados por 2 horas a 4°C. Os cortes foram lavados com PBS e os anticorpos secundários utilizados foram anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, ligados à Alexa ou ao Texas Red (TXRD). A marcação dos núcleos foi através de DAPI. As lâminas foram montadas com glicerol e lamínula, e a fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus BX 40. Todos experimentos foram realizados em triplicatas.

Tabela 7. Anticorpos primários específicos humanos para realização das reações imunohistoquímicas.

FENÓTIPO	ANTICORPO PRIMÁRIO	DILUIÇÃO	FABRICANTE	SECUNDÁRIO
Precursor neural	Anti- nestina	1:50	Santa Cruz	GAM IgG1 Txred
Gliial	Anti-GFAP (anti proteína fibrilar ácida glial)	1:50	ABCam	GAM IgG Alexa 594
Neuronal	NSE	1:100	ABCam	GAM IgG2b Alexa 594

4.9 RESULTADOS

4.9.1 LESÃO DO AVC

Em nosso Laboratório, o Prof. Marcos dos Anjos já padronizou a lesão causada pelo AVC em camundongos, onde estes foram posteriormente sacrificados e a análise realizada para confirmar a lesão. Para isso, foi utilizado o corante cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Este cora a parte viável do encéfalo de vermelho (por causa de enzimas desidrogenases preservadas que formam um precipitado vermelho formazan) e deixa pálida a região isquêmica, em virtude da falha da captura do corante vital. Cortes e coloração realizados pelas alunas de Mestrado Camila Etcheverria e de Doutorado Fernanda Mello.

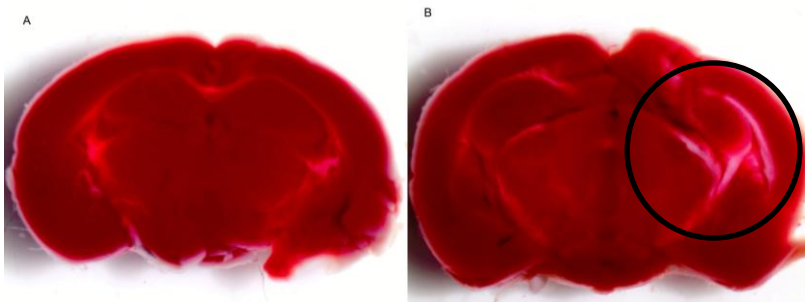


Figura 13. Marcação da lesão causada pelo AVC com TTC. Em A temos o corte do encéfalo sem lesão e em B corte do encéfalo com lesão causada pelo AVC. Em vermelho área intacta do encéfalo e em branco área lesionada.

4.9.2 MARCAÇÃO DAS CTMS PARA ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DESTAS A ÁREA DE LESÃO CAUSADA PELO AVC.

As CTMs foram marcadas com Qtracker cell labeling kits-565, nanocristais fluorescentes que se incorporam na membrana das células. Estes foram testados na concentração de 8nM, e sua análise mostrou permanência em cultura até 23 dias. Testado pela Mestre Diana Heck.

Após realização dos cortes histológicos, verificou-se que o traçador Qtracker não resiste ao emblocamento e processamento dos cortes com parafina, não podendo ser utilizado neste procedimento.

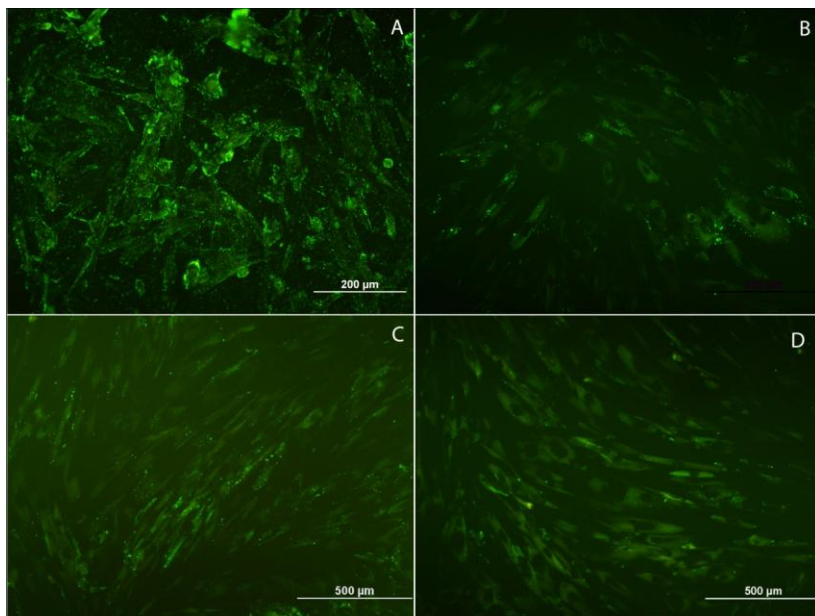


Figura 14. Marcações das CTMs com Qtracker. Foto de CTMs marcadas com Qtracker em dias 1(A), dia 6(B), dia 9(C) e 15 dia(D).

4.9.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS CTMs INJETADAS EM ANIMAIS QUE SOFRERÃO LESÃO CAUSADA PELO AVC

Nos animais que sofreram a lesão causada pelo AVC e receberam injeção de CTMs, após 168 horas da injeção destas, analisamos a expressão dos marcadores celulares descritos anteriormente. Observamos a expressão do precursor neural nestina nos animais lesionados que receberam o enxerto com

CTMs (Figura 15), enquanto nos animais lesionados sem injeção de CTMs (controle) essa expressão foi nula (Figura 16).

Estes resultados nos mostram que as CTMs injetadas migram até o córtex, e expressam o marcador nestina, o que não foi visto no controle.

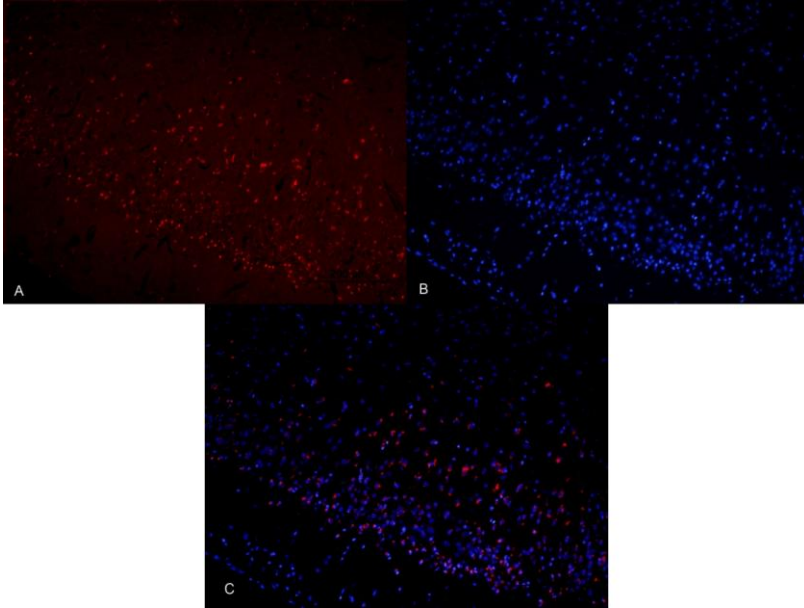


Figura 15. Enxerto de CTMs em animais que sofreram lesão causada pelo AVC - Nestina. Expressão de nestina nas CTMs injetadas nos animais lesionados. Em A temos a expressão de nestina em vermelho, em B marcação dos núcleos com DAPI e em C sobreposição das imagens. Microscópio de imunofluorescência. Barra 200 μ m.

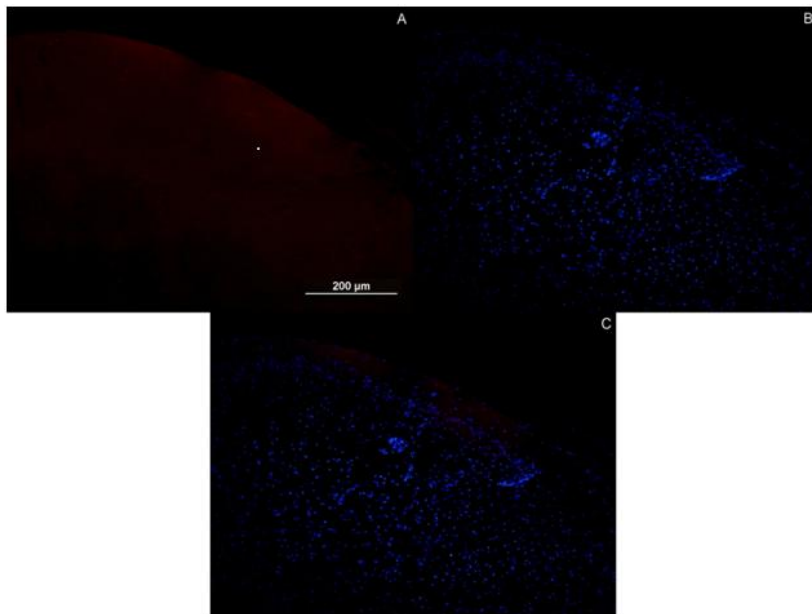


Figura 16. Animais que sofreram lesão causada pelo AVC sem enxerto de CTMs - nestina. Em A, verificamos a expressão de nestina em vermelho, em B marcação dos núcleos com DAPI e em C sobreposição das imagens. Microscópio de imunofluorescência. Barra 200 µm.

Analisamos a expressão do marcador glial GFAP nos animais lesionados que receberam injeção com CTMs (Figura 17), também nos lesionados sem injeção de CTMs (controle) (Figura 18).

Estes resultados mostram a marcação para GFAP nas CTMs presentes no córtex, o que não foi visto no controle.

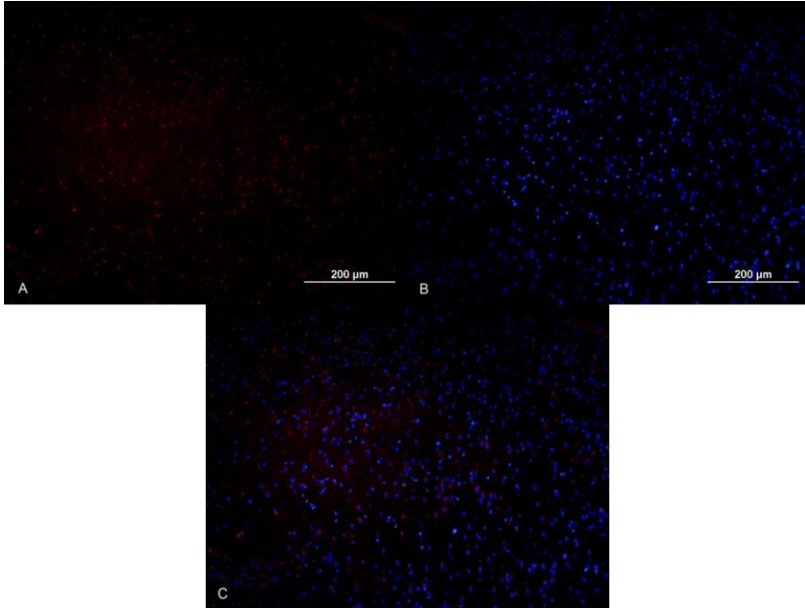


Figura 17. Enxerto de CTMs em animais que sofreram lesão experimental causada pelo AVC - GFAP. Expressão de GFAP nas CTMs injetadas nos animais lesionados. Em A, testamos a expressão de GFAP em vermelho, em B marcação dos núcleos com DAPI e em C sobreposição das imagens. Microscópio de imunofluorescência. Barra 200 μm .

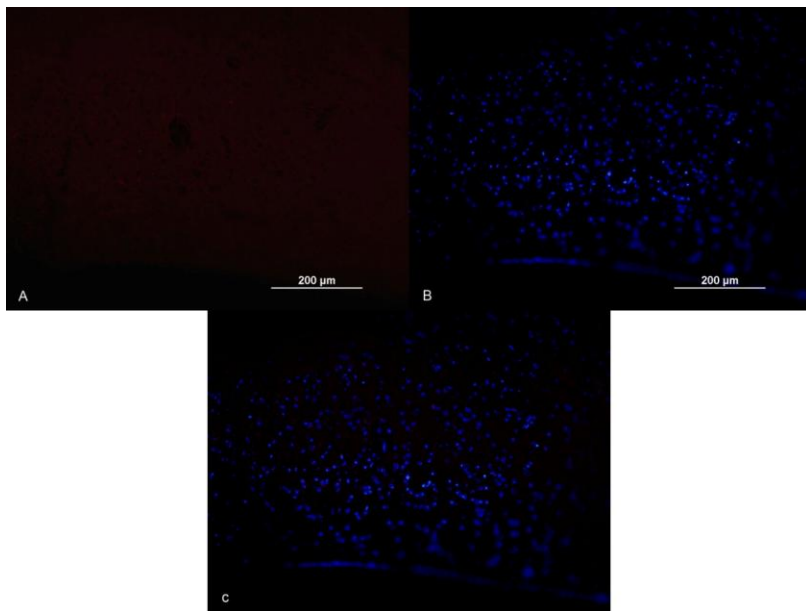


Figura 18. Animais que sofreram lesão causada pelo AVC sem enxerto de CTMs - GFAP . Em A testamos a expressão de GFAP em vermelho, em B marcação dos núcleos com DAPI e em C sobreposição das imagens. Microscópio de imunofluorescência. Barra 200 µm.

Observamos também a expressão do marcador neuronal NSE nos animais lesionados que receberam injeção com CTMs (Figura 19), quanto nos lesionados sem injeção de CTMs (controle) (Figura 20).

As imagens nos mostram a expressão de NSE no córtex dos animais que receberam as CTMs, o que não foi observado no controle, sugerindo que estas células além de migrarem até o córtex também diferenciam em células neurais.

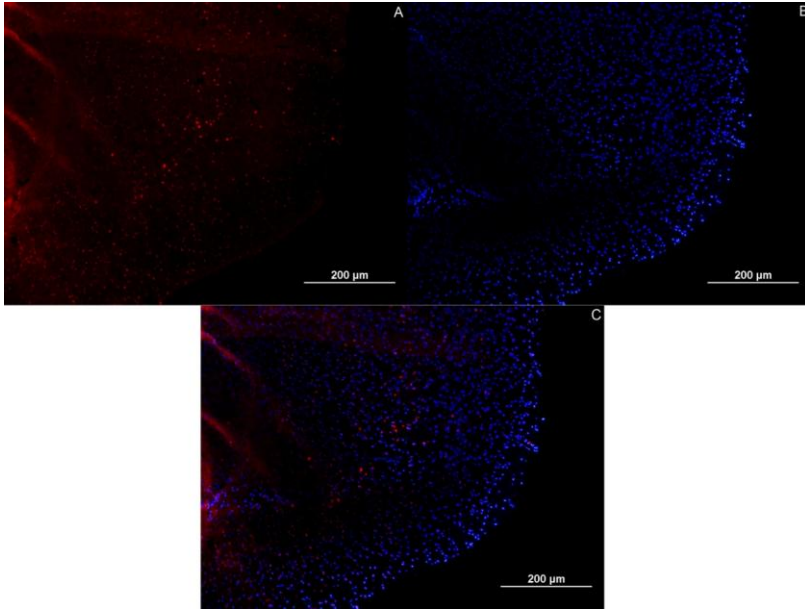


Figura 19. Enxerto de CTMs em animais que sofreram lesão experimental causada pelo AVC- NSE. Testamos a expressão de NSE nas CTMs injetadas nos animais lesionados. Em A, temos a expressão de NSE em vermelho, em B marcação dos núcleos com DAPI e em C sobreposição das imagens. Microscópio de imunofluorescência. Barra 200 μm.

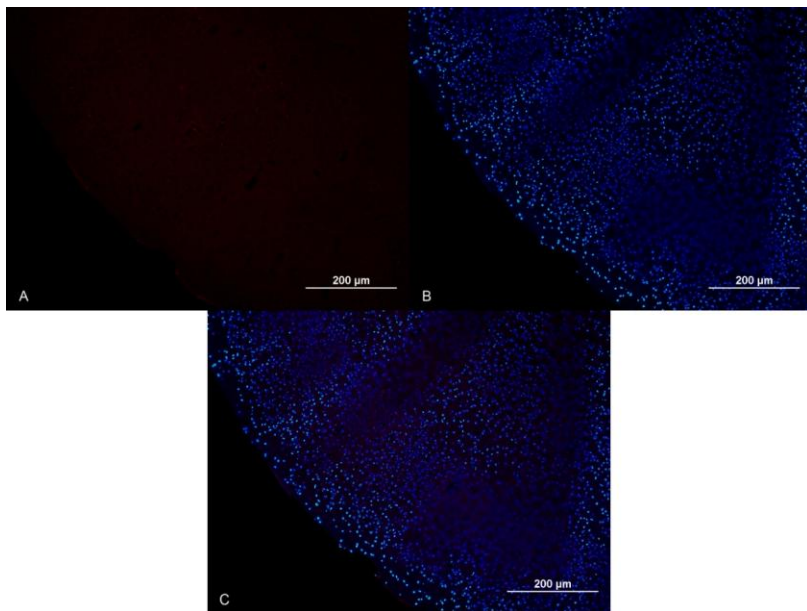


Figura 20. Animais que sofreram lesão experimental causada pelo AVC sem enxerto de CTMs - NSE. Avaliamos a expressão de NSE nos animais lesionados sem injeção de CTMs. Em A, temos a expressão de NSE em vermelho, em B marcação dos núcleos com DAPI e em C sobreposição das imagens. Microscópio de imunofluorescência. Barra 200 μm.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos há um interesse crescente em relação ao estudo das CTMs, isso devido à possibilidade da aplicação das mesmas na medicina regenerativa. A facilidade de isolamento, cultivo celular e a sua alta capacidade de expansão *in vitro*, tornam as CTMs muito atrativas para aplicação em protocolos experimentais em estudos de diferenciação celular, terapia celular e terapia gênica (CAPLAN, 2007).

Como já bem descrito na literatura, as CTMs estão distribuídas em uma variedade de tecidos do organismo humano adulto, como medula óssea, pulmão, fígado e rins. Miao e colaboradores (2006) demonstraram que a placenta humana também é uma fonte de CTMs, onde utilizando técnicas de cultura, estas podem ser isoladas e expandidas *in vitro*. Esta cultura inicial possui células fibroblastóides e não fibroblastóides, onde após o aumento de passagens com digestão enzimática, permanecem somente células fibroblastóides. Este trabalho é consistente com as observações do nosso estudo, onde nossos resultados demonstram que as CTMs de placenta humana, utilizando técnicas de cultura, podem ser expandidas *in vitro* e apresentam células aderentes com morfologia fibroblastóide e capacidade de autorrenovação.

Resultados anteriores, em nosso laboratório, realizados pelo Mestre Lucas Marostica em sua dissertação, demonstraram através da imunofenotipagem que as CTMs obtidas de placenta não expressam marcadores de células hematopoiéticas, tais como CD45 e CD34, enquanto que expressam, em diferentes níveis de intensidade, antígenos como CD73, CD90 e CD105, descritos na literatura por Chamberlain como marcadores de CTMs.

Após a caracterização das CTMs, estudamos a expressão gênica destas, e como anteriormente observamos que tanto as CTMs de baixa passagem (P4) quanto de alta passagem (P12) expressam marcadores similares, mantendo a mesma morfologia, utilizamos nos experimentos seguintes apenas as células de baixa passagem. Quanto à expressão gênica, observamos que as CTMs expressam os genes característicos de células indiferenciadas, como Oct-4 e Nanog, também expressando os genes de diferenciação para células gliais

(GFAP), precursores neurais (nestina) e neurônios (β -Tubulina III).

A expressão de genes de indiferenciação e de pluripotência em CTMs condiz com TSAI e colaboradores (2012), que demonstraram a perda na expressão destes marcadores após diferenciação celular. Também dados da literatura afirmam que as CTMs de MO possuem expressão dos genes relacionados às três camadas germinativas (WOODBURY; REYNOLDS; BLACK, 2002). Com estes resultados podemos dizer que as CTMs da placenta humana são CT, e indiferenciadas. Mesmo sem indução, as CTMs expressam genes de células diferenciadas. Quanto a expressão proteica, CTMs expressam proteínas de células diferenciadas, como β -Tubulina III e nestina, e não expressam GFAP, porém apresentam morfologia fibroblastóide, sendo assim, podemos sugerir que estas células possivelmente quando induzidas, poderiam se diferenciar rapidamente em células neurais.

Posteriormente a estes resultados, fomos caracterizar as culturas mistas de cerebelo e córtex de camundongos neonatos, para analisar se estas podem mimetizar um microambiente neural para posterior co-cultura com CTMs da placenta humana. Conforme figura 7, observamos que ambas culturas, de cerebelo e córtex, expressaram marcadores de células neurais: β -Tubulina III e NeuN como de células gliais: GFAP. Estes resultados nos mostram que estas culturas possuem células mistas, podendo assim mimetizar um microambiente neural. Mendes de Aguiar (2008) demonstrou que as interações neurônio-glia, particularmente neurônio-astrocitos, exercem um importante papel na manutenção da homeostase energética e plasticidade no cérebro, organizando um microambiente funcional.

Após estes resultados de caracterização de CTs e culturas mistas animais, analisamos o que acontece quando co-cultivamos os dois tipos celulares, para analisar a influência de um microambiente neural na diferenciação de CTMs. Dados da literatura nos mostram que o microambiente e as CTs se regulam de forma dinâmica: os fatores produzidos por uma destas células influenciam a célula próxima e geram uma resposta mútua contínua (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

Primeiramente analisamos os mesmos genes expressos pelas CTMs sem indução nas culturas mistas dos animais, para garantir a especificidade destes pelas células humanas. Ao

analisar isso, observamos que o iniciador Oct-4 não teve especificidade pelas células humanas, não podendo ser utilizado nos experimentos de co-cultura (Figura 8). Os demais foram específicos, podendo ser utilizados dentro da análise da técnica. Com isto foi possível uma abordagem referente às diferenças na expressão gênica comparando somente CTMs com estas co-cultivadas sobre a monocamada de culturas mistas. Com a referida especificidade dos reagentes, analisamos a variação morfológica e expressão protéica de CTMs.

Na figura 11 vimos que as CTMs cultivadas sobre a monocamada destas células mistas, tanto em cerebelo quanto em córtex, deixaram de apresentar genes responsáveis pela manutenção do estado indiferenciado assim como da pluripotência (Nanog), além de adquirirem uma morfologia diferenciada (figura 10).

Um estudo tem demonstrado, que CTMs da MO são capazes de diferenciação à neurônios e glia, quando co-cultivadas com astrócitos do cérebro de ratos neonatos (LEI *et al.*, 2007). Nossos estudos demonstraram que as CTMs da placenta humana possuem a mesma plasticidade quando comparadas com as de medula óssea. As CTMs, mesmo sem indução, expressam os marcadores Nestina e B-Tubulina III, mas não expressam GFAP, em células de baixa e alta passagem. Entretanto a morfologia das células se manteve fibroblastóide, indicando que não houve indução fenotípica. A expressão de proteínas marcadoras pode ser um padrão importante dentro da plasticidade que a célula possui, para sua rápida diferenciação quando desafiada em um meio indutivo específico. Rápidas mudanças fenotípicas podem acontecer quando as CTMs já possuem um certo número de proteínas expressas no seu citoplasma, favorecendo sua diferenciação (PITTINGER *et al.*, 1999). Quando plaqueamos CTMs sobre monocamada de células mistas (Figura 10), vimos que estas expressam além dos marcadores já expressos no controle, GFAP, tanto no cerebelo quanto córtex. Um ponto importante nos experimentos de co-cultura é a modificação na morfologia destas células. As células que antes possuíam morfologia fibroblastóide, passaram a exibir processos, resultando em uma morfologia neural.

Após estes resultados, surgiu a pergunta de quais fatores de crescimento e transcrição são expressos pelas culturas mistas e poderiam estar influenciando a diferenciação das CTMs da

placenta humana. Dos fatores analisados (Figura 12), EGF e FOXD3 deixaram de ser expressos em culturas mistas de córtex após o co-cultivo com CTMs. Conforme descrito na literatura, FOXD3 mantém a pluripotencialidade das células, este ativa Nodal que necessita de EGF, conseqüentemente quando não temos a expressão de FOXD3 não teremos também a expressão de EGF (Chang, 2009); sendo assim podemos sugerir que quando as CTMs são co-cultivadas com células mistas estas deixam de expressar FOXD3, fazendo com que as CTMs se diferenciem. Estes resultados são de grande importância no estudo de CTMs, pois os mecanismos que fazem com que estas células se diferenciem são até então desconhecidos.

Com estes resultados, passamos a enxertar CTMs em camundongos adultos que foram submetidos a lesão isquêmica experimental, para analisar seu efeito *in vivo* e uma possível regeneração da lesão.

Como o projeto AVC é constituído por uma equipe, cada membro está realizando suas pesquisas separadamente, ou em conjunto, quando necessário.

Após a padronização da lesão causada pelo AVC, realizada pelo Mestre Marcos dos Anjos, injetamos CTMs de baixa passagem para analisar sua possível diferenciação.

Observamos que estas CTMs, quando enxertados nos camundongos, expressam marcadores de células neurais como precursor neural Nestina, (Figura 15), células gliais GFAP (Figura 17) e neurônios maduros NSE (Figura 19), 7 dias pós enxerto. Estes marcadores não foram observados nos controles por serem anticorpos que reconhecem especificamente antígenos humanos (Figuras 16, 18 e 20 respectivamente), sugerindo que estas células além de migrarem para o encéfalo, possivelmente se diferenciam em células neurais, podendo auxiliar no reparo da lesão.

KEMP e colaboradores postularam que as CTMs podem ser eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas, seja por substituição de células perdidas, através de diferenciação em tecido neural funcional; modulação do sistema imunológico para evitar o agravamento da neurodegeneração, e / ou prestação de apoio trófico para o sistema nervoso doente. As CTMs derivadas da MO são capazes de controlar a ativação do sistema imunológico alogênico, bem como supressão de respostas imunes dirigidas contra as células de terceiros, após

administração infusão intravenosa (IV). Além disso, quando infundida na circulação, as CTMs têm a capacidade de migrar especificamente para locais de lesão cerebral, visando assim locais para a reparação neural (KEMP K. *et al.*, 2010).

Estes resultados são de grande importância na medicina regenerativa, mas estudos mais aprofundados ainda são necessários, como se as CTMs da placenta humana estão funcionais no encéfalo murino, análise da possível melhora motora dos animais entre outros, mas juntamente com o estudo dos outros colaboradores do projeto, poderemos ajudar em possíveis tratamentos para melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofreram AVC.

6 CONCLUSÕES

- As células da placenta humana podem ser caracterizadas como CTMs;
- As culturas mistas de cerebelo e córtex de camundongos neonatos são adequadas para mimetizar um microambiente neural;
- As CTMs quando co-cultivadas com culturas mistas de cerebelo e córtex de camundongos diferenciam para células neurais;
- O fator de crescimento EGF e de transcrição FOXD3 expressos pelo microambiente cerebral animal podem estar relacionados com a diferenciação das CTMs da placenta humana;
- CTMs injetadas em animais que sofreram lesão causada pelo AVC migram ao encéfalo e se diferenciam em células neurais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK., L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience.**, v.7, n.1, p.41-53. 2006.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell.** 4th. New York: Garland Science, 2002.

ALVAREZ-SILVA, M.; BELO-DIABANGOUAYA, P.; SALAÜN, J.; DIETERLEN-LIÈVRE, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development (Cambridge, England)**, v. 130, n. 22, p. 5437-44, 2003. ββ

ANDRÉ ,C.; CURIONI, C. C.; *et al.* Progressive decline in stroke mortality in Brazil from 1980 to 1982, 1990 to 1992, and 2000 to 2002. **Stroke.** 37;2784-2789, 2006.

BIANCO, P; ROBEY, P.G; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313–319, 2008.

CAPLAN, A. Adult Mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CHAMBERLAIN, G. *et al.* Concise Review: Mesenchymal stem cells: Their Phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, p. 2739-2749, 2007.

CHANG, Lisa L., "TRANSCRIPTIONAL AND TRANSLATIONAL CONTROL OF ZEBRAFISH MESODERMAL DEVELOPMENT" (2009). **Publicly accessible Penn Dissertations.** Paper 41.

<http://repository.upenn.edu/edissertations/41>

COSTA F. A.; SILVA D. L. A.; ROCHA V. M.; The neurological state and cognition of patients after a stroke. **Rev. Esc. Enfermagem**, v. 45, n. 5, p. 1083-1088, 2011.

COUGO-PINTO P. T. *et al.* Frequency and predictors of symptomatic intracranial hemorrhage after intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in a Brazilian public hospital. **Clinical Science**, v. 67, n. 7, p. 739-743, 2012.

DALLWIG R.; DEITMER J. W. Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 116, p. 77-87, 2002.

DOMINICI M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

ETCHEVERRIA, C. E. Efeitos do enxerto de células-tronco mesenquimais sobre o microambiente neural de animal submetido à lesão isquêmica. **Projeto** (Projeto de mestrado em Biologia Celular e do desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2010.

EVANGELISTA, M.; SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, v. 58, n. 1, p. 33-42, 2008.

FERNANDES T. G. *et al.* Educational levels and the functional dependence of ischemic stroke survivors. **Caderno de Saúde Pública**, v. 28, n. 8, p. 1581-1590, 2012.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors stem cells and their niche. **Cell**, v.116, p. 769-778, 2004.

FUKUCHI, Y. *et al.* Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v.22, n.5, p.649-658, sep. 1, 2004.

GARCIA-SEGURA, L. M.; CHOWEN, J. A.; NAFTAOLIN, F. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.17, n.2, p.180-211. 1996.

GREGORY, C., *et al.* Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 3, p. 2309-2323, 2005.

GRONTHOS, S. *et al.* Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. **Bone**, v. 28, p. 174-181, 2001.

ILANCHERAN, S; MOODLEY, Y; MANUELPIILLAI, U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 2-10, 2009.

IN'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells**, v. 22, n. 7, p. 1338-45, 2004.

JAVAZON, E; BEGGS, K; FLAKE, A. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 414-425, 2004.

KEMP K. *et al.* Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, p. 1569-1580, 2010.

KENDALL, M. D. Functional anatomy of the thymic microenvironment. **J Anat.**, v.177, p.1-29, 1991.

KOHLER, M. C. Análise da expressão de *NEFH* em células-tronco mesenquimais diferenciadas para o fenótipo neural *in vitro*. 2009. 56 f. **Dissertação** (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2009.

KRANZ, A. *et al.* Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats. **Brain Research**, 1315: 128 – 136, 2010.

LEI, Z. *et al.* Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. **Cell Biology International**, v.31, n.9, p.916-923, 2007.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. **Proc Natl Acad Sci**, v.96, n.13, p.7526–7531, 1999.

LIU, N., CHEN, R., *et al.* Expression of IL-10 and TNF- α in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. **Cellular & Molecular Immunology**. Vol. 6. N. 3. 207 – 213. Jun. 2009.

LODISH, H. *et al.* **Molecular Cell Biology**. 4th. New York: W. H. Freeman & Co., 2002.

MAROSTICA, L. L. Análise dos efeitos do mesilato de imatinibe em cultura de células-tronco mesenquimais humanas. 2011. 89 f. **Dissertação** (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2011.

MARTINEZ, R.; GOMES, F. C. A. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway. **Journal of Neuroscience Research**, v.80, n.3, p.341-349, 2005.

MAURI M. *et al.* Mesenchymal stem cells enhance GABAergic transmission in co-cultured hippocampal neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 49, p. 395-405, 2012.

MEIRELLES, L; CHAGASTELLES, P; NARDI, N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.

MENDES DE AGUIAR, C. B. N. Astrócitos e Hormônio da Tireóide (T3): desenvolvimento neuronal e neuroproteção. 2008. 111f. **Tese** (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal

de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2008.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 9, p. 681-687, 2006.

MILLER, R. H. The promise of stem cells for neural repair. **Brain Research**. 1091; p 258 – 264, 2006.

MINGRONI-NETTO, R. C.; DESSEN, E. M. B. **Genética na escola.** Disponível em: <
<http://biossintese.blogspot.com/search/label/C%C3%A9lulas-tronco>>. Acesso em: 13 set. 2009.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.6, p.507-520, jun. 1, 2001.

Nanog in Mammalian ESC Pluripotency. **Sabiosciences**, 2011.
[HTTP://WWW.SABIOSCIENCES.COM/IAPP/NANOG.HTML](http://www.sabiosciences.com/iapp/nanog.html)

PARK, J. S. *et al.* Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair. **Frontiers in Bioscience**, v.12

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 2, p. 300-11, 2008.

PITTENGER, M.F., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

RIAZI A. M.; KWON S. Y.; STANFORD W. L. Stem Cell sources for regenerative medicine. **Methods Molecular Biology**, n. 482, p. 55-90, 2009.

RUFKA G. F. *et al.* Influência das variações circadianas e de temperature no AVEI. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 1, p. 60-63, 2009.

SABAPATHY, V.; RAVI, S.; SRIVASTAVA, V.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, S. Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. **Stem cells international**, v. DOI:10.115, p. 174328, 2012.

SANDERS, R. C.; SLAYTON, W. B.; COGLE, C. R.; FISHER, R. C.; SCOTT, E. W. Stem cell research. **Paediatric respiratory reviews**, v. 7, n. 2, p. 135-40, 2006.

SEMENOV, O. V.; KOESTENBAUER, S.; RIEGEL, M. *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 202, n. 2, p. 193.e1-193.e13, 2010.

SNG J.; LUFKIN T. Emerging Stem Cell Therapies: Treatment, Safety, and Biology. **Stem cells international**, v. DOI:10.1155, p. 521343, 2012.

SONG, X. *et al.* Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the Drosophila Ovary Niches. **Science**, v.296, n.5574, June 7, 2002, p.1855-1857. 2002.

TARANTINO, M.; COSTA R. A medicina fecha o cerco contra o AVC. **Isto É**, a.35, n.2166: p90 – 96, 2011.

TAUPIN, P. Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies. **Med Sci Monit**, v. 12, n. 4, p. RA75-78, 2006.

TONDREAU, T. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. **Differentiation**, v.72, n.7, p.319-326, 2004.

TRENTIN, A. G. *et al.* Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.281, n.5, p.1088-1094, nov. 1, 2001.

TRENTIN, A. G. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. **J Endocrinol**, v.189, n.2, p.189-197, may 1, 2006.

TRENTIN, A. G.; MOURA NETO, V. T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. **Neuroreport**, v.2, p.293-296,1995.

TSAI C-C. *et al.* Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Cell Press*, v. 47, p. 169-182, 2012.

ULLOA-MONTOYA, F.;VERFAILLIE, C. M.; HU, W. S. Culture systems for pluripotent stem cells. **J Biosci Bioeng**, v. 100, n. 1, p. 12-27, 2005.

WALSHE, J.; MASON, I. Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. **Mechanisms of Development**, 90 (2000) 103±110.

WISLET-GENDEBIEN, S. *et al.* Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. **Stem Cells**, v.23, n.3, p.392-402, mar. 1, 2005.

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I. B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v.69, n.6, p.908-917, 2002.

XIONG Y.; MAHMOOD A.; CHOPP M. **Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury.** *Current Opinion in Investigational Drugs*, v. 11, n. 3, p. 298-308, 2010.

YEN, B. L.; HUANG, H. I.; CHIEN, C. C.; JUI, H. Y.; KO, B. S.; YAO, M.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; LEE, M. C.; CHEN, Y. C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2005.

ZHANG, Y. *et al.* Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 7, p. 657-664, 2004.

ZHAO, S. *et al.* JAK2, complemented by a second signal from c-kit or flt-3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hemopoietic cells. **The EMBO Journal**, v.21, n.9, p.2159-2167, 2002.

ZHAO S.; CHAI X.; FORSTER E.; FROTSCHER M. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. **Development**, v. 131, p. 5117-5125, 2004.

ANEXO a – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA E
HEMATOLOGIA CELULAR E MOLECULAR,
BEG-CCB, UFSC

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: *Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoéticas de placenta/cordão umbilical: efeitos do nicho.*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL (ORIENTADOR): Prof. Dr. Marcio Alvarez da Silva

PESQUISADOR PRINCIPAL: Aloisio Luiz Benedetti, Talita da Silva Jeremias, Maria Cecilia Kohler, Maristela Maria Martini e Rossana Simão.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa : *Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoéticas de placenta/cordão umbilical: efeitos do nicho*, sob a responsabilidade do pesquisador Responsável Prof. Dr. Marcio Alvarez da Silva (orientador) e dos Pesquisadores Principais: Aloisio Luiz Benedetti, Talita da Silva Jeremias, Maria Cecilia Kohler, Maristela Maria Martini e Rossana Simão.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender como células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical/placenta podem ser utilizadas para aumentar o número de outras células tronco como as encontradas no sangue do cordão umbilical, as células tronco hematopoéticas.

O TCLE será obtido por um dos pesquisadores responsáveis que serão os profissionais que isolarão e farão a manutenção das CTMs obtidas da placenta.

Na sua participação você será convidado a doar a placenta com um pedaço do cordão umbilical para que esta pesquisa possa ser conduzida. Iremos isolar as CTMs de placenta para estudar como poderemos manipular *in vitro* no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular. As células obtidas serão utilizadas exclusivamente neste trabalho, não serão utilizadas para outros fins ou comercializadas. Neste

sentido somente os profissionais envolvidos terão acesso ao material doado.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Neste procedimento não existem riscos para o paciente nem para o recém nato. Em nenhum momento serão utilizados procedimentos invasivos.

Você é livre para desistir de participar a qualquer momento deste Projeto, sem nenhum prejuízo para o senhor(a).

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor(a).

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: (48) 3721 6905/5553, Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular ou (48)99803643, nos fins de semana.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, garantimos que o material celular obtido, será confidencial e somente será utilizado neste trabalho, podendo ser congelado para posterior avaliação dentro do projeto que foi explicado acima.

Eu _____, fui esclarecido (a) sobre a Pesquisa "*Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoéticas de placenta/cordão umbilical: efeitos do nicho.*" e aceito participar do projeto voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido. Concordo com a doação de parte e/ou totalidade da placenta e cordão umbilical.

Florianópolis, _____ de _____ de 200____.

Assinatura: _____
____RG: _____

ANEXO b – Artigo publicado

DNA AND CELL BIOLOGY
Volume 32, Number 2, 2013
© Mary Ann Liebert, Inc.
Pp. 58-65
DOI: 10.1089/dna.2012.1807

Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Acquire Neural Phenotype Under the Appropriate Niche Conditions

Maristela Maria Martini, Talita da Silva Jeremias, Maria Cecília Kohler, Lucas Lourenço Marostica, Andréa Gonçalves Trentin, and Marcio Alvarez-Silva

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells with clinical interest. It has been reported that MSCs can be isolated from the human term placenta. We investigated the ability of human placenta-derived MSCs to differentiate into a neural phenotype in coculture assays with astrocytes obtained from neonatal rats. Placenta-derived MSCs were cocultured on a confluent monolayer of astrocytes obtained from the rat cerebellum to evaluate the differences in morphology. The extracellular matrix (ECM) produced by astrocytes as well as the growth factors produced by the astrocyte-conditioned medium were evaluated. The expression of the neural markers glial fibrillate acid protein (GFAP) and Nestin was studied in MSCs by immunocytochemistry. MSCs were able to respond to the astrocyte niche in coculture assays. They expressed the neural markers GFAP, Nestin, or β -Tubulin III, followed by an outgrowth of cell processes. The ECM from astrocytes was not effective in inducing the neural phenotype in MSCs, although the expression of β -Tubulin III was observed. When MSCs were cocultured with cerebellar astrocytes from newborn rats, a neural phenotype was achieved. This was determined by immunocytochemistry to GFAP, Nestin, or β -Tubulin III and by morphological changes. It was achieved without the addition of exogenous differentiation factors. This demonstrates that placenta-derived MSCs may be able to differentiate into neural cell types when in direct contact with a neural environment.