

Camila Erlinda Etcheverria

**INFLUÊNCIA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
PLACENTA HUMANA SOBRE A BIOLOGIA DE NEURÔNIOS
E ASTRÓCITOS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós - Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis
2013

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

Etcheverria, Camila Erlinda

Influência de células tronco mesenquimais de placenta humana sobre a biologia de neurônios e astrócitos de camundongos / Camila Erlinda Etcheverria ; orientador, Márcio Alvarez Silva ; co-orientador, Ricardo Castilho Garcez. - Florianópolis, SC, 2013.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células tronco do córion. 3. Neurogênese. 4. AVC isquêmico. I. Alvarez Silva, Márcio. II. Castilho Garcez, Ricardo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família: minha mãe Ruth e minhas tias Fatima e Lenira, sem as quais eu não estaria aqui. Muito obrigada pelo apoio e por acreditarem em meus sonhos. Ao meu marido Pedro, meu eterno companheiro, muito obrigado por aguentar meus dias de mau humor, por me incentivar nos dias de desânimo, e claro, obrigada pelos momentos de alegria, te amo!

Ao meu orientador, Marcio, e meu co-orientador Ricardo, muito obrigada por me aceitarem como orientanda, pela disponibilidade e por todo conhecimento a mim transmitido. Aos outros professores do laboratório, Andréa e Giordano, obrigado por me acolherem também e por toda ajuda que me deram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de apoio técnico e pelo apoio financeiro aos projetos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD, Brasil), pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro aos projetos.

À Fe, minha amigona, obrigada por toda a ajuda nos experimentos, pelas conversas, jantãs, passeios no shopping, enfim, obrigada pelo constante carinho e amizade. À Pri, obrigada por sempre trazer aquele raio de esperança quando tudo parecia perdido, por sempre alegrar nossos momentos juntas e nunca desistir de mim, mesmo eu negando milhares de convites para sairmos hehehehe, obrigada pela paciência e constante amizade! À Mari, muito obrigada por me acolher quando cheguei ao lab., obrigada por me ensinar tudo e por toda a ajuda, amizade, paciência e carinho.

Ao Marcos, muito obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas sempre construtivas e pelos inúmeros conselhos. As queridonas Diana, Addeli, Beatriz, Sílvia, muito obrigada pelos conselhos, amizade, ajuda com os experimentos e companhia.

Michele, Meline, Bruna, Juçara, Bibiane e Talita, e os queridos Diego, Aloisio e Raul, muito obrigada pela companhia e ajuda.

Enfim, sem a presença de todos vocês eu não estaria aqui hoje! Obrigada por tudo!

RESUMO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) isquêmico é uma das doenças que mais levam a óbito no mundo, sendo uma das doenças neurológicas que podem levar a um permanente dano neuronal. O único tratamento aprovado para o AVC agudo é a terapia trombolítica intravenosa, realizada através do ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rtPA), que deve ser administrado ao paciente em no máximo quatro horas e meia após a lesão, restringindo o tratamento a poucos pacientes. Portanto, é necessário um novo tratamento, como a terapia com células tronco (CT). Uma fonte de CT promissora é a placenta humana, cujas CT mesenquimais tem reconhecida ação imunossupressora e capacidade de diferenciação para fenótipos neurais. No entanto, antes de partir para uma terapia celular, é necessário conhecer os mecanismos pelos quais as CT irão atuar, como secreção de fatores e influência das mesmas sobre a biologia de astrócitos e neurônios de camundongos, que foi o objetivo de nosso trabalho. Para isso, foram realizados experimentos de co-cultura e a utilização de meio condicionado (MC) de células tronco mesenquimais de placenta humana (CTMPHs) derivadas do córion. O MC das CTMPHs foi utilizado em diferentes concentrações (10%, 25%, 50% e 75%) sobre culturas de astrócitos e culturas de astrócitos e neurônios de camundongos neonatos, e a co-cultura foi realizada com CTMPHs sobre culturas de astrócitos e culturas de neurônio, também de camundongos neonatos. Após, as células foram fixadas e imunocitoquímicas para GFAP e β -tubulina III foram efetuadas. As células foram contadas e analisadas estatisticamente através do teste ANOVA de 1 via e o pós-teste de Newman - Keuls. Também realizamos marcação para Sytox, afim de verificar a mortalidade celular, em todos os experimentos, e em um grupo de culturas de astrócitos que receberam MC de CTMPHs realizamos o ensaio de MTT para analisar a viabilidade celular. Pudemos concluir que o MC das CTMPHs e a co-cultura com as mesmas não é citotóxico para astrócitos e neurônios, pois não obtivemos marcações positivas com Sytox, assim como no ensaio com MTT, em astrócitos que receberam diferentes concentrações de MC, não houve diferença estatística entre os grupos tratados em comparação aos controles. O MC em baixas concentrações (10% e 25%) não mostrou diferenças em relação ao grupo controle, quando analisou-se a quantidade de células GFAP e β -tubulina III positivas. Já em altas concentrações (50% e 75%), o MC diminuiu a proliferação dos astrócitos (células GFAP positivas) e aumentou a neuronal (células β -

tubulina III positivas). Em relação a co-cultura, o resultado foi o mesmo. Também notamos a presença de neurônios bipolares, maior no grupo que recebeu 75% de MC, e um aumento nos prolongamentos neuronais nos tratados com 50% e 75% de MC e na co-cultura. Juntos, estes resultados nos permitem concluir que as CTMPHs são uma alternativa eficaz para terapias celulares para o AVC ou outras doenças cerebrais.

Palavras - chave: Células tronco do córion. Neurogênese. AVC isquêmico. Terapia celular. Astrócitos.

ABSTRACT

The ischemic stroke is one of the most important disease that lead to death in the world, and one of neurological diseases that can lead to permanent neuronal damage. The only approved treatment for acute stroke is the intravenous thrombolytic therapy, performed using recombinant tissue plasminogen activator (rtPA), that must be administered to the patient within four hours and a half after the injury, restricting the treatment to a few patients. Therefore, a new treatment is required, like stem cell (SC) therapy. A SC promising source is human placenta, whose mesenchymal SC has recognized immunosuppressive action and capacity for differentiation to neural phenotypes. However, before going for a cell therapy, it is necessary to know the mechanisms by which SC will act, as secretion of factors and their influence on the biology of neurons and astrocytes of mice, which was the goal of our work. For this, experiments were carried out using co-culture and conditioned medium (CM) from mesenchymal stem cells from human placenta (MSCHP) derived from the chorion. The CM of MSCHP was used at different concentrations (10%, 25%, 50% and 75%) in astrocyte cultures and cultures of neurons and astrocytes from neonatal mice, and co-culture was performed with MSCHP on astrocyte cultures and cultures of neurons, also of newborn mice. Following, the cells were fixed and a immunocytochemistry for GFAP and β -tubulina III were performed. Cells were counted and analyzed statistically by 1-way ANOVA test and post-test Newman - Keuls. We also perform marking to Sytox in order to check the cell mortality, in all experiments, and a group of astrocyte cultures that received CM from MSCHPs performed the MTT assay to analyze cell viability. We concluded that the CM of MSCHP and co-culture with them is not citotoxic to neurons and astrocytes, as we have not had positive reactions with Sytox, as well as the MTT assay in astrocytes that received different concentrations of CM, there was no statistical difference between the treated groups compared to controls. The CM at low concentrations (10% and 25%) showed no differences compared to control group, when we analyzed the number of GFAP and β -tubulina III positive cells. Already at high concentrations (50% and 75%), CM decreased proliferation of astrocytes (GFAP positive cells) and increased neuronal cells (β -tubulina III positive cells). Regarding co-culture, the result was the same. We also noted the presence of bipolar neurons, increased in the group receiving CM 75%, and an increase in neuronal extensions treated

with 50% and 75% CM and co-culture. Together, these results allow us to conclude that the MSCHP are an effective alternative to cellular therapies for stroke and other brain diseases.

Keywords: Stem cells from the chorion. Neurogenesis. Ischemic stroke. Cell therapy. Astrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da placenta humana.	4
Figura 2 Desenho esquemático ilustrando a cultura de células tronco mesenquimais de placenta humana.	11
Figura 3 Desenho esquemático ilustrando a cultura de astrócitos de camundongos neonatos.	12
Figura 4 Análise da morte celular.	16
Figura 5 Análise da viabilidade celular.	17
Figura 6 Expressão de GFAP em células astrocíticas que receberam MC de CTMPH.	18
Figura 7 Diminuição da presença de células astrocíticas GFAP positivas sob influência de MC de CTMPH.	19
Figura 8 Expressão de B-tubulina III e GFAP em neurônios e astrócitos, respectivamente, tratados com MC de CTMPH.	21
Figura 9 Quantificação da expressão de GFAP e β -tubulina III em astrócitos e neurônios submetidos ao MC de CTMPH.	21
Figura 10 Morfologias celulares de CTMPHs e astrócitos.	22
Figura 11 Marcação de GFAP em astrócitos e CTMPHs em cultura.	23
Figura 12 Quantificação de astrócitos e CTMPHs GFAP positivos.	24
Figura 13 Marcação de GFAP em astrócitos e em astrócitos e CTMPHs em co-cultivo.	24
Figura 14 Quantificação da marcação de GFAP em astrócitos e em astrócitos e CTMPH em co-cultura.	25
Figura 15 Co-cultura de CTMPHs e astrócitos.	26
Figura 16 Marcação de β -tubulina III em neurônios e CTMPHs.	27
Figura 17 Quantificação da marcação de β -tubulina III em neurônios e CTMPHs.	28
Figura 18 Presença das CTMPH na co-cultura com neurônios.	29
Figura 19 Quantificação dos neurônios bipolares sob influência do MC de CTMPH.	30
Figura 20 Tamanhos dos prolongamentos neuronais em cultura sob influência de MC de CTMPH.	31
Figura 21 Neurônios bipolares em culturas neuronais.	32
Figura 22 Tamanho dos prolongamentos neuronais de neurônios em co-cultura com CTMPH.	33

LISTA DE SIGLAS

AVC - Acidente Vascular Cerebral
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado Cerebral
bFGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico
 β -tubulina III - Beta-tubulina III
CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar
CT - Célula Tronco
CTA - Célula Tronco Adulta
CTE - Célula Tronco Embrionária
CTM - Célula Tronco Mesenquimal
CTMPH - Célula Tronco Mesenquimal da Placenta Humana
DAPI - Brometo de etídeo, di-amino-fenilindol
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - Dimetil sulfóxido
EDTA - Etileno-dinitrilo-tetracético
EGF - Fator de Crescimento Epidermal
FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos
FITC - Isotiocianato de Flouresceína
GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial
HGF - Fator de Crescimento de Hepatócito
IL-6 - Interleucina - 6
IL-8 - Interleucina - 8
IMDM - *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
KGF - Fator de Crescimento do Queratinócito
LACERT - Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual
LIF - Fator Inibitório de Leucemia
MC - Meio Condicionado
MCP - Proteína Quimiotática de Monócitos
miRNA - Micro RNA
MMP - Metaloproteínases da Matriz
MTT - 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium brometo
NMDA - N-metil-D-aspartato
PBS - Tampão Fosfato Salino
RPM - Rotações Por Minuto
rtPA - Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante
RT - PCR - Reação da Transcriptase Reversa em Cadeia da Polimerase
SBF - Soro Bovino Fetal
SCF - Fator de Célula Tronco
SUS - Sistema Único de Saúde

TGF - Fator de Crescimento Transformador

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TXRD - Vermelho do Texas

VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	2
1.1.1- Acidente Vascular Cerebral Isquêmico	2
1.2- CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA (CTMPH).....	3
1.3 MICROAMBIENTE CELULAR	5
1.4 O CÓRTEX CEREBRAL.....	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 PLACENTA HUMANA	9
3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA (CTMPH).....	9
3.3 ANIMAIS	11
3.4 CULTURA DE ASTRÓCITOS.....	11
3.5 CO-CULTURA	12
3.6 MEIO CONDICIONADO DE CTMPH	13
3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA	14
3.8 ANÁLISE DA MORTE CELULAR	14
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4 RESULTADOS	16
4.1 MICROAMBIENTE DAS CTMPHS NÃO PROVOCA A MORTE DE NEURÔNIOS E CÉLULAS GLIAIS	16
4.2 MEIO CONDICIONADO DE CTMPH NÃO ALTERA A SOBREVIVÊNCIA DE ASTRÓCITOS	16
4.3 O MEIO CONDICIONADO (MC) DE CTMPH PODE INFLUENCIAR NA QUANTIDADE DE ASTRÓCITOS EM CULTURA.....	17
4.4 EFEITOS ANTI-GLIOGÊNICO E NEUROGÊNICO DO MC DE CTMPH SOBRE CULTURA DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS	19
4.5 A CO-CULTURA DE CTMPHS SOBRE ASTRÓCITOS DIMINUI A QUANTIDADE DOS MESMOS	22

4.6 A CO-CULTURA DE CTMPHS SOBRE NEURÔNIOS AUMENTA A QUANTIDADE NEURONAL.....	26
4.7 O MC DE CTMPH INFLUENCIA DE MANEIRA POSITIVA A NEURITOGÊNESE EM NEURÔNIOS.....	29
4.8 EFEITOS POSITIVOS SOBRE A NEURITOGÊNESE DE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA COM CTMPH.....	32
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma doença que traz grandes mudanças para o indivíduo afetado e para a família, sendo uma das doenças neurológicas que podem levar a um permanente dano neuronal (Zhang, *et. al.*, 2011). O AVC está entre as doenças que mais levam a óbito no mundo, e no Brasil foram, apenas no ano de 2009, 70.232 óbitos, e no ano de 2010 registrou-se pelo Sistema Único de Saúde (SUS) 169.453 internações por AVC (Ministério da Saúde, 2010).

Dependendo da região cerebral que foi afetada, o paciente pode desenvolver deficiências motoras, depressão, perdas sensoriais, de memória, da visão, e hemiplegia (paralisação muscular em um dos lados do corpo, contralateral ao lado onde ocorreu o AVC). Também acarretará um alto custo médico, sendo um problema global (Zhang *et al.*, 2011).

O início relativamente abrupto de sintomas persistentes é uma característica marcante do AVC, tais como paralisia ou perda das sensações devido à destruição do tecido cerebral. As causas mais comuns de AVC são o rompimento de um vaso sanguíneo na pia-máter ou encéfalo (caracterizando o **AVC hemorrágico**) ou a interrupção do fluxo sanguíneo encefálico através de coágulos sanguíneos ou pela formação de placas ateroscleróticas (caracterizando o **AVC isquêmico**) sendo este último o tipo de AVC mais comum (Tortora & Grabowski, 2006).

1.1.1- Acidente Vascular Cerebral Isquêmico

No AVC isquêmico, se houver a parada completa da circulação cerebral no local onde ocorreu a isquemia, levará em segundos a cessação da atividade elétrica neuronal, e em poucos minutos, provocará a deterioração do estado energético e homeostase iônica. Diminuição de fosfatos de alta energia, falha das bombas iônicas da membrana, efluxo de potássio celular, influxo de sódio, cloreto e água, e despolarização da membrana ocorrem rapidamente. Se este caos persistir por mais de 5–10 minutos, o dano celular será irreversível. No entanto, se a isquemia é incompleta, o resultado é mais difícil de prever, e é altamente

dependente de uma perfusão residual (uma pequena quantidade de fluxo sanguíneo que pode persistir no local da lesão) ou disponibilidade de oxigênio (Astrup *et al.*, 1981).

Na lesão cerebral causada por AVC isquêmico podem ser identificadas duas áreas, o **centro isquêmico**, onde o fluído sanguíneo local cerebral é drasticamente reduzido, levando a uma hipóxia severa, comprometendo totalmente as funções fisiológicas e resultando na necrose do tecido afetado. Adjacente ao centro isquêmico encontra-se a **área de penumbra**, região onde o fluído sanguíneo é suficientemente reduzido a ponto de causar hipóxia e comprometimento das funções celulares, sem, no entanto, provocar falha irreversível do metabolismo energético e necrose (Ginsberg, 2003, Paciaroni *et al.*, 2009), sendo muitas vezes definido como um tecido viável que está envolvendo o irreversivelmente danificado centro isquêmico (Arsene *et al.*, 2011).

Embora inúmeras pesquisas tenham sido realizadas nos últimos anos, o único tratamento aprovado para o AVC agudo é a terapia trombolítica intravenosa, realizada através do ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rtPA), que deve ser administrado ao paciente em no máximo quatro horas e meia após a lesão, demonstrando benefícios significantes aos mesmos (Paciaroni *et al.*, 2009). No entanto, como o tempo para administração do rtPA é muito curto, ele torna-se inviável para muitos pacientes. Novas formas de tratamento para o AVC são, portanto, necessárias. Uma alternativa bastante atraente poderiam ser propostas terapêuticas utilizando as células tronco.

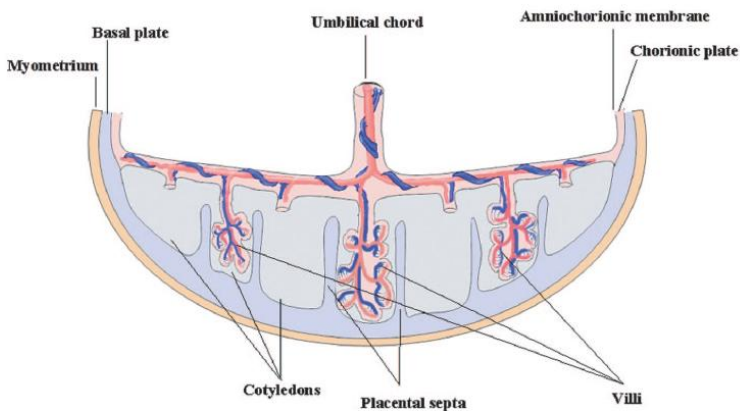
Dados recentes demonstram que animais submetidos à lesão isquêmica cerebral, apresentaram uma redução do volume na área do infarto, após o implante de células tronco mesenquimais (CTMs) na região da lesão (Liu *et al.*, 2009a). Estes dados sugerem um possível efeito reparador das CTMs em casos de lesões do SNC.

1.2 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA (CTMPH)

Existem diferentes tipos de células tronco (CT), as embrionárias (CTE), derivadas da massa celular interna do blastocisto, são totipotentes, pois originam todos os tipos celulares do embrião, e as células tronco adultas (CTA), ou somáticas, que constantemente repõem células nos seus tecidos de origem. As CT são células multipotentes, capazes de originar vários tipos celulares, e de se autorrenovarem, com uma habilidade ilimitada de produzir novas descendentes sem perda de potencialidade. (Miller, 2006).

As CTMs estão distribuídas em uma variedade de tecidos do organismo humano adulto, como medula óssea, pulmão, fígado e rins. Além desses tecidos humanos adultos, as CTMs podem ser encontradas na placenta (Fukuchi, *et al.*, 2004). A placenta é um órgão temporário discoide formado durante o desenvolvimento embrionário, parte composta por tecidos de origem materna e parte por tecidos de origem fetal. Ela é composta por um disco coriônico, de onde se estendem as membranas fetais amnióticas e coriônicas, que mantêm o feto na cavidade amniótica, e a decídua endometrial (Fukuchi, *et al.*, 2004, Parolini *et al.*, 2008, Kadam *et al.*, 2010).

A placa coriônica é uma estrutura com várias camadas que esta adjacente a cavidade amniótica (Figura 1). Ela consiste em duas estruturas diferentes, a membrana amniótica (composta de epitélio, uma camada compacta, mesoderma amniótico e uma camada esponjosa) e o córion (composto de mesênquima e uma região de proliferação extravilosa de células do trofoblasto). Os vilos se originam da placa coriônica e ancoram a placenta através da placa basal do trofoblasto e do endométrio materno. Do lado materno, protrusões da placa basal com os vilos coriônicos produzem os septos placentários, que dividem o parênquima em cotilédones regulares (Parolini *et al.*, 2008).



www.StemCells.com

Figura 1 Estrutura da placenta humana.

Além de desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e nutrição fetal, a placenta pode também representar uma reserva de células tronco ou progenitoras (Fukuchi, *et al.*, 2004,

Kadam *et al.*, 2010), sendo o principal órgão hematopoiético (Alvarez-Silva, *et al.*, 2003).

Resultados confirmam que estas células derivadas da placenta humana se assemelham às CTMs, pois tem a capacidade de, quando induzidas, se diferenciarem em hepatócitos, endotélio vascular, cartilagem e células semelhantes às neurais, além de expressarem genes que as CTMs expressam, como HOXB4, CD34, AC133, flk-1, Tie-2, GATA-4 e miogenina (Fukuchi, *et al.*, 2004).

As CTMs isoladas da placenta humana (CTMPH) após o parto apresentam uma série de vantagens em relação a outras fontes de CT. O fato de a placenta ter tecidos de origem fetal pode conferir às CTMPH uma maior potencialidade em relação às CTA. Além disso, a placenta é um tecido de acesso fácil, não sendo necessário nenhum procedimento invasivo para sua obtenção, como por exemplo para obtenção das CT da medula óssea, não tendo também a complicação ética que as CTE possuem (Yen *et al.*, 2005).

Atualmente, vários estudos vem sendo feitos utilizando-se experimentalmente CTs de diversas fontes para tratamento de AVC, sendo elas CTEs, CTMs derivadas de vários tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e placenta humanos. No entanto, antes de partir para uma terapia celular, é necessário conhecer as vias patológicas do AVC, bem como os mecanismos pelos quais as CT irão atuar, como vias de sinalização e secreção de fatores de crescimento (Smith & Gavins, 2012).

1.3 MICROAMBIENTE CELULAR

O complexo meio composto por células e matriz extracelular, bem como as moléculas associadas a cada população de células tronco, é coletivamente denominado nicho celular (Spradling *et al.*, 2001). A estrutura física do nicho varia entre organismos e entre os tipos de células tronco, sua composição pode variar de uma única célula ou tipo celular, para muitas células de vários tipos (Chen *et al.*, 2013).

A matriz extracelular é um complexo molecular tridimensional secretado pelas células, que varia na composição e diversidade, e tem como função suportar o metabolismo, a viabilidade celular e realizar funções fisiológicas (Badylak, 2007). Ela consiste em componentes básicos (como fibronectina, colágeno e outras glicoproteínas, ácido hialurônico, proteoglicanos, e elastinas), e também abriga moléculas como hormônios e fatores de crescimento (TGF- β , LIF, bFGF, SCF,

FLTK-3 ligante, trombopoetina, CNTF, IL-6 e outros membros da família) (Mannello & Tonti, 2007).

Além da sua capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, as CTMs regulam respostas imunes e inflamatórias, possuem um efeito reparador através da sinalização parácrina, pela liberação de moléculas biologicamente ativas que afetam a migração celular, proliferação e sobrevivência das células ao redor (Maxson *et al.*, 2012). Comparando-se as CTMs derivadas da medula óssea com as CTMPHs, nota-se diferenças mínimas no fenótipo celular, diferenciação e propriedades imunomodulatórias (Barlow *et al.*, 2008), e assim como as CTMs de outras fontes, as CTMPHs também são imuno-privilegiadas, gerando uma baixa resposta imunológica em enxertos, permitindo o uso alógeno (Banas *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que as células da membrana amniótica da placenta humana secretam vários fatores de crescimento, como EGF, KGF, HGF, bFGF, e a família dos TGFs, todos identificados via RT-PCR e ELISA (Koizumi *et al.*, 2000), fornecendo a estas células as características necessárias para experimentos como co-culturas ou uso de seu meio condicionado.

1.4 O CÓRTEX CEREBRAL

O córtex cerebral cobre quase o cérebro humano inteiro, devido ao seu enorme crescimento e aumento na sua área superficial durante a evolução dos mamíferos. Ele se forma da região mais rostral do tubo neural, o prosencéfalo, que posteriormente se organiza em telencéfalo e diencefalo. A região dorsal do telencéfalo da origem ao córtex, que compreende o neocórtex, paleocórtex e arqueocórtex (hipotálamo) (Götz & Sommer, 2005).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) no período pré-natal, o córtex cerebral começa a se formar. Neurônios se formam de células precursoras que migram radialmente para fora da zona ventricular para se tornarem ligados via interconexões sinápticas em uma complexa rede de circuitos neuronais. Neste processo, estes neurônios prosseguem através de múltiplos estágios de desenvolvimento, migração, extensão axonal, dendritogênese e formação de sinapses funcionais (Rapoport & Gogtay, 2008; Kilpatrick *et al.*, 2012).

Outras células presentes no córtex são os astrócitos, que estão em maior número e desempenham várias funções, como suporte e

nutrição dos neurônios. Astrócitos em todo o cérebro surgem de glias radiais, a primeira população celular embrionária de precursores neurais, que origina linhagens neurais e gliais durante o desenvolvimento cerebral. Os corpos celulares das glias radiais residem na zona ventricular e mantêm contato apical com o ventrículo cerebral adjacente. Elas estendem finos processos radiais de seu soma para a superfície do cérebro em desenvolvimento, e mantêm esse contato apical - basal durante todo o desenvolvimento. Enquanto o cérebro cresce, e novas células são adicionadas, as células gliais alongam seus processos radiais e continuam com seu contato apical-basal (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

O número de astrócitos aumenta dramaticamente nas três primeiras semanas pós-natais em camundongos. No córtex, uma região não neurogênica em camundongos pós-natais e adultos, a expansão de células gliais ocorre resulta de divisões simétricas de astrócitos locais (Ge *et al.*, 2012).

Estudos indicam que as características funcionais do processamento de informações em neurônios corticais são estabelecidas muito cedo durante o processo do desenvolvimento, a nível de célula precursora, e que já nesses estágios iniciais do desenvolvimento, neuronal e glial heterogeneidade estão prefiguradas, tornando o córtex cerebral um bom modelo para estudo (Götz & Sommer, 2005).

De acordo com os dados apresentados ao longo desta introdução, realizamos esta pesquisa, pois além de ser necessário outras formas de tratamento para o AVC, como a terapia com CTMPHs, também é imprescindível conhecer os mecanismos pelos quais estas células irão atuar, se serão benéficas às células do SNC ou citotóxicas e se promoverão uma melhora na lesão, atuando no aumento / diminuição da neurogênese ou gliogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do microambiente produzido pelas células tronco mesenquimais de placenta humana sobre a biologia de neurônios e astrócitos de córtex e cerebelo de camundongos neonatos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito do meio condicionado de células tronco mesenquimais de placenta humana na proliferação ou sobrevida de astrócitos de córtex e cerebelo;
- b) Avaliar o efeito do meio condicionado de células tronco mesenquimais de placenta humana sobre a diferenciação glial e neuronal;
- c) Avaliar o efeito do co-cultivo de células tronco mesenquimais de placenta humana com astrócitos e neurônios sobre diferenciação glial e neuronal;
- d) Avaliar o efeito da co-cultura e do meio condicionado de células tronco mesenquimais de placenta humana sobre a neuritogênese de neurônios de camundongos neonatos *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLACENTA HUMANA

As placentas foram obtidas através de colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), onde pacientes com saúde qualificada doaram suas placentas após apresentação do termo de consentimento, que esclareceu às doadoras a linha de pesquisa, a segurança e seriedade com que esta foi realizada. A placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril, contendo salina tamponada por fosfato (PBS) e encaminhada para cultura no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Celular (LACERT). Para realização das culturas, foi utilizada apenas a parte fetal da placenta, na região coriônica, próxima ao cordão umbilical. Todos os procedimentos realizados durante este trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através do número de protocolo 1962/11-CEPSH/PRPG.

3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA (CTMPH)

Fragmentos de placenta (aproximadamente 2 cm²) foram manipulados em placas de Petry, contendo PBS 1X, a fim de remover os fragmentos de córion viloso, deixando apenas a fina camada correspondente a placa coriônica. Foram removidos os vasos sanguíneos e o fragmento de córion foi dissociado manualmente com o auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15 ml que continha PBS 1X e 200 µl da enzima dispase (BD), que foi colocado no banho maria à 37°C por oito minutos.

Ao término dos oito minutos, o tubo contendo os fragmentos foi centrifugado rapidamente por 20 segundos, o sobrenadante descartado e os fragmentos foram transferidos para outro tubo de centrífuga, agora de 50 ml, que continha PBS 1 X e 1 ml da enzima colagenase IA (Sigma) e permaneceram durante uma hora no banho maria à 37°C. Após, adicionou-se aproximadamente 5 ml de meio de cultura IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), suplementado

com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e penicilina/estreptomicina (Gibco), conforme orientações do fabricante, a fim de inativar a enzima colagenase. O conteúdo do tubo foi filtrado em um Cell Strainer (BD), que havia sido previamente colocado sob outro tubo de 50 ml. Adicionou-se 5 ml de meio IMDM (preparado nas mesmas condições previamente descritas) ao filtrado, que foi transferido para tubos de 15 ml e centrifugado durante 10 minutos à 1650 RPM. Acrescentou-se mais 5 ml de meio de cultura e foi novamente centrifugado, durante 7 minutos à 1200 rotações por minuto (RPM).

O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de meio IMDM suplementado com 10% SBF ao conteúdo final no tubo, sendo então homogeneizado e colocado em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning), que já continham 3 ml de IMDM com 10% de SBF, e mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂. Após 2 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 CTMPHs por sua adesão ao plástico (Figura 2).

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, constituindo assim a passagem 1. As passagens subsequentes foram caracterizadas pelo mesmo procedimento de remoção das células aderidas das garrafas de cultura, através da enzima tripsina. A cada remoção, foi contabilizada uma passagem, até atingir a passagem 3. Foram realizadas cinco culturas de CTMPH, uma para cada experimento, utilizando uma placenta em cada um.

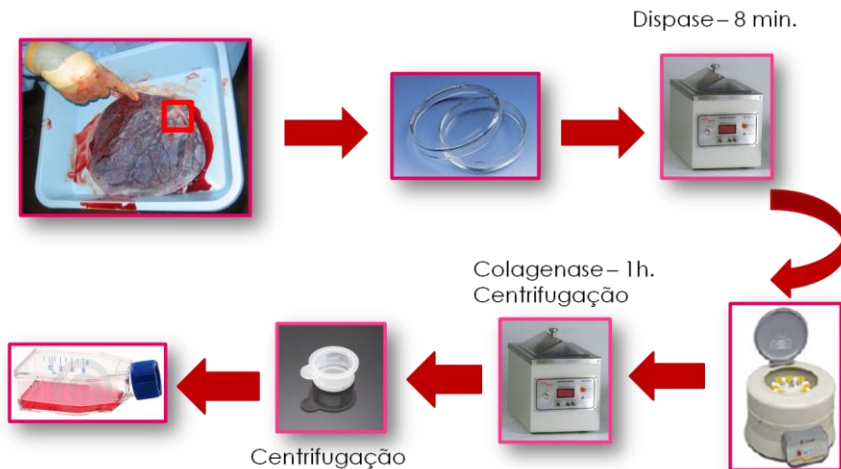


Figura 2 Desenho esquemático ilustrando a cultura de células tronco mesenquimais de placenta humana.

3.3 ANIMAIS

Para a realização das culturas de astrócitos e neurônios foram utilizados 15 camundongos da linhagem C57 black, recém-nascidos (0-3 dias) e de ambos os sexos. Os animais foram obtidos no Biotério de nosso laboratório (LACERT) e 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).

3.4 CULTURA DE ASTRÓCITOS

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas de córtex cerebral e cerebelo de ratos neonatos. Após os animais serem sacrificados, com o auxílio de pinças ponta fina e tesouras, os encéfalos foram retirados da caixa craniana em fluxo laminar, e colocados em placas de Petry contendo PBS 1X suplementado com 30% de glicose. Os cerebelos e os córtex foram separados e as meninges retiradas. O tecido foi picotado e dissociado manualmente com pipeta Pasteur em PBS-glicose. As células foram centrifugadas, o sobrenadante

descartado, e ressuspensas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF. As células foram plaqueadas em placas de 24 e 75 poços, que haviam sido preparadas previamente com poli-lisina (0,5mg/mL de poli-lisina diluída em PBS), na densidade de 1×10^5 células em 300 μ l de meio DMEM/F12 com 10% de SBF, e foram mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂ (MARTINI, 2013) (Figura 3).

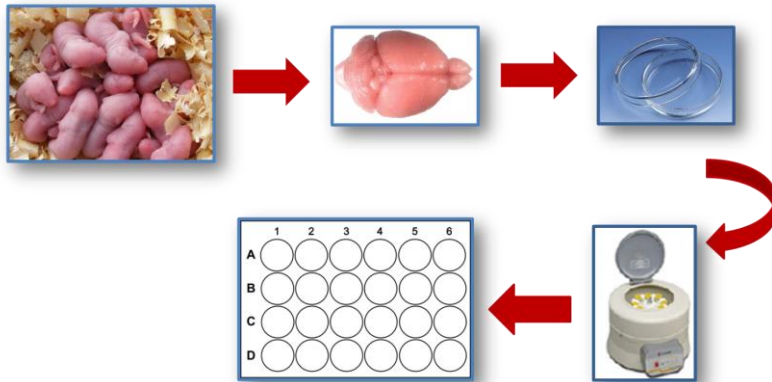


Figura 3 Desenho esquemático ilustrando a cultura de astrócitos de camundongos neonatos.

3.5 CO-CULTURA

Após confluência da cultura de astrócitos do córtex (80 – 90%), o que ocorre por volta de 11 dias, o DMEM-F12 com 10% de SBF foi substituído por DMEM-F12 sem SBF (a substituição do meio com SBF por meio sem SBF se deu para garantir que após os 14 dias só teríamos células astrocitárias, devido aos neurônios morrerem na ausência de soro). Após 3 dias, totalizando 14 dias de cultura astrocitária, as CTMPHs de córion liso (em passagem 3) foram plaqueadas sobre a monocamada de astrócitos, na densidade de 10^4 células, e mantidas em co-cultura durante 4 dias, suplementadas em DMEM-F12 com 10% SBF. No 18º dia da cultura, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% para posterior análise imunofenotípica da influência do contato celular entre CTMPHs e células astrocitárias.

Para a co-cultura com células neuronais, as CTMPHs foram plaqueadas no 2º dia da cultura para garantir que houvesse uma grande quantidade de neurônios. A co-cultura foi mantida nas mesmas condições mencionadas anteriormente e no 6º dia de cultura (4º dia de co-cultura) as células foram fixadas com paraformaldeído 4% para posterior análise imunofenotípica. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e tiveram grupos controle sem a co-cultura.

3.6 MEIO CONDICIONADO DE CTMPH

O meio condicionado utilizado foi o IMDM, nas condições previamente descritas, que ficou em contato com as CTMPHs em cultura durante 3 dias. Na cultura de neurônios e astrócitos do córtex, ele foi adicionado ao meio DMEM F-12 suplementado com SBF no 11º dia de cultivo, nas concentrações de 50% e 75% e no 14º dia as células foram fixadas com paraformaldeído 4% para análise imunofenotípica. Neste experimento, não foi retirado o SBF das culturas de encéfalo de camundongo.

Nas culturas de astrócitos do córtex o experimento foi realizado nas mesmas condições previamente descritas, no 11º dia foi retirado o SBF na troca do meio e no 14º dia foi colocado o meio condicionado (IMDM, nas mesmas condições anteriormente citadas, que também esteve em contato com as CTMPHs durante 3 dias) nas concentrações de 10%, 25%, 50% e 75%. No 18º dia de experimento, as células foram fixadas.

Para analisar a viabilidade celular foi realizado o MTT, um ensaio colorimétrico que mede a atividade celular enzimática. Para este experimento, utilizou-se uma placa de 96 poços, onde do centro até a periferia do lado esquerdo, se plaqueou células de córtex de camundongo neonato e do centro da placa até o término do lado direito, células de cerebelo. O meio condicionado foi adicionado nas concentrações de 10%, 25%, 50% e 75% no 14º dia do experimento, após as células terem ficado 3 dias sem SBF, que foi retirado na troca de meio no 11º dia. No 19º dia, 10 µl de MTT foi adicionado a cada 100 µl de meio de cultura, em todos os poços, e as placas ficaram em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂ pelo período de 3 a 4 horas. Após, adicionou-se 100 µl de DMSO por poço, deixou-se a temperatura ambiente por 20 minutos e mais 10 minutos sob agitação, e então foi realizada a leitura no Laboratório Multiusuário de

Estudos em Biologia através da Multileitora Infinite M200 TECAN. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e tiveram poços controle que não receberam meio condicionado.

3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA

As co-culturas e culturas que receberam o meio condicionado foram fixadas com paraformaldeído 4% e submetidas à imunocitoquímica onde foram utilizados marcadores específicos para fenótipos neurais e gliais.

As células foram fixadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, sendo lavadas posteriormente com PBS. Tais células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,2%) durante 20 minutos e lavadas 3 vezes com PBS Tween (0,1%). Sítios não específicos foram bloqueados com 10% de SBF. Logo após, estas células foram incubadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpos primários. Após serem lavadas com PBS Tween, as células foram incubadas com anticorpo secundário, durante 1 hora, em temperatura ambiente.

Para visualização nuclear, as células foram incubadas durante 30 segundos com o corante nuclear 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI - 1:1000, Sigma). As células gliais foram identificadas pela presença da proteína fibrilar ácida glial (GFAP- 1:100 - Abcam) e para a identificação dos neurônios, foi utilizado o anticorpo anti β -tubulina III (1:1000 - Promega).

Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, Alexa GAM 488 IgG (1:500 - Invitrogen), para o primário anti- β -tubulina III, e Alexa GAR 488 IgG (1:500 - Invitrogen) para o primário GFAP ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ao *Texas Red* (TXRD). A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus BX 40. Os poços foram fotografados, com a objetiva de 40X, onde foram tiradas 20 fotos por poço de cada marcação anti β -tubulina III, GFAP e DAPI. Após, as células foram contadas, com o auxílio do programa *Image J* e a morfologia analisada visualmente.

3.8 ANÁLISE DA MORTE CELULAR

Em todos os experimentos, antes da fixação com paraformaldeído, realizou-se em poços de ambas condições, controle e tratado, a análise da morte celular com Sytox. Alíquotas de Sytox na concentração de 25 μ M foram diluídas em 1:100 em meio de cultura (DMEM - F12 ou IMDM, de acordo com o experimento). Os meios de cultivo foram retirados dos poços, que foram lavados duas vezes com PBS 1X, e após incubou-se o Sytox, previamente diluído, por 10 minutos à 37°C em estufa úmida.

Após, o Sytox foi retirado e os poços novamente lavados duas vezes com PBS 1X. As células foram fixadas durante 30 minutos com paraformaldeído 4%, protegidas da luz e a temperatura ambiente. Logo após, foram lavadas com PBS 1X (3 lavagens de 5 minutos cada) e incubadas com DAPI, na concentração de 1:1000, novamente lavadas com PBS 1X e então levadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX 40 para análise.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente com o programa *GraphPad Prism 5*, onde foi utilizado o teste Anova de uma via e o pós teste de Newman - Keuls para comparar grupos controle com tratado.

4 RESULTADOS

4.1 MICROAMBIENTE DAS CTMPHS NÃO PROVOCA A MORTE DE NEURÔNIOS E CÉLULAS GLIAIS

A análise da morte celular com Sytox foi realizada nos experimentos de co-cultura (CTMPH em co-cultura com astrócitos, e CTMPH em co-cultura com neurônios) e nos experimentos de meio condicionado de CTMPH (culturas de astrócitos e culturas de neurônios e astrócitos) e em nenhum dos grupos obteve-se marcação de Sytox (Figura 4), indicando a ausência de células mortas, ou uma quantidade insignificante das mesmas, que podem ter sido retiradas durante as lavagens com PBS1X.

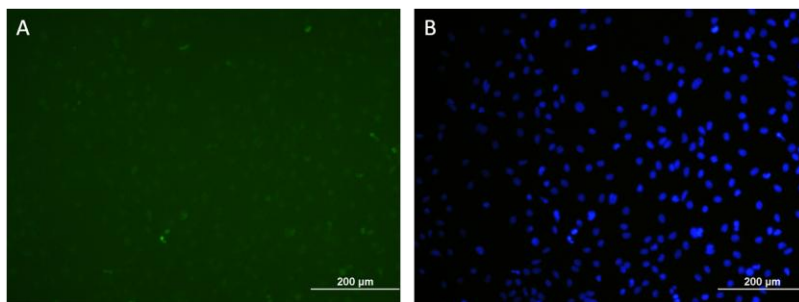


Figura 4 Análise da morte celular. Fotos representativas, onde em A temos um poço marcado com Sytox no grupo da co-cultura de CTMPH e astrócitos, e na foto B, observa-se a marcação nuclear com DAPI no mesmo campo em que a foto A foi tirada. Pode-se observar a ausência de pontos verdes, que caracterizariam a marcação com Sytox na foto A, e com a marcação de DAPI na foto B comprova-se a presença de células no poço.

4.2 MEIO CONDICIONADO DE CTMPH NÃO ALTERA A SOBREVIVÊNCIA DE ASTRÓCITOS

A análise da viabilidade celular foi efetuada com o MTT em culturas separadas de córtex e cerebelo de camundongos neonatos, que no 14º dia da cultura receberam meio condicionado (MC) de células tronco mesenquimais de placenta humana (CTMPH), nas seguintes concentrações: 0% (grupo controle), 10%, 25%, 50% e 75%. Nenhum

dos grupos tratados mostraram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, sugerindo que o MC das CTMPH não apresenta efeitos citotóxicos para as células astrocíticas de córtex e cerebelo (Figura 5).

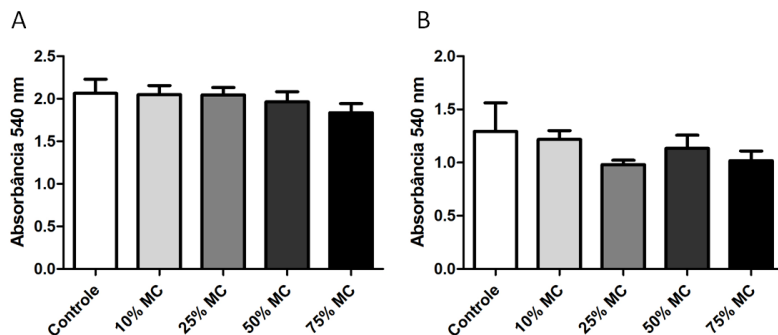


Figura 5 Análise da viabilidade celular. A análise foi realizada com MTT em culturas de astrócitos de córtex (foto A) e de cerebelo (foto B) de camundongos neonatos, que receberam diferentes concentrações de MC de CTMPH, ou nenhuma, como os grupos controle. As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas nas comparações entre o grupo controle e os tratados com MC.

4.3 O MEIO CONDICIONADO (MC) DE CTMPH PODE INFLUENCIAR NA QUANTIDADE DE ASTRÓCITOS EM CULTURA

Para avaliar os possíveis efeitos que o MC de CTMPH têm sobre as células gliais de córtex de camundongos, foram utilizadas diferentes concentrações de MC: 0% (controles), 10%, 25%, 50% e 75%. O MC foi colocado nas culturas no 14º dia, as células foram fixadas no 18º dia e a imunocitoquímica feita para GFAP. Os poços foram fotografados no microscópio de fluorescência com a objetiva de 40X, onde foram tiradas 20 fotos por poço para cada marcação (GFAP e DAPI). As células marcadas positivamente com GFAP foram contadas com o auxílio do programa *Image J*, e os resultados analisados no programa *Graph Pad Prism*.

O grupo tratado que recebeu 10% de MC apresentou uma média de 97,51 células GFAP positivas por poço, o grupo que recebeu

25% de MC apresentou 111,83 células GFAP positivas por poço e o controle, que não recebeu MC, obteve média de 104,38 células GFAP positivas por poço, o que não foi significativo estatisticamente, indicando que o MC em baixas concentrações não é citotóxico nem promotor de proliferação celular (Figura 6).

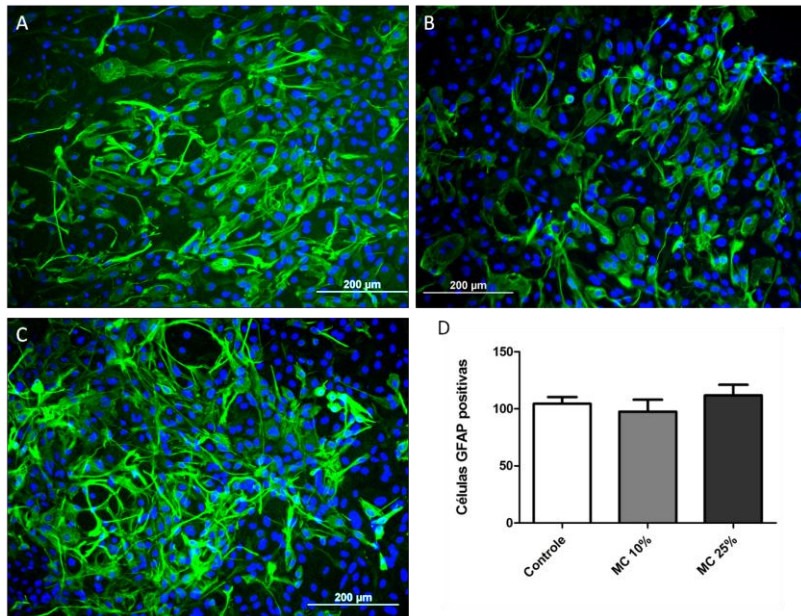


Figura 6 Expressão de GFAP em células astrocíticas que receberam MC de CTMPH. Fotos representativas da expressão de GFAP (em verde) em culturas de astrócitos que receberam 10% de MC de CTMPH (foto B), 25% de MC de CTMPH (foto C), e o grupo controle (foto A), que não recebeu MC. Em azul (DAPI) podemos ver os núcleos celulares corados. A figura D nos mostra que a quantidade de células GFAP positivas não variou entre os grupos analisados.

Já os grupos que receberam maiores concentrações de MC, 50% e 75%, apresentaram menor quantidade de células GFAP positivas em relação ao controle, o que foi significativo estatisticamente, em comparação ao grupo controle, sugerindo que o MC das CTMPH em altas concentrações pode influenciar na diminuição da proliferação celular dos astrócitos (Figura 7). Quando as células GFAP positivas foram quantificadas obtivemos média de 104,38 células por poço no

grupo controle, 82,01 células positivas nos poços tratados que receberam 50% de MC e 42,06 células nos poços com 75% de MC (Figura 6 - D).

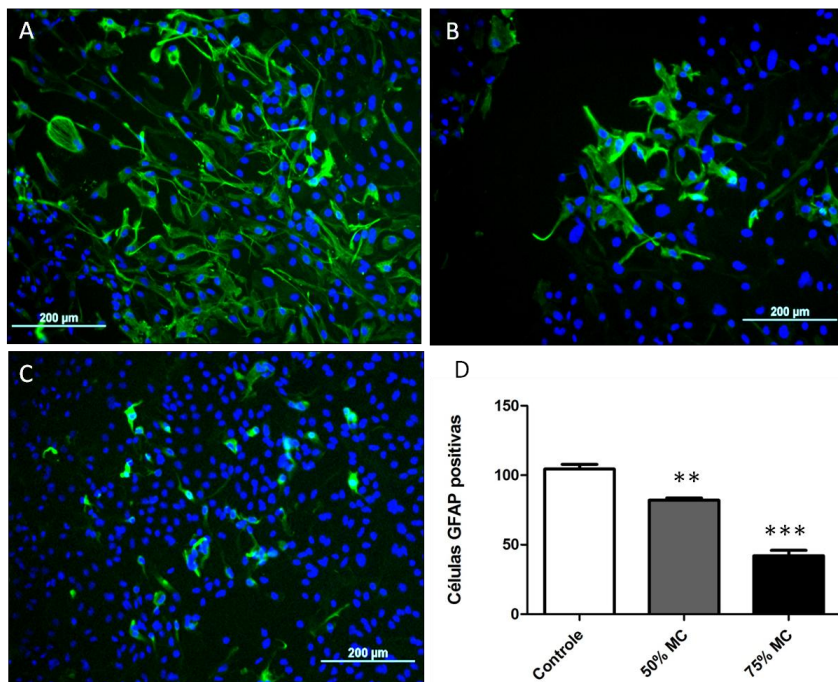


Figura 7 Diminuição da presença de células astrocíticas GFAP positivas sob influência de MC de CTMPH. Comparação da expressão de GFAP (corado em verde) entre os grupos controle (foto A) e tratados que receberam MC nas concentrações de 50% (foto B) e 75% (foto C). Podemos perceber que as células astrocíticas dos grupos tratados marcadas positivamente com GFAP estão em menor quantidade em relação ao grupo controle, e que as mesmas apresentam um citoplasma mais individualizado e menos alongado. Os núcleos celulares estão corados em azul (DAPI). Estatisticamente, a comparação entre o controle e os grupos de 50% e 75% de MC foram significantes, onde ** e *** significam $P < 0,05$.

4.4 EFEITOS ANTI-GLIOGÊNICO E NEUROGÊNICO DO MC DE CTMPH SOBRE CULTURA DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS

Baseando-se nos resultados anteriores, repetimos o experimento com algumas modificações. Realizou-se uma cultura de células de córtex de camundongos neonatos, onde no 11º dia o SBF não foi retirado para que os neurônios também fossem analisados, sendo colocado o MC das CTMPHs. Utilizamos MC nas concentrações de 50% e 75%, as quais obtivemos resultados positivos no experimento anterior, mantendo o grupo controle. No 14º dia de cultura, as células foram fixadas, e para avaliar a morfologia de células neuronais e gliais juntas, foi realizada uma dupla marcação com GFAP e β -tubulina III. Após, as células foram analisadas e fotografadas no microscópio de fluorescência, e as células contadas com auxílio do programa *Image J*, como explicado anteriormente.

Analisando os resultados vimos que os grupos tratados com 75% de MC de CTMPH apresentaram os melhores resultados, sendo significantes estatisticamente. Em relação ao grupo controle (média de 392,11 células GFAP positivas por poço), a quantidade de células GFAP positivas dos poços tratados com 75% de MC (média de 344 células por poço) foram menores, enquanto que a quantidade das células β -tubulina III positivas (média de 35,33 células por poço) foi superior em relação ao grupo controle (média de 29,68 células por poço). Os grupos tratados com 50% de MC apresentaram quantidades de células GFAP positivas e β -tubulina III positivas semelhantes ao grupo controle, não sendo significante estatisticamente (figuras 8 e 9).

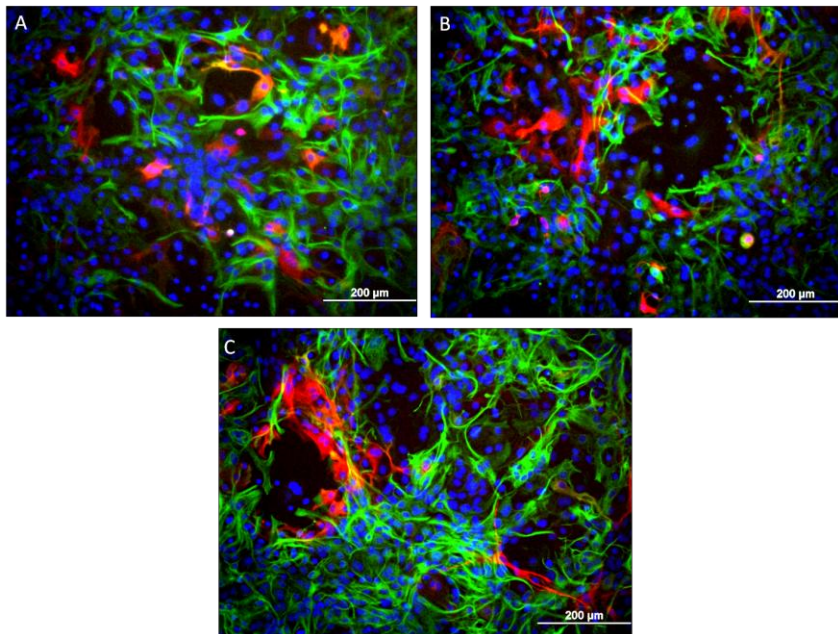


Figura 8 Expressão de B-tubulina III e GFAP em neurônios e astrócitos, respectivamente, tratados com MC de CTMPH. Fotos representativas dos grupos controle (foto A), grupo tratado com 50% de MC (foto B) e grupo tratado com 75% de MC (foto C), onde podemos visualizar células GFAP positivas, marcadas em verde, e células β -tubulina III positivas, marcadas em vermelho. Os núcleos estão corados em azul (DAPI).

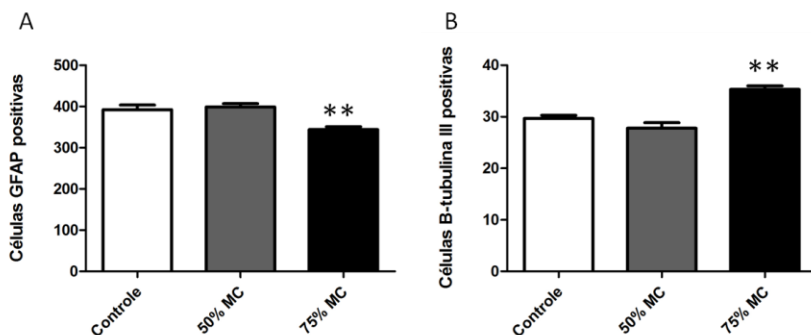


Figura 9 Quantificação da expressão de GFAP e β -tubulina III em astrócitos e neurônios submetidos ao MC de CTMPH. Quanto à marcação de GFAP (Foto A), o grupo controle apresentou média de 392,11 células positivas por poço, o

grupo que recebeu 50% de MC obteve média de 399,03 células GFAP positivas, e os poços que receberam 75% de MC apresentaram 344 células GFAP positivas por poço. Quanto à marcação de β -tubulina III (Foto B), o controle apresentou média de 29,68 células β -tubulina III positivas por poço, e os tratados, 27,8 (50% de MC) e 35,33 (75% de MC). Nas duas marcações (GFAP e β -tubulina III), os tratados que receberam 75% de MC apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo controle, onde ** significa $P < 0,05$.

Estes resultados sugerem que em altas concentrações, o MC de CTMPH promove a proliferação neuronal, e / ou promove a diferenciação de precursores neurais, e também atua na diminuição da proliferação de astrócitos.

4.5 A CO-CULTURA DE CTMPHS SOBRE ASTRÓCITOS DIMINUI A QUANTIDADE DOS MESMOS

Após testarmos os efeitos do MC de CTMPH sobre astrócitos e neurônios, analisamos se os resultados seriam semelhantes quando, ao invés de colocarmos o MC das CTMPHs, colocássemos as mesmas, em modelo de co-cultura.

Antes de serem plaqueadas sobre as células astrocitárias, as CTMPHs, selecionadas devido a aderência ao plástico, apresentavam morfologia fibroblastóide característica, estavam na passagem 3, com 80 a 90% de confluência (Figura 9). As células astrocitárias de córtex de camundongo neonato apresentavam morfologia característica poligonal e confluência de 70% (Figura 10).

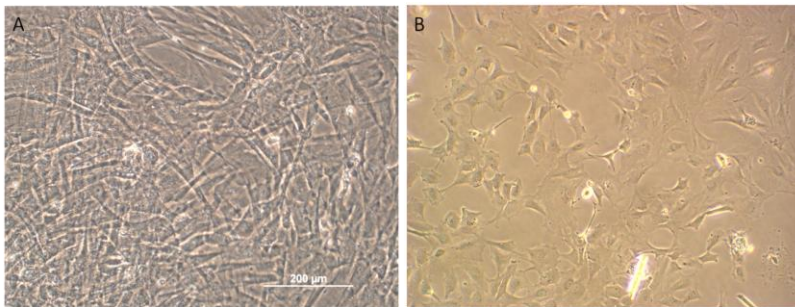


Figura 10 Morfologias celulares de CTMPHs e astrócitos. Antes da co-cultura, as CTMPH (foto A) e as células astrocitárias de camundongos neonatos (foto B) foram analisadas quanto a sua morfologia e a confluência. Nestas fotos

representativas em contraste de fase, as CTMPHs estavam com 90% de confluência, na passagem 3, e as células astrocíticas estavam na passagem 0 com 70% de confluência.

No 11º dia da cultura de astrócitos, foi retirado o SBF para que não houvessem neurônios na cultura, e no 14º dia, as CTMPH foram plaqueadas sobre os astrócitos. No 18º dia as culturas foram fixadas e a imunocitoquímica para GFAP realizada. Como mencionado nos outros experimentos, os poços foram analisados no microscópio de fluorescência e foram tiradas 20 fotos por poço de cada marcação (GFAP e DAPI).

Na análise das imagens dos grupos controle (somente CTMPH em um poço e somente astrócitos no outro), ambos tipos celulares marcaram positivo para GFAP, tendo em vista que nossos anticorpos não eram específicos e marcavam tanto murino quanto células humanas (Figura 11). Quando as células foram contadas e os dados analisados estatisticamente, o grupo de células astrocíticas apresentou maior quantidade de células GFAP positivas (média de 84,55 células) em relação às CTMPH (média de 22,16 células) (Figura 12).

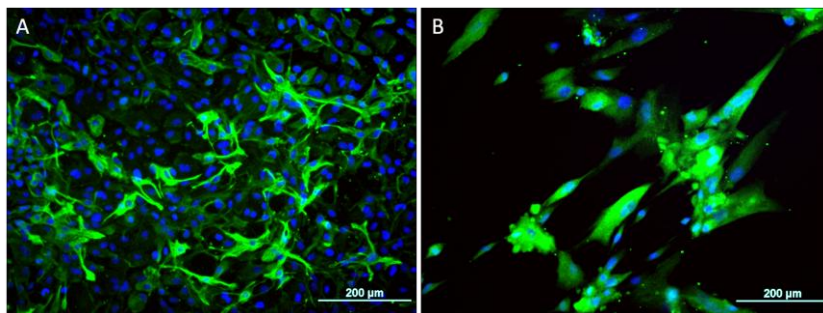


Figura 11 Marcação de GFAP em astrócitos e CTMPHs em cultura. Fotos representativas nas quais temos astrócitos (foto A) e CTMPH (foto B) com os citoplasmas marcados em verde pelo GFAP e os núcleos celulares corados em azul com DAPI. Pelas fotos podemos observar as morfologias celulares e a diferença de tamanho entre os astrócitos e as CTMPHs.

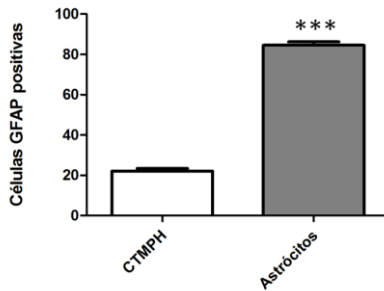


Figura 12 Quantificação de astrócitos e CTMPHs GFAP positivos . Na contagem de células GFAP positivas, obtivemos uma média de 84,55 células GFAP positivas por poço das culturas de astrócitos e média de 22,16 células GFAP positivas por poço nas culturas de CTMPH, como mostra o gráfico acima. Na análise estatística, a comparação entre os dois grupos foi significativa, onde *** significam $P < 0,05$.

Analisando-se os dados da contagem de células GFAP positivas no grupo da co-cultura (CTMPH sobre astrócitos) obtivemos o mesmo resultado que com o experimento anterior do MC: em relação ao grupo controle de células astrocitárias (média de 84,55 células GFAP positivas), a co-cultura apresentou uma menor quantidade de células GFAP positivas (média de 53,8 células por poço). Este resultado foi significativo estatisticamente, reforçando a tese que de alguma forma as CTMPHs influenciam as células astrocitárias, diminuindo sua proliferação (Figuras 13 e 14).

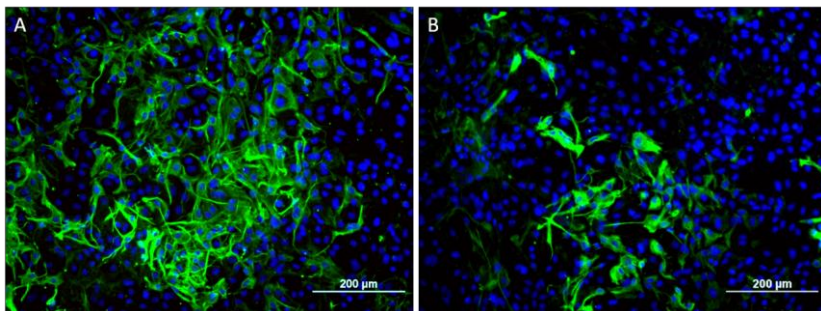


Figura 13 Marcação de GFAP em astrócitos e em astrócitos e CTMPHs em co-cultivo. Fotos representativas da marcação de GFAP (verde) em astrócitos (foto A) e na co-cultura de astrócitos com CTMPHs (foto B). Nas fotos acima é

perceptível a diferença na quantidade de células GFAP positivas entre os grupos.

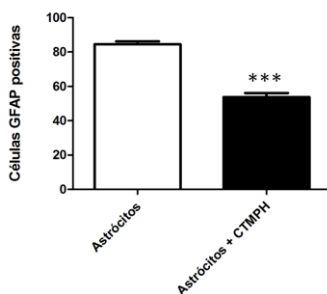


Figura 14 Quantificação da marcação de GFAP em astrócitos e em astrócitos e CTMPH em co-cultura. Na contagem celular, obtivemos média de 84,55 células GFAP positivas no grupo controle dos astrócitos, e no grupo da co-cultura de astrócitos com CTMPHs obteve-se 53,8 células GFAP positivas. Os dados, quando analisados estatisticamente, foram significantes, onde *** significam $P < 0,05$.

Na análise celular do grupo da co-cultura, foi possível diferenciar as CTMPHs dos astrócitos através do tamanho dos núcleos, que mede em média 0,04 mm, enquanto que o núcleo dos astrócitos mede cerca de 0,02 mm, levando-se em conta de que nosso anticorpo não era específico para nenhum dos tipos celulares marcados (Figura 15).

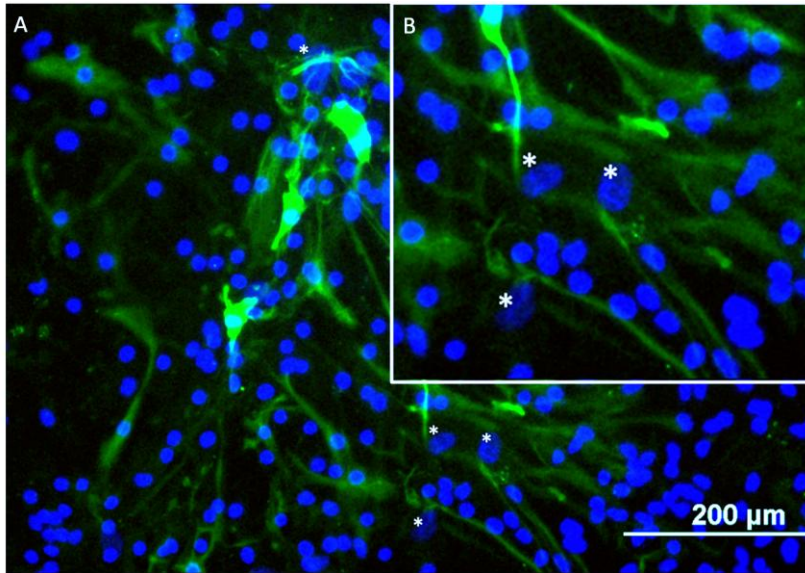


Figura 15 Co-cultura de CTMPHs e astrócitos. Na figura representativa acima podemos ver células GFAP positivas (verde) no grupo da co-cultura de astrócitos e CTMPHs (foto A), onde é possível diferenciar a presença das CTMPHs (*) através do tamanho nuclear, que é maior em relação as células astrocitárias, como podemos ver na figura B, que é um aumento da região em A, mostrando bem os núcleos corados com DAPI (os de CTMPH marcados com *).

4.6 A CO-CULTURA DE CTMPHS SOBRE NEURÔNIOS AUMENTA A QUANTIDADE NEURONAL

Além de analisarmos os efeitos do contato celular de CTMPH com astrócitos, também foi analisado o contato das mesmas com neurônios. Para ter maior quantidade de células neuronais na cultura, a co-cultura com as CTMPHs foi realizada no 2º dia após a realização da cultura de células neuronais de córtex. As CTMPHs apresentavam a mesma morfologia fibroblastóide mencionada anteriormente e estavam na terceira passagem, e os neurônios apresentavam morfologia estrelada / arredondada características. No 4º dia da co-cultura (6º da cultura neuronal) as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e foi feita uma imunocitoquímica para β -tubulina III, com marcação nuclear com

DAPI. O anticorpo utilizado também não era específico para nenhum dos dois tipos celulares, portanto, ambos apresentaram marcação de β -tubulina III (Figura 16).

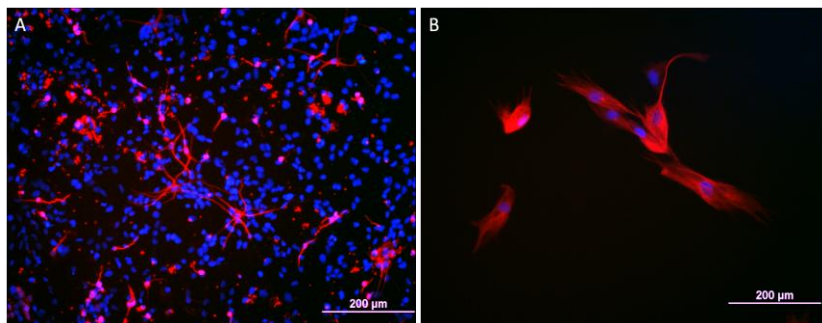


Figura 16 Marcação de β -tubulina III em neurônios e CTMPHs. Analisando as imagens da imunocitoquímica dos grupos controles, tanto o grupo da cultura de neurônios (foto representativa A), quanto o grupo da cultura de CTMPH (foto representativa B) apresentaram células β -tubulina III positivas (vermelho). Morfologicamente, podemos ver que as marcações citoplasmáticas diferiram entre os tipos celulares.

As células β -tubulina III positivas foram quantificadas com o auxílio do programa *Image J*, como mencionado anteriormente nos outros experimentos. Comparando-se os dois grupos controles (poço só com neurônios e poço só com CTMPH), o grupo das células neuronais apresentou maior quantidade de células β -tubulina III positivas (média de 44,36 células por poço, contra 12,53 células β -tubulina III positivas no grupo das CTMPHs), o que foi significativo estatisticamente (Figura 16). Comparando-se os grupos controles com o tratado (poço com a cocultura de CTMPH com neurônios), o grupo da cocultura apresentou maior quantidade de células β -tubulina III positivas (média de 68,65 células por poço), também sendo significativo estatisticamente (Figura 17). Esses resultados corroboram com os anteriores, onde o MC das CTMPHs também promoveu um aumento na quantidade de células neuronais β -tubulina III positivas na cultura de neurônios.

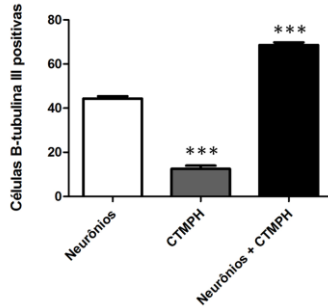


Figura 17 Quantificação da marcação de β -tubulina III em neurônios e CTMPHs. Quantificando-se as células β -tubulina III positivas, obtivemos uma média de 12,53 células marcadas por poço no grupo controle de CTMPH, média de 44,36 células marcadas no grupo controle de neurônios e média de 68,65 células β -tubulina III positivas por poço no grupo da co-cultura de CTMPH com neurônios. Os dados foram analisados estatisticamente, onde *** significam $P < 0,05$.

Assim como ocorreu na co-cultura de CTMPH com astrócitos, neste experimento também foi possível observar a presença da CTMPH na co-cultura através do tamanho nuclear, sendo este de média de 0,06mm, sendo maior que o das células neuronais, que apresentaram média de 0,01 mm de tamanho nuclear. Também foi possível diferenciar os tipos celulares devido à morfologia, uma vez que as CTMPH não apresentaram morfologia neuronal (Figura 18).

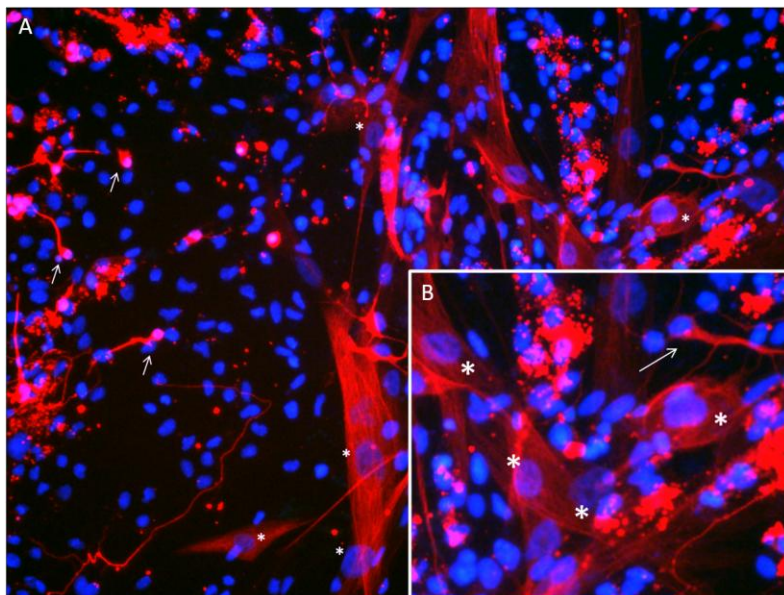


Figura 18 Presença das CTMPH na co-cultura com neurônios. Nesta foto representativa (A) podemos visualizar as CTMPHs (*) na co-cultura com neurônios (setas), visto em detalhes na imagem B. Além das CTMPHs apresentarem o núcleo de tamanho superior ao neuronal, elas mantêm a sua morfologia fibroblastóide, não diferenciando para morfologias neuronais. Em vermelho temos células marcadas com β -tubulina III e em azul os núcleos corados com DAPI. Objetiva de 40X.

4.7 O MC DE CTMPH INFLUENCIA DE MANEIRA POSITIVA A NEURITOGÊNESE EM NEURÔNIOS

Para analisar o efeito do MC de CTMPHs sobre a neuritogênese de células β -tubulina III positivas, quantificamos os neurônios bipolares e medimos o tamanho dos prolongamentos neuronais com auxílio do programa *Image J*. Estas análises foram realizadas em células neuronais que receberam 50% e 75% de MC de CTMPHs, no mesmo protocolo experimental mencionado anteriormente no item 4.4, comparando com o grupo controle que não recebeu MC.

Na quantificação dos neurônios bipolares, os grupos tratados apresentaram maior quantidade dos mesmos (média de 5,16 no grupo

que recebeu 50% de MC e média de 6,17 neurônios bipolares nos tratados com 75% de MC), em relação ao grupo controle (média de 5,02 neurônios bipolares por poço), no entanto, estatisticamente, apenas o grupo que recebeu 75% de MC apresentou diferenças em relação ao grupo controle (Figura 19).

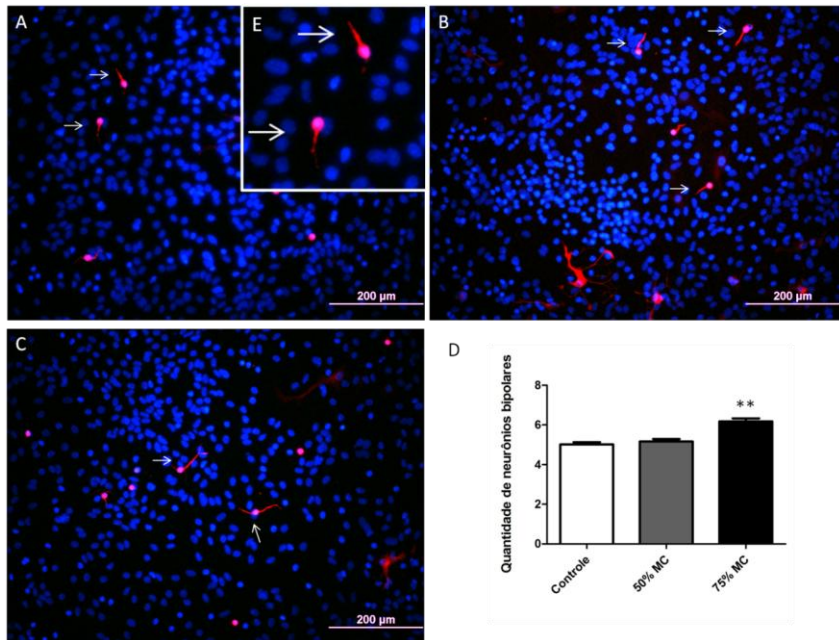


Figura 19 Quantificação dos neurônios bipolares sob influência do MC de CTMPH. Fotos representativas da presença de neurônios bipolares (setas - em detalhe na figura E) nos grupos controle (foto A), tratado com 50% de MC (foto B) e tratado com 75% de MC (foto C). Os neurônios bipolares que foram β -tubulina III positivos (em vermelho) foram quantificados, onde obteve-se média de 5,02 neurônios bipolares por poço do grupo controle, 5,16 neurônios bipolares no grupo que recebeu 50% de MC e média de 6,17 neurônios bipolares nos tratados com 75% de MC de CTMPH, o que foi significativo estatisticamente (figura D), quando comparado ao grupo controle, sendo que ** significam $P < 0,05$. Núcleos corados com DAPI em azul.

Em relação ao tamanho dos prolongamentos neuronais, os grupos tratados com 50% de MC (média de 76,45 mm) e 75% de MC (média de 78,23 mm) apresentaram prolongamentos maiores em

comparação ao grupo controle (média de 70,61 mm), o que foi significativo estatisticamente (Figura 20).

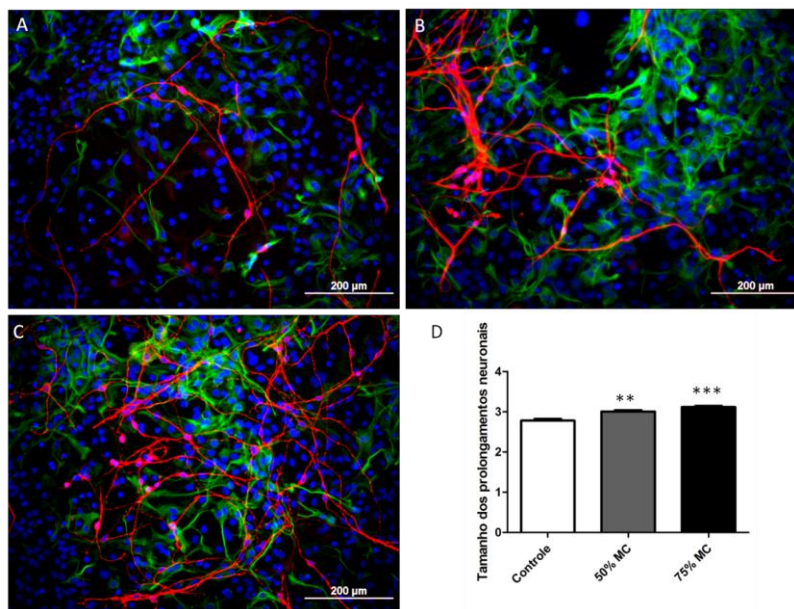


Figura 20 Tamanhos dos prolongamentos neuronais em cultura sob influência de MC de CTMPH. Fotos representativas dos grupos controle (foto A), tratado com 50% de MC (foto B) e tratado com 75% de MC (foto C), onde em vermelho temos neurônios marcados positivamente para β -tubulina III, com seus prolongamentos bem evidentes. Em D temos o gráfico da análise estatística do tamanho dos prolongamentos neuronais, onde o grupo controle apresentou prolongamentos com média de 70,61 mm, o grupo tratado com 50% de MC apresentou média de 76,45 mm e o grupo tratado com 75% de MC apresentou prolongamentos com média de 78,23 mm. Em relação ao grupo controle, ambos tratados apresentaram prolongamentos com tamanho superior, o que foi significativo estatisticamente, representado por ** e *** com $P < 0,05$. Em verde astrócitos marcados com GFAP e azul os núcleos corados com DAPI.

Juntos, estes resultados indicam que o MC de CTMPH influencia na proliferação de novos neurônios, assim como no crescimento dos prolongamentos neuronais, favorecendo a realização de novas conexões entre as células.

4.8 EFEITOS POSITIVOS SOBRE A NEURITOGÊNESE DE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA COM CTMPH

Para analisar os efeitos da co-cultura de CTMPHs sobre a neuritogênese em células neuronais também quantificamos os neurônios bipolares e medimos o tamanho dos prolongamentos neurais. O protocolo experimental foi mencionado anteriormente no item 4.7.

Com relação à quantidade de neurônios bipolares, o grupo da co-cultura não apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao controle (poço com células neurais) (Figura 21), contrariando os resultados obtidos com o MC das CTMPHs. Como as CTMPHs não apresentaram morfologia neuronal elas não foram analisadas.

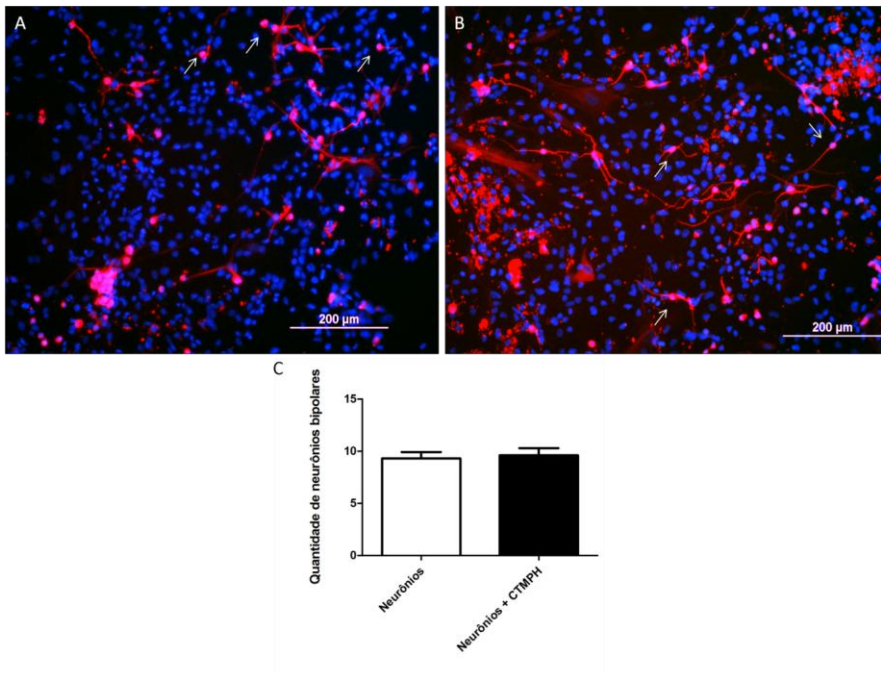


Figura 21 Neurônios bipolares em culturas neuronais. Fotos representativas da presença de neurônios bipolares em vermelho (setas) nos grupos controle (foto A) e no grupo da co-cultura de neurônios com a CTMPH (foto B). Os dados da quantificação dos neurônios bipolares foram analisados estatisticamente e não obteve-se diferença entre os grupos. O grupo controle apresentou média de 9,30 neurônios bipolares por poço, enquanto que o grupo da co-cultura de neurônios

+ CTMPH apresentou média de 9,61 neurônios bipolares por poço. Núcleos corados em azul com DAPI e citoplasmas em vermelho com β -tubulina III.

Em relação ao tamanho dos prolongamentos neuronais, os neurônios do grupo da co-cultura com CTMPH apresentaram prolongamentos maiores em relação ao controle, o que foi significativo estatisticamente (Figura 22).

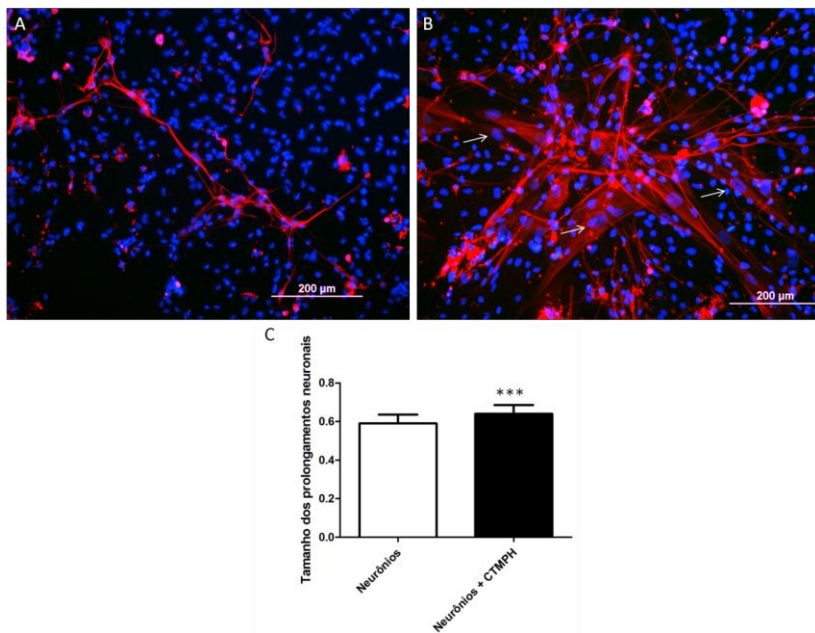


Figura 22 Tamanho dos prolongamentos neuronais de neurônios em co-cultura com CTMPH. Fotos representativas do grupo controle (foto A) e da co-cultura de CTMPH sobre neurônios (foto B) onde podemos ver os prolongamentos neuronais marcados em vermelho (β -tubulina III) e também a presença de inúmeras CTMPH na co-cultura (setas), logo abaixo dos prolongamentos neuronais. Os prolongamentos foram medidos e os dados analisados estatisticamente. O grupo controle apresentou prolongamentos medindo média 14,98 μ m, enquanto que os prolongamentos neuronais do grupo da co-cultura foram maiores, medindo uma média de 15,24 μ m (figura C), o que foi significativo estatisticamente, onde *** significam $P < 0,05$. Núcleos corados em azul com DAPI.

Estes resultados comprovam que, tanto o MC das CTMPHs, quanto a sua co-cultura com neurônios, tem efeitos benéficos sobre a proliferação neural e não exercem nenhum tipo de citotoxicidade.

5. DISCUSSÃO

O AVC isquêmico é caracterizado por uma série de mudanças patológicas que reduzem o oxigênio e os suprimentos de glicose celulares, resultando em mortes por necrose ou apoptose. O rompimento dos canais iônicos neuronais produz a imediata liberação de glutamato excitatório (Mattson *et al.*, 2000), levando a um imenso influxo de cálcio através de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e dos canais voltagem-dependentes de cálcio. Esses processos, juntamente com tantos outros que ocorrem durante a isquemia, acabam retardando os mecanismos de produção energética (Abdelkarim *et al.*, 2001).

A rápida restauração do fluxo sanguíneo é importante para salvar a maior quantidade de tecido cerebral possível. Apesar disso, a reperfusão sanguínea também é um componente do dano tecidual, pois o sangue carrega um conjunto de leucócitos atraídos por agentes quimiotáticos, como interleucinas (IL-8) e proteína quimiotática de monócitos - 1 (MCP-1). Estes leucócitos extravasam no parênquima cerebral da região isquêmica e liberam espécies reativas de oxigênio, metaloproteinases da matriz (MMPs) e outros mediadores inflamatórios. A liberação destes componentes altamente reativos é designada para atacar patógenos, e a presença deles em excesso durante uma resposta imune estéril destrói o tecido, aumentando o dano tecidual (Del Zoppo *et al.*, 2000; Serhan, 2007; Spite & Serhan, 2010).

Ao longo das próximas semanas após a lesão, as células necrosadas são retiradas e a cicatriz tecidual se forma. A região do peri-infarto no córtex parece fornecer um recesso neurovascular, onde novos neurônios são estimulados a crescer (Arvidsson *et al.*, 2002). A neurogênese endógena é estimulada em locais como a zona subventricular, o bulbo olfatório e o hipocampo, onde vários estudos indicam haver a presença de células tronco neurais (Miller, 2006). No entanto, não há evidências de que a neurogênese ocorrendo nesta etapa proporcione melhoras funcionais; muitos neurônios no recesso neurovascular morrem ou permanecem indiferenciados (Smith & Gavins, 2012).

Está bem descrito na literatura, que, em condições normais, os astrócitos devem manter a homeostase no SNC, dando suporte para a sobrevivência neuronal e à sua função de processamento da informação. Os astrócitos, também conhecidos como astrogliia, são as células mais abundantes no SNC e são classicamente identificados como as células

que expressam GFAP, como demonstraram nos nossos resultados. Quando ocorrem lesões no SNC, como o AVC, os astrócitos se tornam ativados, pois eles agem como células do sistema imune, e modulam uma grande quantidade de moléculas, visando beneficiar a região lesionada, regulando diversos processos biológicos (Zhang *et al.*, 2010).

Os astrócitos (ativados ou reativos) fornecem suporte e orientação para o crescimento axonal e ajudam na recuperação da melhora funcional após o AVC (Privat, 2003). No entanto, a prolongada ativação dos astrócitos se torna prejudicial ao crescimento axonal, pois eles podem produzir citocinas pró-inflamatórias e citotóxicas, que são prejudiciais aos neurônios ou oligodendrócitos, no cérebro lesionado (Zhang *et al.*, 2010). Alguns experimentos tem demonstrado a expressão de moléculas como óxido nítrico sintase, capaz de danificar células neurais, oligodendrócitos e outros tipos celulares, e TNF- α conhecido por desempenhar um papel importante no início do processo inflamatório, por astrócitos reativos após lesões cerebrais ou em casos de desordens neurológicas (Estévez *et al.*, 1998, Bezzi *et al.*, 2001).

Portanto, cada vez mais os pesquisadores têm estudado meios de impedir esta ativação dos astrócitos, também denominada de gliose reativa, pois estudos demonstram que quando a gliose reativa é farmacologicamente inibida *in vivo*, a produção de citocinas é reduzida e o dano neuronal atenuado (Chauhan *et al.*, 2008). Uma outra boa alternativa para a redução da gliose reativa seriam as CTMPHs.

Atualmente tem sido proposto que células das membranas fetais possuem propriedades imunoregulatórias, assim como as células tronco mesenquimais oriundas de outras fontes teciduais. Análises *in vitro* mostram que células isoladas da membrana coriônica e amniótica da placenta tem o potencial de suprimir ativamente a proliferação de linfócitos (Bailo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Wolbank *et al.*, 2007). Vários estudos foram feitos a fim de pesquisar o efeito dessas células em desordens neuronais, um exemplo seria o transplante de células amnióticas epiteliais em áreas lesionadas em um modelo de lesão de medula espinhal em ratos. O transplante foi feito sem a administração de imunossupressores, e as células sobreviveram mais de 120 dias e não houve evidências de inflamação ou rejeição (Parolini *et al.*, 2008).

Estes dados confirmam os nossos: tanto nos modelos da cultura da CTMPH com os astrócitos, quanto os experimentos do MC das CTMPHs sobre astrócitos, a proliferação dos mesmos foi diminuída, mostrando o efeito imunossupressor das CTMPHs derivadas do córion sobre estas células do sistema imune do SNC. O MC das CTMPHs

também não apresentou efeitos citotóxicos, uma vez que nosso ensaio de Sytox não mostrou células mortas e a análise com MTT não mostrou resultados significantes estatisticamente entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de MC.

Estes resultados juntos mostram um uso promissor das CTMPHs em terapias celulares para o AVC, ou outras doenças neurodegenerativas. Entretanto, além de inibir o crescimento astrocitário, também se faz necessário o aumento da proliferação neuronal, afim de promover uma melhora funcional da lesão, o que nossos experimentos também demonstraram.

Experimentalmente, tanto a co-cultura de CTMPH com neurônios, quanto o uso de seu MC em altas concentrações (50% e 75%) promoveram um aumento significativo na quantidade neuronal em relação aos grupos controles. Pesquisas demonstram que CTM, quando implantadas em casos de injúria cerebral traumática, expressam marcadores de neurônios e astrócitos, causando uma melhora na função neurológica (Lu *et al.*, 2001), e também secretam várias citocinas e fatores de crescimento, como BDNF, VEGF, e FGF, que promovem o crescimento neuronal endógeno, neurogênese e angiogênese, estimulam as conexões sinápticas, e regulam a inflamação primeiramente através de ações parácrinas (Chopp & Li, 2002; Seo & Cho, 2012).

Em relação ao MC das CTMs, estudos sugerem que os componentes da matriz celular derivados destas células podem aumentar o reparo do sistema nervoso (Maltman *et al.*, 2011). A fibronectina, componente da matriz extracelular, visivelmente realiza papéis essenciais na sobrevivência neuronal, brotamentos axonais e sinaptogênese após a isquemia cerebral (Sakai *et al.*, 2001). Além disso, moléculas da matriz extracelular e moléculas de adesão celular liberadas pelas CTMs, como integrinas, caderinas e selectinas, promovem crescimento axonal e regeneração (Neuhuber, et al., 2005; Giger *et al.*, 2010).

Além disso, uma pesquisa mostra que a comunicação entre as CTMs e os astrócitos e neurônios é realizada através da liberação de exossomas contendo miRNA. Este miRNA é o miR-133b, conhecido por promover melhora funcional cerebral em casos de doença de Parkinson (Kim *et al.*, 2007) e lesões na medula espinhal (Yu *et al.*, 2011), e sua liberação para os neurônios e astrócitos aumenta o crescimento do neuritis (Xin *et al.*, 2012).

Os dados acima corroboram com nossos resultados. Houve um aumento no número de neurônios bipolares, quando colocamos 75% de MC de CTMPH em cultura de astrócitos e neurônios. Estes neurônios

são células novas e imaturas, cujos prolongamentos estão crescendo, a fim de estabelecer contato com as outras células cerebrais. Além disso, nos grupos que receberam concentrações de 50% e 75% de MC, nas culturas de astrócitos e neurônios, e também na co-cultura da CTMPH com neurônios, obtivemos prolongamentos neuronais maiores nos grupos tratados em relação aos controles, comprovando que, além de CTMs terem esse importante papel indutor da neurogênese, as CTM que são derivadas do córion da placenta humana, também atuam neste sentido.

Em relação a não obtermos diferenciação para fenótipos neurais das CTMPHs quando em co-cultura, ao contrário de outros autores que obtiveram utilizando o mesmo tipo celular (Martini *et al.*, 2013), se deve ao fato de que as CT, quando transplantadas em lesões cerebrais, exercem um "efeito de observadoras", ou seja, ajudam na melhora tecidual, sem a direta substituição dos neurônios que foram perdidos. Estas células "observadoras" secretam substâncias afim de realizar funções neuroprotetoras, incluindo suporte neurotrófico, imunomodulação e angiogênese (Smith & Gavins, 2012), o que foi repetidamente discutido nesta dissertação.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto nossos resultados mostram que as CTMPHs derivadas do córion têm total capacidade de, *in vitro*, através de seu meio condicionado e da co-cultura com astrócitos e neurônios, inibir a proliferação de astrócitos, aumentar a proliferação neuronal e o tamanho dos prolongamentos neuronais, o que auxilia no estabelecimento de novas redes neuronais. Portanto, o próximo passo seria o estudo *in vivo* destas células em modelos de lesões de AVC isquêmico em camundongos.

REFERÊNCIAS

ABDELKARIM, G. E., GERTZ, K., HARMS, C., KATCHANOV, J., DIRNAGL, U., SZABO, C., AND ENDRES, M. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. **Int. J. Mol. Med.** 7, 255–260, 2001.

ALVAREZ-SILVA, M., BELO-DIABANGOUAYA, P., SALAÜN, J., DIETERLEN-LIÈVRE, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development.**, 130 (22), 5437-5444, 2003.

ARSENE, D., VASILESCU, F., TOADER, C., BALAN, A., POPA, C., ARDELEANU, C. Clinico-pathological correlations in fatal ischemic stroke. An immunohistochemical study of human brain penumbra. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, 52(1):29-38, 2011.

ARVIDSSON, A., COLLIN, T., KIRIK, D., KOKAIA, Z., and LINDVALL, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat. Med.** 8, 963–970, 2002.

ASTRUP, J., SIESJO, B.K., SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. **Stroke**,12;723-725, 1981.

BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials.**;28(25):3587–93, 2007.

BAILO, M., SONCINI, M., VERTUA, E., et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. **Transplantation**, 78:1439 –1448, 2004.

BANAS, R. A, TRUMPOWER, C., BENTLEJEWSKI, C. et al. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. **Hum Immunol**; 69:321–328, 2008.

BARLOW, S., BROOKE, G., CHATTERJEE, K. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev**; 17:1095–1107, 2008.

BEZZI, P., DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. **Nat Neurosci.**, 4:702–710, 2001.

CHAUHAN, V. S., STERKA, D. G. JR, GRAY, D. L., et al. Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. **J. Immunol.**, 180:8241–8249, 2008.

CHEN, S., LEWALLEN, M., XIE, T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. **Development**, 140, 255-265, 2013.

CHOPP, M., LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol**; 1(2):92–100, 2002.

DEL ZOPPO G., GINIS I., HALLENBECK J., IADECOLA C., WANG X., FEUERSTEIN G.Z. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathol.**, 10: 95-112, 2000.

ESTEVEZ, A. G., SPEAR, N., MANUEL, S. M., et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. **J Neurosci.**, 18:923–931, 1998.

FUKUCHI, Y., HIDEAKI, N., DAISUKE, S., IMIKO, H., TOSHIO, K., KOHICHIRO, T. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. **Stem Cells**, 22: 649–658, 2004.

GE, W. P., MIYAWAKI, A., GAGE, F. H., JAN, Y. N., AND JAN, L. Y. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. **Nature**, 484, 376–380, 2012.

GIGER, R. J., HOLLIS, E. R. 2nd, TUSZYNSKI, M. H. Guidance molecules in axon regeneration. **Cold Spring Harb Perspect Biol**; 2: a001867, 2010.

GINSBERG, M.D. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis lecture. **Stroke**, 34: 214 –223, 2003.

GÖTZ, M, SOMMER, L. Cortical development: the art of generating cell diversity. Meeting review. **Development**, 132 (15), 2005.

KADAM, S., SUDHAKAR, M., PRABHA, N., RAMESH, B. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells and Islet-Like Cell Clusters Generated From These Cells as Novel Sources for Stem Cell Therapy in Diabetes. **The Review of Diabetic Studies**, Vol. 7, No. 2, 2010.

KILPATRICK, D. L., WANG, W., GRONOSTAJSKI, R., LITWACK, E. D. Nuclear factor I and cerebellar granule neuron development: An intrinsic - extrinsic interplay. **Cerebellum**, 11(1): 41–49. doi:10.1007/s12311-010-0227-0, 2012.

KIM, J., INOUE, K., ISHII, J., et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. **Science**.; 317:1220–1224, 2007.

KRIEGSTEIN, A., ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Rev. Neuroscience**, 32, 149-184, 2009.

KOIZUMI, N. J., INATOMI, T. J., SOTOZONO, C. J. et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. **Curr. Eye Res.**; 20:173–177, 2000.

KRANZ, A., DANIEL-CHRISTOPH, W., MANJA, K., MARKUS, S., UWE, R. S., NITZSCHE, F., ABERMAN, Z., EMMRICH, F., RIEGELSBERGER, U.M., BOLTZE, J. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats. **Brain Research**, 1315, 128 – 136, 2010.

LI, H., NIEDERKORN, J. Y., NEELAM, S., et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 46:900 –907, 2005.

LIU, Y. P., LANG, B. T., BASKAYA, M.K., DEMPSEY, R.J., VEMUGANTIET, R. The potential of neural stem cells to repair stroke-induced brain damage. **Acta Neuropathol**. DOI 10.1007/s00401-009-0516-1, 2009 a.

LU, D., LI, Y., WANG, L., CHEN, J., et al. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, 18(8):813–819, 2001.

MALTMAN, D. J., HARDY, S. A., PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochem Int.**, 59:347-56, 2011.

MANNELLO, F., TONTI, G. A. Concise Review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or Ad Hoc formula? All that glitters is not gold! **Stem Cells**, 25:1603–1609, 2007.

MARTINI, M. M., JEREMIAS, T. da S., KOHLER, M. C. et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells acquire neural phenotype under the appropriate niche conditions. **DNA and Cell Biology**, 32(2) : 58-65, 2013.

MATTSON, M. P., CULMSEE, C., AND YU, Z. F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. **Cell Tissue Res.** 301, 173–187, 2000.

MAXSON, S., LOPEZ, E. A., YOO, D., DANILOKOVITCH-MIAGKOVA, A. Concise review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem Cells Translational Medicine**, 1:142-149, 2012.

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

Ministério Da Saúde. Saúde lança consulta pública para o aprimoramento da assistência a pacientes com AVC. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticiasdefault.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11825>. Acesso em setembro de 2013.

NEUHUBER, B., TIMOTHY, HIMES B., SHUMSKY, J.S., et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. **Brain Res.**, 1035: 73–85, 2005.

PACIARONI, M., CASO, V., AGNELLI, G. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. **European Neurology**, 61 : 321–330, 2009.

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**, 26: 300 - 311, 2008.

PRIVAT, A. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. **Glia**, 43:91–93, 2003.

RAPOPORT, J.L., GOGTAY N. Brain neuroplasticity in healthy, hyperactive and psychotic children: insights from neuroimaging. **Neuropsychopharmacol Rev**;33:181-97, 2008.

SAKAI, T., JOHNSON, K. J., MUROZONO, M., et al. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. **Nat Med**;7:324-30, 2001.

SEO, J. H., CHO, S.-R. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: Potential therapeutic mechanisms for clinical trials. **Yonsei Med J.**, 53(6): 1059-1067, 2012.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol.** 25, 101–137, 2007.

SMITH, H. K., GAVINS, F. N. E. The potential of stem cell therapy for stroke: is PISCES the sign? **The FASEB Journal**, 11-195719, 2012.

SPITE, M., AND SERHAN, C. N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. **Circ Res** 107, 1170–1184, 2010.

SPRADLING A., DRUMMOND-BARBOSA D., KAI T. Stem cells find their niche. **Nature**, 414, 98–104, 2001.

TORTORA, G.J., GRABOWSKI, S.R. *Corpo humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia. Artmed, Porto Alegre, 6ª Ed., 718 p., 2006.*

WANG, Y., CHANG, C.F., MORALES, M., CHIANG, Y.H., HOFFER, J. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 962:423-37, 2002.

WOLBANK, S., PETERBAUER, A., FAHRNER, M., et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: A comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng*, 13:1173–1183, 2007.

XIN, H., LI, Y., BULLER, B. et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, 30(7): 1556-1564, 2012.

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., CHENA, Y-C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, 23:3–9, 2005.

YU, Y. M., GIBBS, K. M., DAVILA, J., et al. MicroRNA miR-133b is essential for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish. *Eur. J. Neurosci.*; 33:1587–1597, 2011.

ZHANG, D., HU, X., QIAN, L., O'CALLAGHAN, J. P., et al. Astrogliosis in CNS pathologies: Is there a role for microglia? *Mol. Neurobiol.*, 41 (0): 232-241, 2010.

ZHANG, J., YU, Z., YU, Z., YANG, Z., ZHAO, H., LIU, L., ZHAO, J. rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 4(5): 496-504, 2011.