UNICAMP

THIAGO BORSOI RIBEIRO

XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO EM MODELO DE LESÃO DE RAIZES VENTRAIS DA MEDULA ESPINAL DE RATO

CAMPINAS

2013

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THIAGO BORSOI RIBEIRO

"XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO EM MODELO DE LESÃO DE RAIZES VENTRAIS DA MEDULA ESPINAL DE RATO"

Orientadora: Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE Á VERSAO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO THIAGO BORSOI RIBEIRO E ORIENTADO PELA PROFA.DRA. SARA T. OLALLA SAAD

Assinatura do Orientador

_____

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R354x

Ribeiro, Thiago Borsoi, 1980-
Xenotransplante de células mesenquimais de tecido adiposo humano em modelo de lesão de raízes ventrais da medula espinal de rato / Thiago Borsoi Ribeiro. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células-tronco. 2. Transplante heterólogo. 3. Nervos espinhais. 4. Neuroglia. 5. Neuroimunomodulação. I. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Xenotransplantation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in a rat model of ventral root lesions of the spinal cord.
Palavras-chave em inglês:
Stem cells
Transplantation, Heterologous
Spinal nerves
Neuroglia
Neuroimmunomodulation
Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento
Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Banca examinadora:
Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]
Patrícia Maria Bergamo Favaro
Fabíola Traina
Guido Lenz
Mari Cleide Sogayar
Data da defesa: 21-02-2013
Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

THIAGO BORSOI RIBEIRO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

1. **PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD** _____
2. **PROF(A). DR(A). PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO** _____
3. **PROF(A). DR(A). FABÍOLA TRAINA** _____
4. **PROF(A).DR(A). GUIDO LENZ** _____
5. **PROF(A).DR(A). MARI CLEIDE SOGAYAR** _____

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 21 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente à minha mulher Marcela, à minha mãe Matildes, ao meu pai Raul, às minhas irmãs Marisa e Mariana, aos sogros Fausto e Claudia, aos meus cunhados Tiago, Fabio, Laura e Munir, à minha sobrinha Cecília e aos meus sobrinhos João, Francisco, André e Pedro pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão e amor. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

À minha orientadora Dra. Prof Sara Teresinha Olalla Saad, por sua orientação na realização deste trabalho. Agradeço a sua compreensão, confiança, as oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado; um exemplo de pessoa, médica e orientadora. A finalização deste trabalho é fruto de sua orientação e uma conquista nossa.

À. Dra. Ângela Luzo, pela sua ajuda desde o projeto de iniciação científica até meu mestrado, pela co-orientação neste trabalho, pela disponibilidade e apoio em seu laboratório. Agradeço as oportunidades oferecidas e por fazer parte da minha formação.

À minha amiga Adriana Santos, que teve grande participação na minha formação, pela constante presença e incentivo durante a realização deste trabalho. Agradeço a seus ensinamentos e acima de tudo, agradeço à sua amizade.

Aos alunos e a equipe de trabalho da Dra. Sara que me auxiliaram em diferentes momentos durante a realização deste trabalho. Agradeço à Tereza Sueko, que sempre me incentivou e me guiou, desde a minha iniciação científica na resolução dos mistérios de cada experimento. A todos os alunos; Pedro, Marilisa, Shankar, Audrey Juliana Xavier, Mariana Lazarini, Victor Maso, Mariana Baratti, Daniela Crosara, Patricia Favaro, Fabióla Traina, Patrícia Rodrigues, Carolina Bigarella, Matheus Lopes, Joao Agostinho, João Kleber, Gisele, Rita, Flavia, Fernanda Nieman, Fernada Roversi, Vanessa, Bruna Palodetto, Paulo, Anamika, Karen, Leticia, Aline e todos os funcionários, Ana Leda, Simone, Lena, Fernanda, Irene, Luís Gustavo, Dilmara, Janine e Karla, agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências e o carinho. Muito obrigado pela amizade e a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e pessoais.

Ao Prof. Dr. Alexandre de Oliveira, pela oportunidade de aprendizado e pela disponibilidade de seu tempo e do laboratório (Laboratório de Regeneração Nervosa – IB - Unicamp) onde foi realizado todo o procedimento cirúrgico dos animais e imunofluorescência das lâminas deste estudo e a toda sua equipe, principalmente Gleidy e Aline, pelo auxilio nos experimentos. Dra Rafaela, pela disponibilidade e ajuda nos experimentos.

A Profa. Dra. Leonilda do Santos, ao Dr. Alessandro Farias e ao aluno de mestrado Fernando por todo auxilio nos experimentos e auxílios.

Aos docentes e funcionários do Hemocentro da UNICAMP, pelo apoio e estrutura na realização deste trabalho.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado e nem realizado.

Às secretárias Patrícia e Raquel pela disponibilidade no serviço burocrático e amizade.

À secretaria da pós-graduação pela disponibilidade no serviço burocrático.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

Resumo

A avulsão de raízes motoras, na interface do sistema nervoso central e periférico, já bem descrito na literatura, promove uma significativa perda sináptica com degeneração de cerca de 80% dos motoneurônios afetados. Não existem estratégias eficazes que propiciem uma reversão ou amenização deste quadro, mas alguns estudos já mostram que o passo fundamental é preservar os motoneurônios afetados.

Pesquisas em diferentes áreas com células-tronco (CT) adultas estão sendo realizadas nos últimos anos e apresentam resultados promissores para a medicina regenerativa. Investigações recentes têm apontado para diferentes fontes de CT em tecidos adultos tais como de medula óssea, de sangue de cordão umbilical, tecido muscular, tecido nervoso, líquido amniótico entre outras. De modo geral, estas células apresentam como características principais a capacidade de proliferação e a diferenciação para outros tipos celulares. Entretanto, os principais problemas para o uso clínico das CT adultas são: i) pequena quantidade de células multipotentes, ii) o controle da diferenciação, iii) insuficiência no número de células viáveis e iiii) difícil obtenção. Como alternativa às dificuldades anteriormente citadas, o tecido adiposo tem sido foco de intensos estudos, pois este tecido possui rica fonte de células pluripotentes, além de apresentarem características positivas como fácil acesso ao tecido adiposo subcutâneo, obtenção em quantidade abundante e processo de isolamento celular relativamente simples. Apesar deste tecido apresentar organização complexa, é na fração celular do estroma vascular que se encontra uma rica população de células pluripotentes. Dados de literatura demonstram que as células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AT-MSC – Células mesenquimais de tecido adiposo), mediante incubação com meios de cultura variados, diferenciam-se em adipócitos, osteócitos, mioblastos, hepatócitos, células vasculares entre outras. A diferenciação de AT-MSC em células neuronais ainda é alvo de discussões e críticas na literatura, pois não há protocolos estabelecidos que induzam a diferenciação em células neuronais funcionais absolutas. Ainda, recentes estudos atribuem um potencial neuroprotetor e uma capacidade imunomodulatória à produção de fatores neurotróficos e a produção de fatores solúveis pelas AT-MSCs, constituindo talvez o principal mecanismo de ação destas células in vivo.

O xenotransplante também é alvo de criticas de diversos trabalhos. Células humanas em modelo animal têm sido usadas constantemente em diversos trabalhos e o uso ou não de imunossupressores é um dos motivos de questionamento dos resultados, uma vez que sistemas imunológicos diferentes podem causar reações imunológicas não pretendidas nos estudos e, consequentemente, os resultados não seriam confiáveis. Entretanto, artigos de revisões

bibliográficas demonstram que diversos estudos envolvendo células-tronco mesenquimais e modelos animais têm resultados promissores e corroboram entre si.

Com objetivo de investigar a ação de células-troncos de tecido adiposo de lipoaspirado humano em modelo animal, o presente trabalho propôs analisar a capacidade de sobrevivência das AT-MSCs humanas no modelo de avulsão da raiz ventral de ratos, bem como sua capacidade de neuroproteção dos motoneurônios lesionados e sua competência de imunossupressão no período de 2 semanas pós lesão (período agudo). Análise da dinâmica das sinapses, da reação astroglial e microglial e da reação de linfócitos T tiveram o objetivo de identificar condições que promovessem a sobrevivência e regeneração dos motoneurônios axotomizados assim como a capacidade de atuação das células humanas em ratos. Deste modo, foi observado que o tratamento com as AT-MSC humanas tiveram efeito neuroprotetor, uma vez que houve aumento significativo de sobrevivência neuronal e promoveram a estabilidade sináptica. As células humanas também tiveram ação imunomodulatória, reduzindo a astrogliose reativa e ativação microglial, bem como inibiu a atividade de linfócitos T. Pode-se dizer que no modelo a ação das células-tronco mesenquimais humanas ocorre semelhante ao de transplantes alogênicos em modelos animais.

Abstract

It is well described in the literature that avulsion motor at the interface of the central and peripheral nervous system, promotes a significant loss of synaptic degeneration and 80% of motor neurons death. There is no effective strategies that favor a reversal or mitigation of this framework, but some studies have shown that the key step is to preserve motor neurons affected.

Researches in different areas with stem cell (CT) adults are being undertaken in recent years and show promising results for regenerative medicine. Recent investigations have pointed to different sources of CT in adult tissues such as bone marrow, umbilical cord blood, brain, muscle tissue, amniotic fluid, among others. Generally, these cells have as main characteristics capacity for proliferation and differentiation to other cell types. However, the main problems for the clinical use of adult SC are: i) small amount of multipotent cells, ii) differentiation control, iii) low number of viable cells and iiii) difficulty to obtain. As an alternative to the difficulties mentioned above, adipose tissue has been the focus of intense study, because this tissue has a rich source of stem cells, in addition to having positive characteristics such as easy access to subcutaneous adipose tissue, obtained in abundant quantities and isolation process relatively simple. Despite the complex tissue organization, the stromal vascular fraction is rich of pluripotent population cells. Literature data show that stromal cells derived from adipose tissue (AT-MSC-adipose tissue mesenchymal stem cells) can differentiate by incubation with various culture media into adipocytes, osteocytes, myoblasts, hepatocytes, vascular cells, among others. The AT-MSC differentiation into neuronal cells is still subject of discussion and criticism in literature, since no established protocol has induced differentiation into function neuronal cells. Still, many studies attribute a potential neuroprotective and immunomodulatory capacity for the production´s AT-MSC of neurotrophic factors and the soluble factors, constituting perhaps the main mechanism of action of these cells in vivo.

Xenotransplantation is the target of criticism of many studies. Human cells constantly used in animal models have been used in several works and the use of immunosuppressants or not is subject to questioning of the results, since different immune systems can cause unwanted immune reactions in studies and, consequently, the results would not be reliable. Literature reviews show that several studies involving mesenchymal stem cells and animal models have shown promising results and corroborate each other.

To investigate the action of stem cells from human adipose tissue lipoaspirate animal model, this study proposes to analyse the survivability of the human AT-MSC in ventral root avulsion model in rats as well as its ability to neuroprotection in moto neurons and their competence in the period of immunosuppression 2 weeks post injury (acute period). To identify conditions that promote the survival and regeneration of axotomized motoneurons as well as the capacity for action of human cells in mice, synapses dynamic analysis, astroglial and microglial reaction and reaction of T lymphocytes was examined. Thus, it was observed that treatment with AT-MSC had neuroprotective effect, since there was a significant increase in neuronal survival and the AT-MSC human promoted synaptic stability. Human cells also have immunomodulatory action, reducing reactive astrogliosis and microglial activation and inhibited the activity of T lymphocytes. It is possible that the model action of human mesenchymal stem cells is similar to that of allogeneic.

Lista de Abreviaturas

AT-MSC	Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BM-MSC	Bone Marrow mesechymal stem cell
CT	Células-Tronco
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor
GMP	Good Manufacturing Pratice
HLA	antígenos de histocompatibilidade
HGF	Hepatic Growth Factor
HSC	hematopoietic stem cell
IDO	Indoleamine 2,3- Dioxygenase
IL10	Interleukin 10
MBP	myelin basic protein
MSC	mesechymal stem cell
Qdot 655	Qtracker nanocristais faixa 655
SCU	Sangue de Cordão Umbilical
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
APC	células apresentadoras de antígenos
SVF	stromal-vascular cell fraction
SVZ	zona subventricular
TGFb	transforming growth factor beta1

Lista de Esquema

ESQUEMA 1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSO.....51

Lista de Tabela

TABELA 1. MEIOS E SUPLEMENTOS PARA INDUÇÃO DE ADIPOGÊNESE, OSTEOGÊNESE E CONDROGÊNESE....52
TABELA 2. SEQUÊNCIA DE INICIADORES DESENHADOS PARA AVALIAÇÃO DOS FATORES E CITOCINAS LIBERADOS PELAS AT-MSC. 56

Lista de Figura

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO[2]....25
FIGURA 2. AÇÃO IMUNOSSUPRESSORA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MEDIADAS PELO CONTATO CÉLULA-CELULA E POR FATORES SOLÚVEIS[114]. 31
FIGURA 3. AÇÃO DE FATORES SOLÚVEIS IMUNO-REGULATÓRIOS SECRETADOS PELAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS [118] 32
FIGURA 4. PRINCIPAIS FATORES DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS....32
FIGURA 5. ILUSTRAÇÃO DAS MARCAÇÕES POR SPIO(A) E QTRACKER(B) REALIZADA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR DO HEMOCENTRO- UNICAMP 34
FIGURA 6. DISPOSIÇÃO DO MOTONEURÔNIO E CÉLULAS DA GLÍA, ASTRÓCITO E OLIGODENDRÓCITO[147]..35
FIGURA 7. ORGANIZAÇÃO ESPACIAL DOS MOTONEURÔNIOS EM SECÇÃO TRANSVERSAL DA MEDULA NERVOSA ESPINAL[148]....36
FIGURA 8. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DO MODELO ANIMAL (RATO) DE AVULSÃO DE RAÍZES MOTORAS DA MEDULA ESPINAL. FOTO OBTIDA DO ARTIGO DO GRUPO COLABORADOR[159]....37
FIGURA 9. ESTRUTURAS DO MOTONEURÔNIO E LESÃO PROXIMAL. 39
FIGURA 10. AÇÃO DE FATORES NEUROTRÓFICOS SECRETADOS PELAS MCSS NO CRESCIMENTO AXONAL ..41
FIGURA 11. FIGURA REPRESENTATIVA DO MICROAMBIENTE DO SNC: NEURÔNIO E CÉLULAS DA GLIA (NEUROGLIA)[211]. 41
FIGURA 12. ESQUEMA REPRESENTANDO A FORMAÇÃO DA CICATRIZ GLIAL EM LESÕES QUE ROMPEM AS MENINGES[215] 42
FIGURA 13. ATIVAÇÃO DA MICRÓGLIA. A SINALIZAÇÃO DO NEURÔNIO LESIONADO CONDUZ A ATIVAÇÃO DA MICRÓGLIA RESIDENTE E ESTA INICIA O PROCESSO DE FAGOCITOSE DAS CÉLULAS MORTAS OU EM APOPTOSE. 44
FIGURA 14. PRODUTOS RESULTANTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE B2 –MICROGLOBULINA VISUALIZADOS EM GEL DE AGAROSE. 100BP: MARCADOR DE PESO MOLEDULAR 100 PB, (-): CONTROLE NEGATIVO, 1 – 7: PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CDNA AMPLIFICADOS. AS SETAS INDICAM A PRESENÇA DA BANDA DE 300PB CORRESPONDENTE AO PRODUTO AMPLIFICADO DE B2 – MICROGLOBULINA. A PRESENÇA DAS BANDAS É INDICATIVA QUE A SÍNTESE DE CDNA FOI BEM SUCEDIDA. 55
FIGURA 15. ESQUEMA DO EXPERIMENTO DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T SOB ESTIMULO ESPECIFICO COM E SEM AT-MSC 57
FIGURA 16. MARCAÇÃO DAS AT-MSC NAS 4 PASSAGENS EM 14 DIAS. A MARCAÇÃO ESTÁ PRESENTE, EMBORA NÃO SEJA TÃO FORTE QUANTO NAS PRIMEIRAS PASSAGENS. A DIVISÃO CELULAR DIMINUI A QUANTIDADE DE QDOT PRESENTE NAS CÉLULAS....58
FIGURA 17. CITOMETRIA DE FLUXO DAS AT-MSC MARCADAS. ERA ESPERADO QUE HOUVESSE REDUÇÃO DA MARCAÇÃO NAS CÉLULAS EM FUNÇÃO DA DIVISÃO CELULAR. ESTE RESULTADO CORROBORA COM AS IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA EM QUE É OBSERVADA TAMBÉM A REDUÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS, MAS É POSSÍVEL IDENTIFICAR AS CÉLULAS ATÉ 15 DIAS, DURAÇÃO DO EXPERIMENTO ANIMAL. 58
FIGURA 18. MICROSCOPIA OPTICA E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE AT-MSC NA QUARTA PASSAGEM. A) FOTO DE MICROSCOPIA OPTICA COM AUMENTO DE 10X. B-D) IMUNOCITOQUÍMICA DAS AT-MSC DOS MARCADORES CD73(VERDE), CD90 (ROXO), CD105 (VERMELHO) E NUCLEAR(DAPI) EM AUMENTO DE 40X....65
FIGURA 19. CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS APÓS A QUARTA PASSAGEM. A) DOT-PLOT DAS CÉLULAS, MOSTRANDO CARACTERÍSTICA HOMOGÊNEA DESSA POPULAÇÃO E PAINEL DE HISTOGRAMAS DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR. AS AT-MSC POSSUEM EXPRESSÃO DOS MARCADORES CD105, CD90, CD29, CD73 E HLA-ABC E AUSÊNCIA DE EXPRESSÃO DE HLA-

DR, CD45, e CD34. B) Tabela com as médias das porcentagens dos marcadores celulares positivos e negativos (n=7). 66
Figura 20. Microscopia optica de célula-tronco submetidas à diferenciação nas linhagens mesodermais em aumento de 10X. A) Célula apresenta morfologia de fibroblasto. B)As AT-MSC foram submetidas à diferenciação osteogênica. O depósito de cálcio foi revelado com a coloração com Alzarin Red S. C) Na diferenciação para linhagem adipogênica, o Oil Red O marcaram as vesículas de gorduras presentes no citoplasma celular. D) As fibras de colágeno e a produção de matriz proteoglicana são coradas por Alcian blue, indicando potencial das AT-MSC de diferenciação para linhagem condrogênica. 68
Figura 21. Marcação das AT-MSC com qdot655(invitrogen) e microscopia de fluorescência e citômetria de fluxo. A) A marcação de qdot(vermelho) esta presente no citoplasma(actina esta marcada com faloidina alexa flúor 488 - verde) e perto do núcleo celular(DAPI). Pela citômetro de fluxo, verificou-se que 98,9% das células estavam marcadas com qdot655 (vermelho). 69
Figura 22. RT-PCR em gel de agarose de transcritos de fatores neurotróficos, fatores imunossupressores e genes de controle da reação. Os transcritos de Nestina, b2-Microglobulina, GDNF, BDNF, TGF- b1 e HGF possuem padrão de expressão em todas as amostras de AT-MSC, enquanto que os transcritos de IDO e IL-10 têm níveis de expressão diferente nas amostras. 70
Figura 23. Os linfócitos T (1 × 106 células inicial) somado aos APCs do timo foram estimulados na presença do seu antígeno específico (barra preta). Duas concentrações diferentes de ADSC foram adicionadas a cultura. Em ambas as concentrações, 6x105 (barra cinza) e 1,2 x106 (barra branca), houve uma redução significativa da resposta proliferativa dos linfócitos T específicos do MBP. 71
Figura 24. Ilustração esquemática da cirurgia e injeção das AT-MSC e foto de microscopia ótica e fluorescência da medula de animais tratados com AT-MSC. A) Esquema do procedimento da avulsão das raízes ventrais L4-L6 e a injeção das células. B) Medula de animal lesionado e o sítio de injeção na substancia branca da medula(5x) C) O sitio de injeção e a presença de AT-MSC marcadas com qdots na substancia branca, após 2 semanas da lesão. 72
Figura 25. Microscopia optica e de fluorescência mostrando a secção transversal da medula espinal lesada e linfócitos T, marcadas com anti-CD3(vermelho) e DAPI(azul). A) No grupo tratado, os Linf T CD3 são poucos frequentes no tecido nervoso na área da lesão devido a ação imunossupressora das AT-MSC. B) Na imagem da medula do grupo não tratado, percebemos maior presença de Linf T CD3, que já era esperado por se tratar de uma área inflamada. 74
Figura 26. Efeito neuroprotetor das AT-MSC na sobrevivência neuronal. Corte histológicos corados com cresil violeta, evidencia núcleo dos motoneurônios (seta vermelha) na região demarcada (circulo branco) . A-B) Lado ipsilateral à lesão dos animais tratados e não tratados. Observa-se a presença de motoneurônios com grande corpo celular e em maior numero nos animais tratados. C-D) Lados contralateral a lesão dos animais tratados e não tratados. E) Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal após duas semanas da lesão das raízes motoras. Em que é possível observar que o tratamento resultou num aumento de sobrevivência neuronal de até 50% (p<0,01). 76
Figura 27. Imunohistoquimica de sinaptofisina do lado Ipslateral e contralateral. No lado ipslateral, tanto em animais tratado(A,E) como em animais não tratados(B,F), há redução de integridade dos botões pré-sinápticos ao redor dos motoneurônios. No lado contralateral, há intensa marcação ao redor dos neurônios em função da grande quantidade de botões pré-sinápticos aos motoneurônios nos animais tratados e não

TRATADOS (C,D,G E H). PELA ANALISE DE INTENSIDADE DE PIXEL REALIZADA PELO SOFTWARE LSM IMAGE EXAMINER SOFTWARE RELEASE 3.2, HÁ DIFERENÇAS ENTRE OS LADOS IPSLATERAIS DOS GRUPOS. OBSERVA-SE QUE EXISTEM REGIÕES AO REDOR DOS MOTONEURÔNIOS DOS ANIMAIS TRATADOS EM QUE OS BOTÕES PRÉ-SINÁPTICOS ESTÃO PRESERVADAS(I), O QUE NÃO OCORRE AO REDOR DOS MOTONEURÔNIOS DOS ANIMAIS NÃO TRATADOS(J), EM QUE HÁ AUSÊNCIA DE MARCADORES DE SINAPTOFISINA AO REDOR DE TODO CORPO CELULAR. NO LADO CONTRALATERAL, OBSERVA-SE QUE A MARCAÇÃO DE SINAPTOFISINA É MUITO INTENSA AO REDOR DOS MOTONEURÔNIOS DOS GRUPOS TRATADOS E NÃO TRATADOS(K,L). 78

FIGURA 28.IMUNOHISTOQUÍMICA DO CORNO ANTERIOR VENTRAL DA MASSA CINZENTA DA MEDULA ESPINAL MARCADA COM ANTI-GFAP, DUAS SEMANAS APÓS A LESÃO. EM AMBOS OS GRUPOS, OBSERVA-SE AUMENTO DE MARCAÇÃO GFAP NO LADO IPSILATERAL (A,C), QUANDO COMPARADOS COM OS RESPECTIVOS LADOS CONTRALATERAIS (B,D), CARACTERIZANDO A ASTROGLIOSE REATIVA . CONTUDO, NOTA-SE MENOR MARCAÇÃO DE GFAP NO GRUPO TRATADO (A) QUANDO COMPARADA AO GRUPO NÃO TRATADO(C), INDICANDO QUE NO GRUPO TRATADO A ASTROGLIOSE REATIVA É MENOR. A ANÁLISE DE INTENSIDADE DE PIXEL ESCLARECE A OBSERVAÇÃO (E,F,G E H). BARRA DE ESCALA = 50MM 80

FIGURA 29. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIFICAÇÃO DA ASTROGLIOSE REATIVA DUAS SEMANAS APÓS A LESÃO. A PROXIMIDADE DA RAZÃO COM O NUMERO 1 REPRESENTA MENOR ATIVIDADE ASTROCITÁRIA. DESTA FORMA, OBSERVA-SE QUE HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS GRUPOS TRATADO E NÃO TRATADO (P=0,0003), NA QUAL A ASTROGLIOSE REATIVA É MAIS INTENSA NO GRUPO NÃO TRATADO. 81

FIGURA 30. IMUNOHISTOQUÍMICA DO CORNO ANTERIOR VENTRAL DA MASSA CINZENTA DA MEDULA ESPINAL MARCADA COM ANTI-IBA1, DUAS SEMANAS APÓS A LESÃO. EM AMBOS OS GRUPOS, OBSERVA-SE A ATIVACAO MICROGLIAL DO LADO IPSILATERAL (A,C), QUANDO COMPARADOS COM OS RESPECTIVOS LADOS CONTRALATERAIS (B,D). CONTUDO, HÁ MENOR MARCAÇÃO DE IBA1 NO GRUPO TRATADO (A) QUANDO COMPARADA AO GRUPO NÃO TRATADO(C), INDICANDO QUE NO GRUPO TRATADO A ATIVAÇÃO MICROGLIAL É MENOR. A ANÁLISE DE INTENSIDADE DE PIXEL ESCLARECE A OBSERVAÇÃO (E, F, G E H). BARRA DE ESCALA = 50MM 82

FIGURA 31. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL DUAS SEMANAS APÓS A LESÃO. A PROXIMIDADE DA RAZÃO COM O NUMERO 1 REPRESENTA MENOR ATIVAÇÃO MICROGLIAL. HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS GRUPOS (P<0,001), NA QUAL A ATIVAÇÃO MICROGLIAL É MENOS INTENSA NO GRUPO TRATADO DO QUE NO GRUPO NÃO TRATADO. 83

SUMÀRIO

Resumo ix
Abstract xi
Lista de Abreviaturas xiii
Lista de Esquema xiv
Lista de Tabela xiv
Lista de Figura xv
SUMÀRIO xix
1. Introdução 23
1.1. Fontes de CT adultas 25
1.2. Células-tronco mesenquimais(MSC) 27
1.3. Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo(AT-MSC) 28
1.4. Ação imunomodulatória das Células-tronco Mesenquimais e secreção de fatores neurotróficos 31
1.5. Marcação de células-tronco e determinação de seu destino 33
1.6. Modelo animal: embriogênese, sobrevivência e maturação dos motoneurônios 34
1.7. O motoneurônio alfa medular 35
1.8. Modelo animal de avulsão de raízes motoras da medula espinal 36
1.9. Plasticidade sináptica 38
1.10. O papel dos fatores neurotróficos na sobrevivência dos motoneurônios 39
1.11. Células da Glia 41
1.11.1. Astrócitos e astrogliose reativa 43
1.11.2. Microglia e Ativação Microglial 44
1.12. Xenotransplante 45
2. Objetivos 47
2.1.1. Objetivos Gerais 48
2.1.2. Objetivos Específicos 48
3. Material e Métodos 49
3.1. Obtenção de tecido adiposo 50
3.2. Isolamento e cultura celular 50
3.3. Citometria de Fluxo 51
3.4. Diferenciação em linhagem mesodérmicas 52
3.5. Citoquímica das Células Mesenquimais Diferenciadas 53

3.6. Imunocitoquímica e Microscopia confocal 53
3.7. Extração do RNA total para estudo de fatores imunomoduladores e neur tróficos 54
3.7.1. Tratamento do RNA total com DNAse I 54
3.7.2. Transcrição em cDNA 54
3.7.3. Desenho de oligos iniciadores 55
3.8. Ensaio de proliferação de Linfocito T submetidos a estimulo especifico 56
3.9. Marcação para rastreamento celular *in vivo* 57
3.10. Procedimentos *in vivo* 58
3.10.1. Comitê de ética 59
3.10.2. Avulsão das raízes motoras 59
3.10.3. Transplante e rastreamento das células tronco mesenquimais 59
3.10.4. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes 60
3.10.5. Estudo da sobrevivência neuronal e para imunohistoquímica 60
3.10.6. Sobrevivência neuronal 60
3.10.7. Imunofluorescência 61
3.10.8. Análise quantitativa da cobertura sináptica, da astrogliose reativa e microgliose reativa detectadas pela imunohistoquímica 62
3.10.9. Análise estatística 62
4. Resultados 63
4.1. Caracterização das células mesenquimais obtidas de tecido adiposo (AT-MSC) 64
4.1.1. Morfologia e aderência das AT-MSC em placa de cultura 64
4.1.2. Caracterização das moléculas de superfície celular 65
4.1.3. Capacidade de diferenciação das AT-MSC em linhagens mesodérmicas 67
4.1.3.1. Diferenciação Osteogênica 67
4.1.3.2. Diferenciação Adipogênica 67
4.1.3.3. Diferenciação Condrogênica 67
4.1.4. Marcação das AT-MSCs por Qtracker(Invitrogen) 68
4.1.5. Expressão do RNAm dos genes BDNF, GDN, TGF-β1, HGF, IDO, IL-10, Nestina e β2-Microglobulina em AT-MSC 70
4.1.6. Ação imunossupressora das AT-MSC em teste de proliferação *in vitro* de Linfócitos T 71
4.2. Modelo Animal 72
4.2.1. Enxerto das AT-MSC em medula espinal de ratos 72
4.2.2. Efeito imunossupressor das AT-MSC no modelo animal 73

4.2.3. Efeito neuroprotetor das AT-MSC sobre os motoneurônios 74
4.2.4. Efeitos das AT-MSC na atividade sináptica 77
4.2.5. Efeito das AT-MSC na astrogliose reativa 79
4.2.6. Avaliação da ativação microglial 81
5. Discussão 85
6. Conclusão 93
7. Referências Bibliográficas 95
8. Anexos 111
8.1. Anexo1- Comitê de ética Faculdade de Ciências Medicas 112
8.2. Anexo2- Comitê de Ética-Instituto de Biologia 114
8.3. Anexo3- Termo de consentimento 116

1. Introdução

Pesquisas com células-tronco embrionárias e adulta estão sendo realizadas nos últimos anos e apresentam resultados promissores para a medicina regenerativa [1].

Por definição, células-tronco (**CT**) são células com capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diversas linhagens celulares, porque têm alta plasticidade. O zigoto (figura 1) é a célula-tronco totipotente capaz de gerar todas as células do organismo (células embrionárias), mas também as que sustentam o desenvolvimento do embrião no útero (células extra-embrionárias). Na fase de blastocito e a partir da massa interna, são obtidas as células-tronco embrionárias (ES), que são pluripotentes, pois se diferenciam em células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma)[2].

Em adultos, há CTs em praticamente todos os tecidos e estas participam da regeneração e reparação tecidual, substituindo células que morrem no decorrer da vida do indivíduo. Contudo, atualmente têm se demonstrado a presença de algumas populações de CTs adultas com capacidade de diferenciação em linhagens celulares presentes em outros tecidos, diferentes daquele em que esta CT foi encontrada, atribuindo-se então para estas células a característica de plasticidade[3].

As CTs adultas vêm sendo usadas há mais de 30 anos para terapias em doenças hematológicas e do sistema imune. De modo geral, essas células*, in vivo*, se dividem assimetricamente dando origem à outra CT e uma célula progenitora que originará uma célula madura diferenciada. A maior vantagem no uso de CTs adultas é o fato de serem do próprio paciente, evitando rejeição do organismo. Entretanto, os principais critérios para sua aplicabilidade clínica são: i) ser encontradas em abundância, ii) possibilidade de procedimentos minimamente invasivos, iii) capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares, iiii) podem ser transplantada com segurança e efetividade em hospedeiro autólogo ou alógeno e, por ultimo, iiiii) deve ser possivel manusear seguindo os procedimentos GMP (Good Manufacturing Pratice)

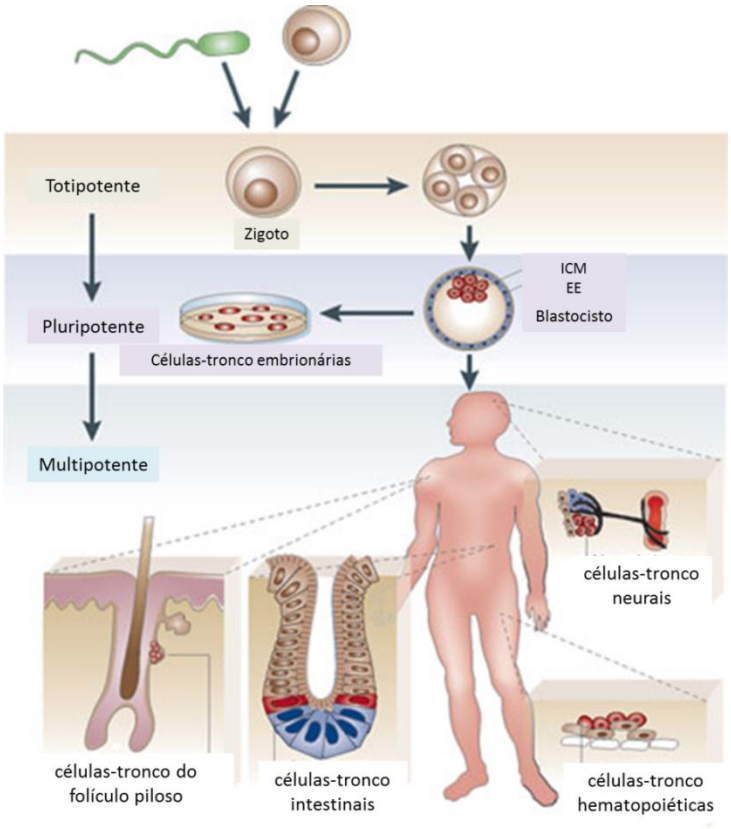


Figura 1. Classificação das células-tronco[2]-

1.1. Fontes de CT adultas

As células-tronco adultas de medula óssea e sangue periférico têm sido amplamente utilizadas como fonte para terapias celulares no transplante de medula óssea há mais de quatro décadas[4]. As CTs hematopoéticas (hematopoietic stem cell – HSC) originam toda a linhagem hematopoiética, formando progenitores mielóides e linfóides, que dão origem a linfócitos, hemácias, plaquetas e demais células sangüíneas, e possuem alguns marcadores moleculares, tais como, Sca-1, ckit, CD34 [5, 6].

O sangue de cordão umbilical (SCU) tem sido descrito como outra fonte de CT adulta. Comparativamente com as CTs de medula óssea adulta, as CTs de cordão apresentam maior grau de tolerância aos antígenos de histocompatibilidade (HLA) do hospedeiro, podem ser estocadas para uso posterior (criopreservacão) e apresentam menor risco de infecção viral[7]. É descrito em literatura a presença de células-tronco com fenótipos diferentes, tais como células hematopoiéticas CD34+[8] e células tronco que expressam CD 133+[9]. Além disto, dados de literatura têm demonstrado que as CT provenientes de sangue de cordão umbilical apresentam

potencial de se diferenciarem em células endoteliais[10, 11], cardiomiócitos[10, 12] ou células nervosas[10, 13-15].

Acredita-se que o tecido muscular também possa ser outra fonte de células-tronco [16-18]. As células satélites, encontradas nas proximidades dos mionúcleos, neuromotor e capilares, são as principais candidatas a células-tronco musculares[19, 20]. Estudos demonstram que as células satélites apresentam capacidade de se diferenciar em osteoblasto e adipócito em resposta a lesões, trauma e fatores de crescimento[21, 22].

Após estudos que confirmaram a proliferação de células no cérebro em animais adultos[23], o sistema nervoso central passou a ser um potencial local de obtenção de CT neuronais. As áreas identificadas como área de neurogênese são a zona subventricular(SVZ) e a região do giro do hipocampo dental (DG)[24]. As CTs neuronais são identificadas *in vitro* por meio da formação de neuroesferas. A partir da neuroesfera se formam os neurônios, glia e oligodendrito. As CTs neuronais, quando formam neuroesfera, expressam marcadores como: nestin, AC133 LEX/SSEA-1 e NG2. Elas têm capacidade de auto-renovação e diferenciação, mas são de difícil obtenção[19].

Estudos recentes têm descrito células multipotentes isoladas de placenta com capacidade proliferativa e expressão de marcadores característicos de osteoclastos, células neuronais e adipócitos [25]. Assim, células multipotentes isoladas de placenta também podem ser fonte de células tronco. Mais recentemente, estas células multipotentes, quando cultivadas em meio de cultura para diferenciação hepática, expressaram marcadores e morfologia característicos de hepatócitos [26, 27]. Além disto, estas células multipotentes derivadas de placenta, quando incubadas com várias citocinas, também mostraram-se capazes de diferenciação em tecido ósseo, cartilagem ou tecido gorduroso[25, 28, 29] e ainda são capazes de se diferenciar *in vitro* em neurônios e células da glia, se incubados com ácido retinóico (RA) ou 1-methyl-3-isobutylxanthina (IBMX) [30, 31]. Além das fontes CT acima citadas sucintamente, dados de literatura têm indicado outras fontes igualmente promissoras como líquido amniótico[32] e tecido adiposo.

As CTs mesenquimais(mesechymal stem cell - MSC) obtidas de tecido adiposo, medula óssea, sangue de cordão umbilical entre outros, são capazes de formar condroblastos, osteoblasto, células endoteliais e adipócitos e apresentam como fenótipo provável a expressão de CD49a+ e CD45med/low [33, 34].

É importante ressaltar os estudos com células-tronco pluripotentes induzidas ou IPSC (do inglês Induced Pluripotent Stem Cell) conduzida por meio da reprogramação genética de

células adultas, geralmente células da epiderme. Yamanaka e colegas induziram primeiramente células de fibroblasto adultas de camundongos[35] e depois células humanas[36] por meio de vetores virais e a adição de quatro genes: Oct-4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc. Também, já é possível induzir células-tronco neural (NSC) com um único fator de transcrição (Oct-4)[37] ou utilizar proteínas recombinantes para entrega dos genes sem utilização de vetores virais[38]. As IPSC possuem características semelhantes as células-tronco embrionárias, como auto renovação e potencial de diferenciação, padrões de expressões genicas e metilação da cromatina semelhantes, formação de corpos embrióides e formação viável de quimera[39]. Além disso, as IPSC possuem capacidade de diferenciar em neurônios, células da glia, NSC e motoneurônios[40, 41]. Contudo, as IPSC possuem algumas desvantagens, como formação de teratomas, programação aberrante e a presença de transgenes[42]. Desta forma, essas células tem um alto grau de utilidade para pesquisa, embora seu uso terapêutico seja ainda muito prematuro.

1.2. Células-tronco mesenquimais(MSC)

Células-tronco do estroma de medula óssea, não hematopoiéticas, são conhecidas atualmente como células-tronco mesenquimais (Bone Marrow mesechymal stem cell – BM-MSC) e foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores na década de 80[43]. As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens de origem mesodérmica, tais como: músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e tecido adiposo, quando submetidas a meios de cultura suplementados com fatores de crescimento e hormônios específicos[3, 44, 45]. Porém, atualmente tem sido descrita a capacidade das células-tronco mesenquimais de se diferenciar em células de tecidos de outras origens, tais como células neuronais e hepáticas [46-48]. Além disso, as células-tronco mesenquimais possuem outras características tais como: efeito imunomodulador, efeito parácrino, fácil obtenção, grande capacidade de proliferação, grande aderência e comportamento migratório[49-53].

A primeira e principal fonte de obtenção das MSC é a medula óssea, no entanto, elas são células raras e correspondem a cerca de 1 em cada 10.000 células nucleadas da medula óssea. Também é possível obter as MSC de várias outras fontes tais como: sangue de cordão umbilical, fígado fetal, líquido amniótico, polpa dentária e tecido adiposo[54-59].

1.3. Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo(AT-MSC)

O tecido adiposo possui uma organização complexa, formado basicamente por adipócitos maduros e imaturos, fibroblastos, células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, macrófagos, linfócitos e células-tronco mesenquimais[60, 61]. A fração celular do estroma vascular (***SVF:*** *stromal-vascular cell fraction*) de tecido adiposo tem sido foco de intensos estudos, pois este compartimento possui rica fonte de células pluripotentes adultas [62]. Além disto, características como procedimento cirúrgico simples através da lipoaspiração, fácil acesso ao tecido adiposo subcutâneo, obtenção em quantidade abundante e processo de isolamento relativamente simples torna o uso de CT obtidos de tecido adiposo atrativo para estudo e potencial utilização para terapia celular[62]. Ressalta-se que a lipoaspiração é um processo rotineiro na medicina estética e propicia a obtenção de grande quantidade de tecido adiposo, que será descartado[63, 64]. Análises comparativas de células-tronco mesenquimais isoladas de sangue de cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo, que são as fontes mais utilizadas, demonstram que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo não são diferentes em relação à morfologia, fenótipo, frequência na formação de colônias e capacidade de diferenciação[65]. Em estudo comparativo, Wagner e colaboradores analisaram através de microarranjos a expressão global dos genes de células-tronco mesenquimais obtidas dessas três fontes[66]. Os resultados demonstraram que, quando as células foram cultivadas em meios de cultura idênticos, a expressão de genes envolvidos na produção de proteínas da matriz extracelular, morfogênese e desenvolvimento foi semelhante, sugerindo que as células-tronco mesenquimais de diferentes fontes são semelhantes do ponto de vista de expressão gênica[66].

Por outro lado, Lee e col. demonstraram dados diferentes em relação à expressão gênica de células-tronco mesenquimais de medula óssea e tecido adiposo[67]. Primeiramente a avaliação por citometria de fluxo demonstrou que a expressão de marcadores como CD44, CD29, CD105, CD34, CD14b, cKit é igual, independentemente da fonte das células mesenquimais. Apesar destes dois tipos celulares se diferenciarem para as três linhagens em meios de cultura especificos (osteogênese, condrogênese e adipogênese), a AT-MSC apresentou maior taxa de proliferação. Além disto, a expressão de aproximadamente 2000 genes foi de 2 a 3 vezes maior do que nas células mesenquimais de medula óssea.

Não existe consenso na literatura sobre a denominação das células-tronco de tecido adiposo. Alguns autores, em suas publicações, referem-se a essas células como: células do processado de lipoaspirado (PLA - processed lipoaspirate cells)[68], células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ATSC, AT-MSC - adipose tissue-derived mesenchymal stem) [69, 70], células tronco multipotentes derivadas de gordura (MADS - multipotent adipose-derived stem cells)[71, 72]), células tronco derivadas de tecido adiposo (ASC - adipose tissue-derived

stem cells)[73, 74], células estromais derivadas de tecido adiposo (ADSC, ATSC - adipose tissue-derived stromal cells)[75, 76], células estromais de adulto derivado de tecido adiposo (ADAS - adipose tissue derived adult stem cells) [77, 78] ou células derivadas de tecido adiposo (ADC- adipose tissue-derived cells)[79]. Embora exista uma discordância quanto à nomenclatura e a população celular é a mesma, ainda é necessário a melhor caracterização celular e molecular das células multipotentes do tecido adiposo. Nesta tese, usaremos o termo "células mesenquimais derivadas de tecido adiposo" (**AT-MSC -** adipose tissue mesenchymal stem cell), pois esta nomenclatura vem sendo utilizada com maior frequência em trabalhos publicados recentemente e estão melhor referenciadas.

As células-tronco mesenquimais, de um modo geral, possuem três principais características: são células que passaram por várias passagens em cultura obtendo uma população morfologicamente homogênea, apresentam grande capacidade de diferenciação em diversas linhagens (principalmente linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica) e apresentam as mesmas características moleculares, mesmo sendo de origem tecidual diferente devem ser positivas para marcadores celulares CD90, CD105 e CD73 e negativas para marcadores de linhagem hematopoiética, como CD34, CD45, CD14[62, 71].

Além de possuírem o potencial de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos[80-86], as AT-MSCs também podem se diferenciar em células endoteliais e vasculares[87-90], hepatócitos [47, 91-93], células pancreáticas [94, 95], progenitores hematopoéticos [96-99] entre outras, como descrito amplamente na literatura.

A demonstração de que as AT-MSC são potencialmente capazes de se diferenciar em outros tipos celulares está descrita na literatura. Rodriguez et al. descreveram que AT-MSC diferenciam-se em adipócitos, osteócitos e mioblastos[71]. Este último tipo celular foi injetado em modelo experimental de distrofia muscular de Duchene e foi demonstrado que o animal passou a expressar taxas elevadas de distrofina, quando comparadas com animais não tratados[100]. Estudos recentes também confirmam o potencial das AT-MSC em diferenciarem-se em miócitos[101-103]. Di Rocco etal[104] realizou um estudo em que as AT-MSC obtidas de tecido adiposo de humanos foram incubadas com meios de cultura obtidos de cultura primária de mioblasto, ou mesmo co-cultura de AT-MSC e mioblastos. O fenótipo observado nas AT-MSC, após as incubações anteriormente citadas, era semelhante ao fenótipo de miotubos esqueléticos. Ainda, AT-MSC isoladas, porém não submetidas a meios de diferenciação, foram injetadas próximas ao local de isquemia de feixes musculares e apresentaram capacidade de incorporação nas fibras musculares do hospedeiro, sugerindo capacidade proliferativa.

Um grande numero de estudos também demonstram a capacidade de diferenciação neuronal das AT-MSCs[105-107]. Woodbury et al utilizou protocolo para transformação de

células neuronais a partir de aspirados de medula com β-mercaptoetanol (BME), ou dimetilsulfóxido (DMSO) + hidroxianisol butilado (BHA) em cultura de células tronco de medula de humanos e ratos. Observou-se, em questão de horas, que aproximadamente 80% das células cultivadas se transformaram em células neurais (expressaram enolase neuroespecífica, Neu N, neurofilamento M (NF-M) e tau)[108]. Posteriormente, dois trabalhos independentes sugeriram que a indução química neuronal proposta por Woodburry pode ser somente um artefato, em consequência aos efeitos tóxicos dos agentes químicos (BME, DMSO e BHA)[109, 110]. A partir destes estudos, têm-se dado preferência para o uso de fatores de crescimento e/ou citocinas neurotróficas para a transformação de células tronco em células neurais[111, 112].

Recentemente, Ahmadi etal [107]realizaram experimento comparativo de dois protocolos de diferenciação neuronal, com químicos e com citocinas. Com protocolo químico, o grupo demonstrou a reversibilidade de alguns marcadores, como MAP2 e GFAP, e maior morte celular que no segundo protocolo. Ainda, concluíram que uso de substancias tôxicas não são aplicáveis em transplantes celulares. Em outro estudo, Jang e colaboradores fizeram diferenciação de AT-MSC para neurônio a fim de estudar o potencial elétrico, uma das características essenciais para funcionalidade neuronal. Observaram que além de possuírem marcadores neuronais, há o disparo elétrico na membrana celular das AT-MSC diferenciadas e, por analise de RT-PCR, há aumento da expressão de genes relacionados a canais de sódio, potássio e cálcio na diferenciação destas células[106]. O assunto ainda é bem controverso quanto à diferenciação neuronal e sua funcionalidade, já que alguns estudos demonstram que alguns marcadores estão presentes antes da diferenciação[113], e há dificuldade de transplantar essas células diferenciadas em modelos animais[114].

Os mecanismos moleculares de diferenciação de AT-MSC têm sido objeto de vários estudos e ainda precisam ser esclarecidos. Cho e colegas[115] identificaram que a via Wnt, classicamente descrita como via envolvida na embriogênese, morfogênese e organogênese[116], está envolvida na proliferação das CTs obtidas de lipoaspirado em adultos. Além disto, o bloqueio desta via com RNAi reduziu a osteogênese. Em outro estudo, Kim e colaboradores usaram alguns tipos de isoflavonas para inibir a adipogênese e observaram que a ação ocorre pela via Wnt[117]. Outros trabalhos também apontam o envolvimento desta via na proliferação de tecidos adultos[115, 118, 119] e diferenciação de MSC[119-121].

1.4. Ação imunomodulatória das Células-tronco Mesenquimais e secreção de fatores neurotróficos

As células-tronco mesenquimais possuem capacidade de agir no sistema imunológico modulando a resposta por meio de fatores solúveis e contato célula-celula[122, 123] (Figura 2).

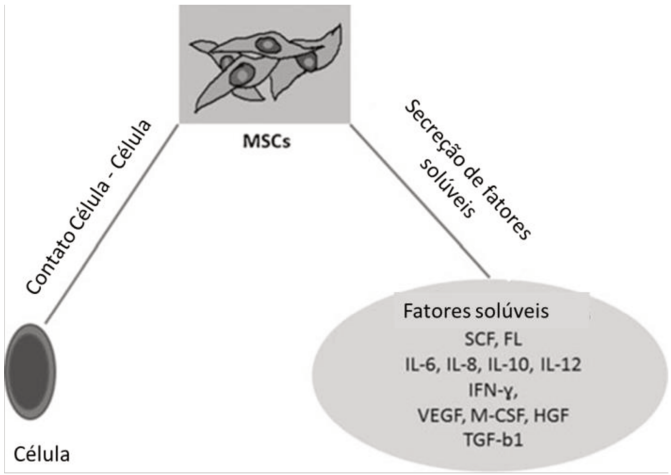


Figura 2. Ação imunossupressora das células-tronco mesenquimais mediadas pelo contato célula-célula e por fatores solúveis[122].

A capacidade de expressar ou liberar moléculas imunossupressoras é útil para a aplicação clinica(figura 3). Em estudo realizado em modelo de esclerose múltipla (encefalomielite autoimune experimental) utilizando AT-MSC de camundongo, Constantin e colaboradores obtiveram dois resultados interessantes resultantes da ação das AT-MSC em dois sitio distintos: órgãos linfóides e sistema nervoso central inflamado. A administração dessas células em fase pré-clínica da doença induziu efeito antiproliferativo dos linfócitos T, o que não ocorre quando a doença já esta estabelecida, demonstrando a ação dos fatores solúveis. No sistema nervoso central inflamado, não foi identificada qualquer participação direta no processo de remielinização, como diferenciação celular em oligodendrócitos maduros. Contudo, a produção de conhecidos fatores neuroregenerativos (bFGF, BDNF,CNTF e PDGF-AB) pela AT-MSC, em testes realizados por ELISA, tiveram efeito fundamental no processo de diferenciação das células progenitoras presentes em oligondendrócito [124].

Em outro estudo recente, as AT-MSC de humanos foram colocadas em cultura e, após 48h, o meio de cultura foi retirado (meio condicionado) e uma solução com células CD3/CD4 (FoxP3+ T Helper) obtidas por separação magnética foi adicionado a ela. Ivanova-Todorava e colegas observaram que os fatores presentes no meio condicionado e liberados pelas AT-MSC aumentaram o número da população de linfócitos CD4+FoxP3+ e a secreção de IL-10 por elas[125].

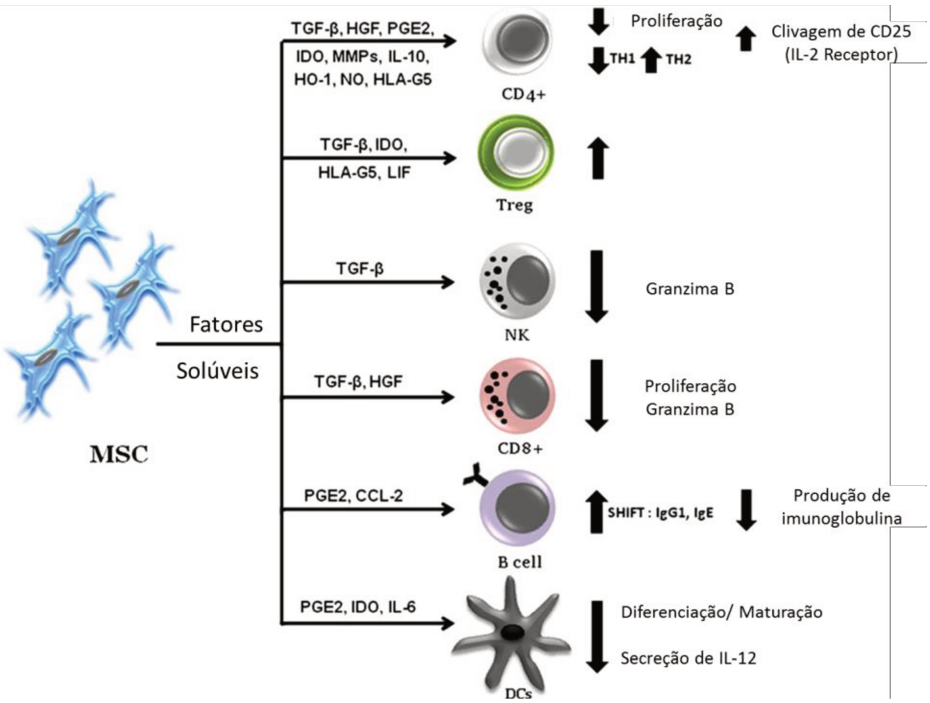


Figura 3. Ação de fatores solúveis imuno-regulatórios secretados pelas células-tronco mesenquimais [126].

As AT-MSC expressam fatores solúveis como IL10, TGF-b1 e HGF, conhecidos imunossupressores, assim como a ação da enzima IDO(indoleamine 2,3- Dioxygenase), que atua no catabolismo do triptofano, liberando quinurenina e regula a proliferação e a sobrevivência de linfócitos T[122, 123, 127](Figura 4).

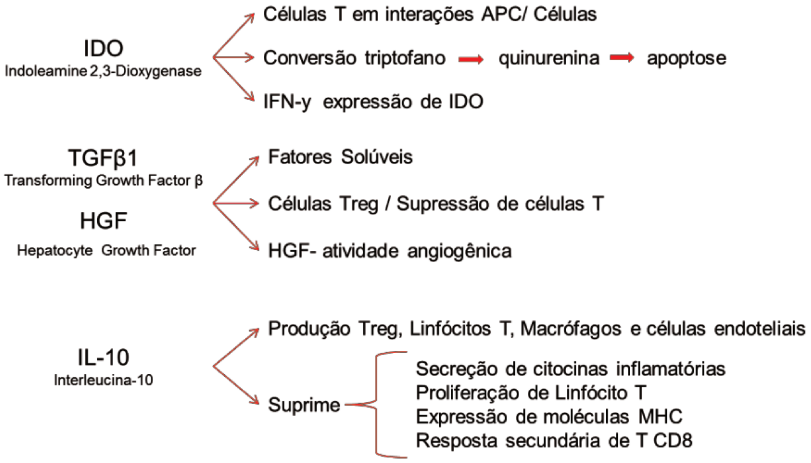


Figura 4. Principais fatores das células-tronco mesenquimais

Diversos trabalhos descrevem a secreção de fatores neurotróficos pelas AT-MSC, como BDNF, PDGF, FGF entre outros[128-131], embora ainda seja controverso quanto à secreção de GDNF[130, 131]. Em artigo recente, Brohlin e colegas compararam MSC de medula óssea de

dois grupos de pacientes de diferentes idades (16-18 anos e 67-75 anos). Não houve diferença significativa na expressão de neurofatores, como NGF(nerve growth factor),GDNF(glial-derived neurotrophic factor), NT3(Neurotrophic Factor-3), BDNF(brain-derived neurotrophic factor) e VEGF(vascular endothelial growth factor) em ambas as populações de MSC. Contudo, a capacidade de aumentar o crescimento de neuritos das células do gânglio da raiz dorsal e o ótimo resultado quanto ao crescimento e a diferenciação celular das MSC do grupo de pacientes jovem, levam a crer que o uso de células de pacientes mais idosos não seja uma boa opção para uma possível terapia celular[132].

1.5. Marcação de células-tronco e determinação de seu destino

Estudos com CT em animais de experimentação têm fornecido resultados promissores e entendimento nas diferentes etapas do mecanismo de cura por esta terapia. Em animais experimentais podemos fazer o rastreamento do destino de células tronco através da marcação *in vitro* com fluorocromo, bromodeoxiuridina (BrdU) ou incorporação de material genético como LacZ ou fluoresceina (GFP) e submeter à avaliação histológica em diferentes tempos. Uma outra maneira de se marcar uma célula para posterior localização é a utilização de nanopartículas superparamagnéticas (SPIO - Superparamagnetic Iron Oxide)(figura 5). Estas partículas são formados por um núcleo constituído por estrutura cristalina de óxido de ferro (Fe2O3 M2+O; M= metal divalente, por exemplo Fe2+, Mn2+). Em geral eles são envolvidos com uma camada externa de dextran, formando microcristais de magnetita com um diâmetro médio de 50nm. Esta estrutura é um bom agente de contraste negativo. O SPIO é disponível comercialmente com aprovação do FDA e da ANVISA e é usado para contraste de estudos hepáticos, onde há acumulo do material no sistema retículo-endotelial das células de Kupffer. O SPIO é biocompatível, pois pode ser metabolizado pelo organismo, voltando ao pool de ferro corporal, para ser utilizado em outros processos metabólicos que envolvem ferro, tal como a produção de hemoglobina[133]. Entretanto, SPIO quando usado isoladamente não marca as células não fagocíticas como é o caso de CT. A principal limitação deste método para o estudo de xenotransplante de células é a possibilidade de células do sistema imune do animal fagocitar as células mesenquimais humanas marcadas com SPIO ou fagocitar a SPIO liberada pelas células mortas ou expulsa das células viaveis e este apresentar um falso-positivo quanto à analise de localização [134-138]. Desta forma, não seria possível saber se as MSCs estão vivas ou viáveis e atuando no local da lesão.

Uma terceira forma de marcação celular é com pontos quantum, chamados de Qtracker (figura 5). Qtracker são concebidos para entrar no citoplasma de células cultivadas em cultura

com nanocristais Qdot altamente fluorescentes. Uma vez dentro das células, as Qtracker proporcionam fluorescência intensa e estável, que pode ser seguida por várias gerações, e não são transferidas para as células adjacentes em uma população. Essa marcação é comercial e foi estabelecida pela Invitrogen (Life Technologies); é utilizada em diversos estudos com a finalidade de conhecer os mecanismos e efeitos desta marcação nas células[139-142]. Essa marcação será utilizada neste trabalho.

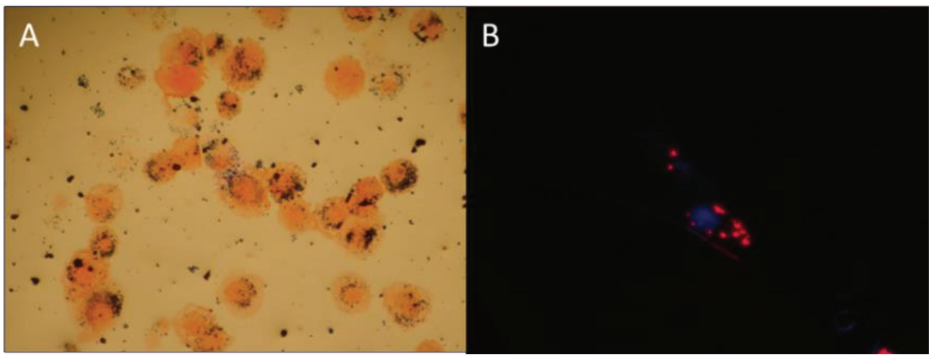


Figura 5. Ilustração das marcações por SPIO(A) e Qtracker(B) realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Hemocentro- Unicamp.

1.6. Modelo animal: embriogênese, sobrevivência e maturação dos motoneurônios

No desenvolvimento dos vertebrados superiores, motoneurônios são gerados em grande quantidade na medula até o décimo quarto dia embrionário, quando inicia o processo de morte programada. A redução do número de neurônios ocorre principalmente por apoptose, induzida pela ativação de vários genes e síntese de proteínas específicas e eliminadas sem a ocorrência de um processo inflamatório[143-147]. Esse processo é essencial para a manutenção da homeostase assim como para a manutenção do tamanho e função do órgão. Em função deste processo, os motoneurônios remanescentes e os que surgem pós-nascimento ampliam o número de contatos sinápticos formando circuitos funcionais, tanto com outros neurônios como com seus respectivos órgãos-alvo[148, 149].

A sobrevivência e funcionalidade dos motoneurônios durante o desenvolvimento embrionário dependem da estabilidade de suas sinapses com as fibras musculares[150, 151], assim como a interação célula-célula (neurônio e glia)[152-155], uma vez que disso depende o necessário aporte de fatores neurotróficos produzidos nesse locais ou células.

Diferentes fatores neurotróficos regulam a sobrevivência e a função dos motoneurônios num processo complexo[143, 155]. Algumas destas moléculas são produzidas após o

nascimento, indicando a dependência dos motoneurônios por esses fatores no período pós-natal[147] e durante toda sua vida[156, 157]. Após o contato com o tecido alvo, os motoneurônios se tornam dependentes também dos fatores neurotróficos produzidos pelas células musculares. Há evidências de que os motoneurônios, logo após o nascimento, continuem dependentes desta interação, competindo por uma quantidade limitada de agentes neurotróficos sintetizados nas fibras musculares que, através de transporte axonal retrógrado, são enviados ao corpo celular[146, 151, 156].

1.7. O motoneurônio alfa medular

Os motoneurônios (figura 6) são neurônios colinérgicos do SNC e podem ser classificados como alfa e gama. Os motoneurônios gama são menores e inervam as fibras intrafusais dos fusos musculares, contribuindo para a manutenção do tônus muscular. Os motoneurônios alfa são maiores, apresentam um grande corpo celular circular ou ovóide e inervam as fibras musculares extrafusais controlando de fato a contração muscular voluntária. No microambiente medular, os motoneurônios apresentam contatos com projeções de células gliais, dendritos e terminais sinápticos (figura 6), sendo que aproximadamente metade do soma é recoberto por extensões gliais[158, 159].

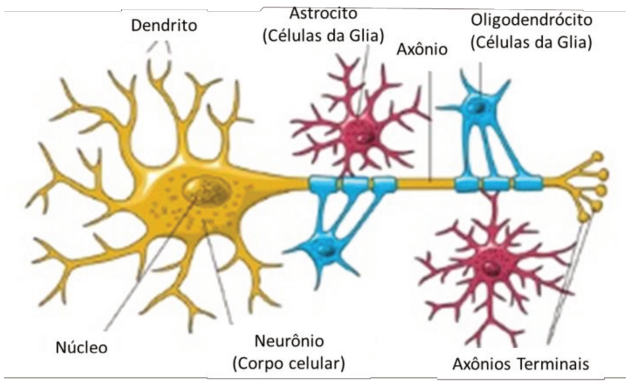


Figura 6. Disposição do motoneurônio e células da glía, astrócito e oligodendrócito[160].

A organização espacial dos diferentes neurônios presentes nos núcleos motores obedece a critérios anatômicos e funcionais (figura 7). Os motoneurônios que inervam os músculos mais proximais estão localizados medialmente em relação aos que inervam músculos mais distais, que por sua vez são laterais. Por outro lado, o critério funcional divide os núcleos em porção ventral, contendo motoneurônios que inervam os músculos extensores, e porção dorsal, que contém motoneurônios que inervam os músculos flexores. Assim, os motoneurônios alfa, em

posição dorso-lateral, que inervam os músculos da região posterior da coxa, perna e pé, foram considerados para análise no presente trabalho.

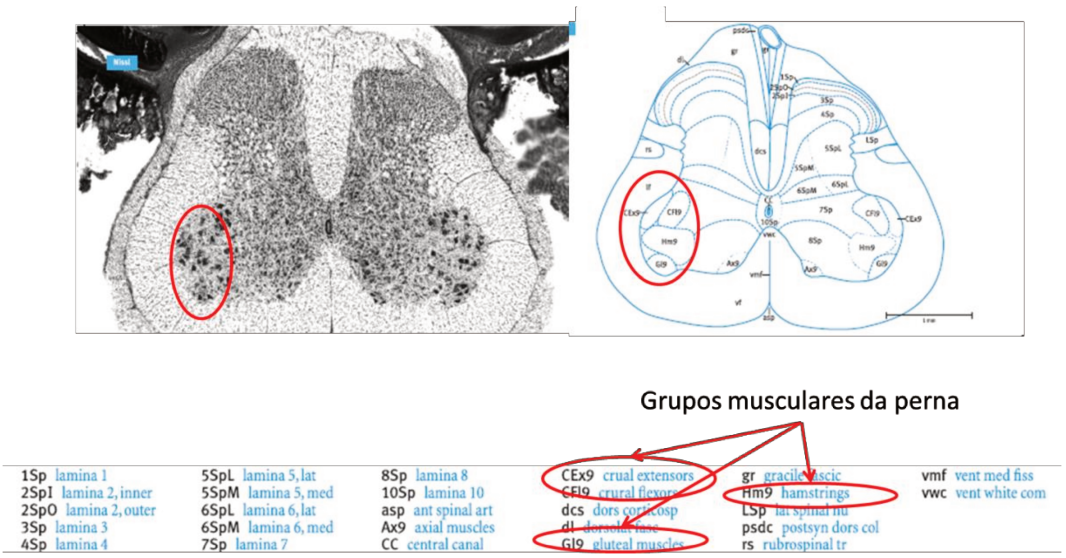


Figura 7. Organização espacial dos motoneurônios em secção transversal da medula nervosa espinal[161].

1.8. Modelo animal de avulsão de raízes motoras da medula espinal

A lesão axonal proximal dos neurônios motores provoca degeneração significativa de motoneurônios alfa, uma vez que a avulsão das raízes motoras da superfície da medula espinal, além do impacto mecânico, resulta na desconexão entre o corpo neuronal e o alvo muscular e, a partir desse ponto, o processo intracelular ocorre de modo semelhante ao processo de morte celular programada do período embrionário, bem como pela tração que o axônio é submetido no território intramedular[162-164].

Diversos modelos experimentais, tais como os modelos de incisão do funículo ventral da medula[165] e avulsão de raízes ventrais da medula com ou sem reimplantação[130, 166, 167], têm sido utilizados com finalidade de estudar os efeitos da axotomia proximal na indução de degeneração de motoneurônios e a possibilidade de desenvolver diferentes tratamentos. A avulsão de raízes motoras (figura 8) tem se mostrado um modelo reprodutível da degeneração experimental de neurônios motores em ratos[168, 169] e já é utilizado em diversos experimentos pelo Professor Colaborador Alexandre L.R. de Oliveira[130, 170].

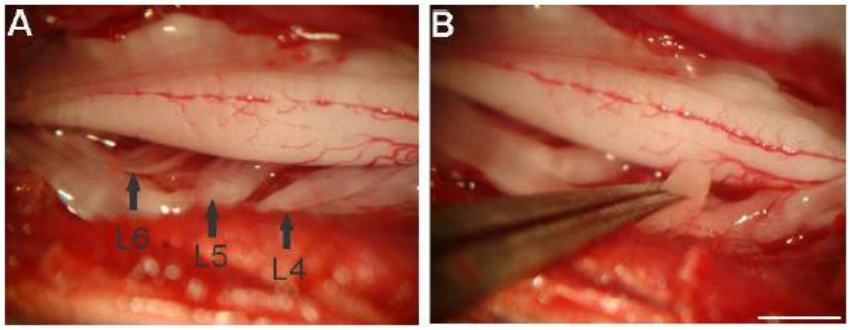


Figura 8. Procedimento cirúrgico do modelo animal (rato) de avulsão de raízes motoras da medula espinal L4, L5 e L6. Foto obtida do artigo do grupo colaborador[170]

As lesões axonais tanto no Sistema Nervoso Central (SNC) quanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP) resultam em degeneração retrógrada e morte celular. Diversos fatores influenciam a capacidade de sobrevivência, evolução e gravidade da lesão do neurônio axotomizado: i) a distância entre o sítio da lesão e o corpo do neurônio (descrito anteriormente), ii) localização dos neurônios(SNP ou SNC)e iii) a idade do animal. No SNC, a taxa de morte celular de neurônios submetidos axotomia proximal é alta enquanto neurônios localizados no SNP geralmente sobrevivem e regeneram[171]. Diversos estudos mostram a degeneração e a morte de motoneurônio adulto após a avulsão de raízes ventrais na interface SNC-SNP[168]. Tal lesão resulta na completa desconexão com os componentes do nervo periférico, como as células de Schwann, as quais produzem inúmeras moléculas neuroprotetoras essenciais aos motoneurônios[172, 173]. O mecanismo da morte de motoneurônios adultos após avulsão ainda é pouco conhecido e controverso. Diversos estudos indicam dois caminhos para a morte ou degeneração dos motoneurônios: apoptose [174, 175] ou necrose[169, 176]. A expressão de Bcl-2 mediada por um vetor viral evita a degeneração de motoneurônios após a avulsão de raízes motoras ventrais em ratos adultos[177], porém a inibição de caspases falha em recuperar os motoneurônios[178]. Os resultados sugerem que a morte de um motoneurônio adulto após a avulsão segue também outros caminhos, além da via apoptótica.

No modelo de avulsão das raízes ventrais L4-L6 estudado no presente estudo, os motoneurônios axotomizados na interface entre o sistema nervoso central e periférico resultam na perda de até 80% das células nervosas lesadas durante a segunda ou terceira semanas após a lesão e são caracterizadas também por mudanças metabólicas e morfológicas[179]. Esse modelo mimetiza a lesão do plexo braquial em humanos, cuja a causa mais comum dessa lesão decorre de mecanismo de tração, como acidentes motociclísticos, seguido de projéteis de arma de fogo, compressão e ferimentos cortantes, com perdas motoras, sensitivas e autônomas da extremidade afetada[180].

A desconexão entre o corpo celular do neurônio e o órgão alvo, que leva à interrupção do aporte de fatores neurotróficos para o corpo celular, é, em parte, causa dessas mudanças, que acarreta alterações no corpo celular do neurônio denominada cromatólise[181-183], que é a degradação ou desaparecimento da cromatina do núcleo. Incluídos neste contexto, estão o edema do corpo celular, o deslocamento do núcleo para a periferia da célula e a dissolução da substância de Nissl.

Outra consequência da axotomia proximal é que a lesão expõem os motoneurônios a processos excitotóxicos (ativação acima do normal de receptores glutamatérgicos, consequência de excessiva quantidade do respectivo neurotransmissor e com efeito danoso em neurônios). Estes efeitos promovidos pelo neurotransmissor glutamato provindos dos terminais sinápticos podem levar ao aumento da produção de radicais livres após eventos lesivos[151, 184]. Esse processo tem um papel fundamental em muitas doenças neurológicas[185] e, recentemente, estuda-se seu papel em doenças como esclerose múltipla[186] e doença de Parkinson[187].

1.9. Plasticidade sináptica

Uma propriedade fundamental do Sistema Nervoso (SN) é sua plasticidade e depende da atividade do sistema. Após uma lesão no SN (interrupção do contato entre o motoneurônio e as fibras musculares) ocorre remodelação estrutural e funcional de seus circuitos e a retração de botões pré-sinápticos presentes na superfície dos motoneurônios axotomizados[188](figura 9). No período agudo pós-lesão, há uma perda significativa desses botões sinápticos, diminuindo ou mesmo cessando temporariamente a transmissão sináptica[189, 190]. Em analise ultraestrutural, observa-se uma redução do número de contatos sinápticos no corpo dos motoneurônios do tipo alfa e na região proximal de seus dendritos. Contudo, os terminais glutamatérgicos (tipo S) são mais afetados durante a fase de eliminação dos terminais sinápticos. A supressão preferencial pode ser interpretada como uma forma de se evitar a excitotoxicidade mediada por este neurotransmissor. Desta forma, há proporcionalmente uma maior eliminação de terminais excitatórios[190-193].

As células lesadas apresentam predomínio de botões sinápticos inibitórios. As alterações sinápticas observadas refletem uma reorganização ativa dos motoneurônios em resposta à lesão e leva a mudanças metabólicas do estado de transmissão sináptica para o estado de recuperação dos axônios comprometidos pela lesão[193].

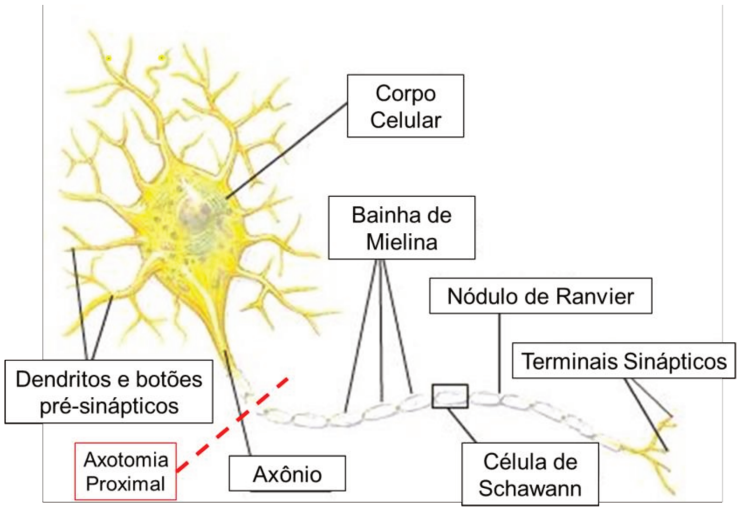


Figura 9. Estruturas do Motoneurônio e local da lesão proximal.

Ocorre também o aumento da expressão de RNAm relativos a componentes do citoesqueleto (tubulina e actina) e de proteínas envolvidas no alongamento axonal (GAP-43 – growth associated protein-43), e a redução da expressão de proteínas relacionadas à transmissão sináptica[194]. Também ocorre um aumento acentuado da expressão de RNAm para receptores de fatores neurotróficos como p75[195, 196] e trkB [197].

1.10. O papel dos fatores neurotróficos na sobrevivência dos motoneurônios

Fatores neurotroficos são moléculas secretadas que tem papel fundamental no desenvolvimento, manutenção, função e plasticidade do sistema nervoso. Os dois maiores grupos são as neurotrofinas[198] e a família GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family of ligands (GFLs))[199]. Existem também outros fatores que atuam no sistema nervoso, como EGF(Epidermal Growth Fator), FGF(Fibroblast Growth Factor) e HGF(Hepatocyte Growth Factor)[200].

Os fatores neurotróficos são seletivos em sua ação nas populações de neurônios e estão diretamente envolvidos no desenvolvimento, na estabilidade e na função dos motoneurônios maduros, assim como na sobrevivência, na plasticidade e na regeneração após lesões axonais[201-203](figura 10).

Dentre os fatores que exercem ação trófica sobre motoneurônios estão diferentes neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF –Brain Derived Neurotrofic Factor)[157, 204, 205], as neurotrofinas 3 (NT-3) e 4/5 (NT-4/5) [206, 207]. Outros

importantes fatores neurotróficos que atuam sobre os motoneurônios são o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e o fator inibitório de leucemia (LIF) da família das citocinas, assim como os fatores de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) e o fator básico de crescimento de fibroblasto (FGFb)[147, 200, 206]. Mais recentemente, verificou-se que o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), identificado a princípio como um fator de sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos *in vitro*, é também um potente promotor da sobrevivência de motoneurônios e neurônios autonômicos *in vivo* [205, 208, 209]. Foi demonstrado que o GDNF é significativamente mais potente do que o BDNF na promoção da regeneração axonal motora após secção do nervo tibial em ratos adultos, mas o tratamento combinado de GDNF e BDNF aumentou significativamente o número de motoneurônios que regeneraram seus axônios mostrando que, embora a ação neurotrófica destas moléculas se realize por vias intracelulares distintas, elas, quando juntas, têm efeitos sinérgicos[210, 211].

Yan etal demonstraram que o transporte de BDNF ocorre pelo motoneurônio de ratos neonatos e que a aplicação local do neurofator tem um importante papel na sobrevivência de motoneurônios após a transecção do nervo isquiático tanto de neonatos, como em adultos[204]. Na mesma linha, Kishino e colaboradores verificaram que a administração intratecal (injeção pelo canal raquideano, diretamente no espaço subaracnoide) do BDNF, após a avulsão das raízes espinhais de ratos adultos, reduziu a atrofia celular e aumentou a síntese da enzima colina-acetil transferase (ChAT). Os resultados também indicaram que o BDNF apresentou a capacidade de estimular o crescimento axonal dos neurônios motores no SNP[212].

Em modelo de avulsão do nervo periférico facial, Wasabi e colegas estudaram os efeitos de diversas moléculas neuroprotetoras por meio de um tratamento com vetores virais que codificam BDNF e GDNF. Verificaram que o tratamento reduziu perda significativa de motoneurônios faciais, atenuou a redução de ChAT e suprimiu a atividade da óxido nítrico sintase (NOS)[213]. A apoptose de motoneurônio é regulada por NOS que em elevada atividade leva à morte celular[214]. O conjunto de dados obtidos até o momento sobre a natureza dos fatores neurotróficos sugere que seu papel na biologia dos motoneurônios derive da sua ação conjunta e coordenada, quer durante o desenvolvimento quer após eventos lesivos[147]. Diversos estudos estão sendo realizados com fatores neurotroficos injetados com o objetivo de desvendar a capacidade de regeneração e funcionamento destes fatores no SN [215-218].

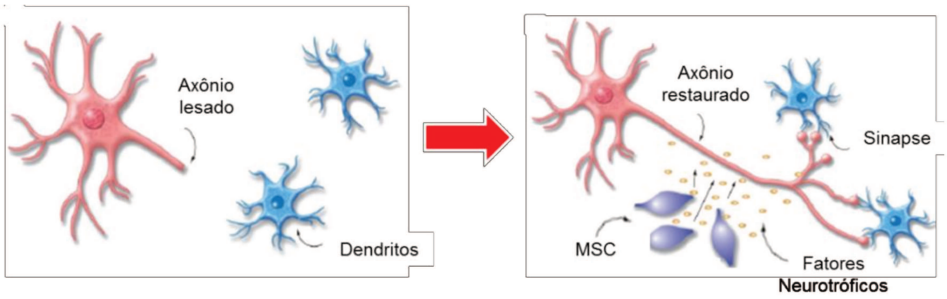


Figura 10. Ação de fatores neurotróficos secretados pelas MCSs no crescimento axonal.

1.11. Células da Glia

A interação entre os motoneurônios e o microambiente circunvizinho(figura 11), incluindo os componentes extra celulares e as células não neuronais, é de crucial importância para a estabilidade sináptica e a homeostase[192, 219]. A glia exibe uma variedade de funções, o que lhe confere uma posição de destaque nos processos de homeostase neuronal.

As células gliais podem ser divididas em células macrogliais (oligodendrócitos, astrócitos e células ependimárias) e células microgliais, que possuem características morfofuncionais de células fagocíticas do sistema imune[220]. Astrocitos e micróglias são altamente sensíveis a alterações em seu microambiente e tornam-se ativadas em resposta a lesões, processos anormais no SNC ou mudanças no microambiente. O termo ativada refere-se a capacidade de realizar funções além das presentes no estado basal, como proliferar, fagocitar e liberar fatores pro-inflamatórios ou de crescimento[221].

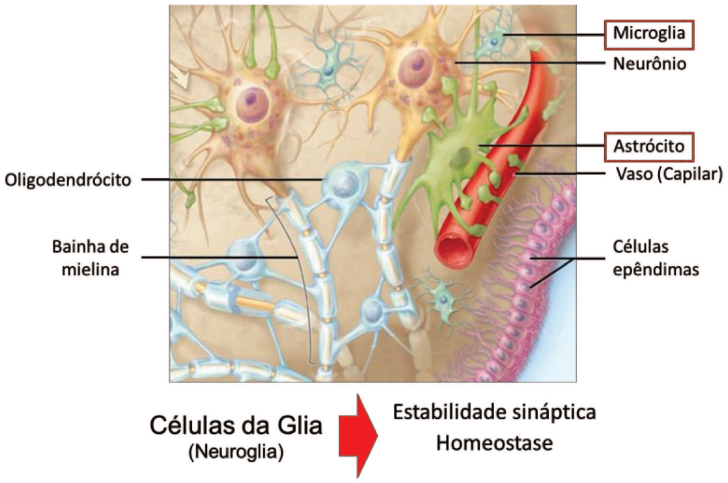


Figura 11. Figura representativa do microambiente do SNC: neurônio e células da glia (neuroglia)[222].

A relação neurônio e células da glia é foco de intenso estudo. É sabido que neurônios podem ativar células gliais por neurotransmissor ou moduladores (p.e. glutamato, óxido nítrico)[223, 224]. Por outro lado, sabe-se que as células gliais ativadas estão envolvidas no desenvolvimento de diversas doenças neurológicas, isquemias e lesões diretas, que acontece no processo de infecções(bactérias e vírus) e formação da cicatriz glial.

Há evidências que neurônios que sofreram lesões severas nos axônios são capazes de regeneração, mas isso não ocorre em função da cicatriz glial. A formação da cicatriz consiste basicamente de uma barreira física de células gliais, principalmente astrocitos, componentes fibróticos e moléculas inibitórias (regeneração axonal) (figura 12). Se, por um lado, ela impede fisicamente a regeneração de axônios, por outro, ela permite a contenção da lesão naquele sítio de inflamação (limita degeneração celular) e restaura/repara a barreira hamatoencefálica (homeostase)[225].

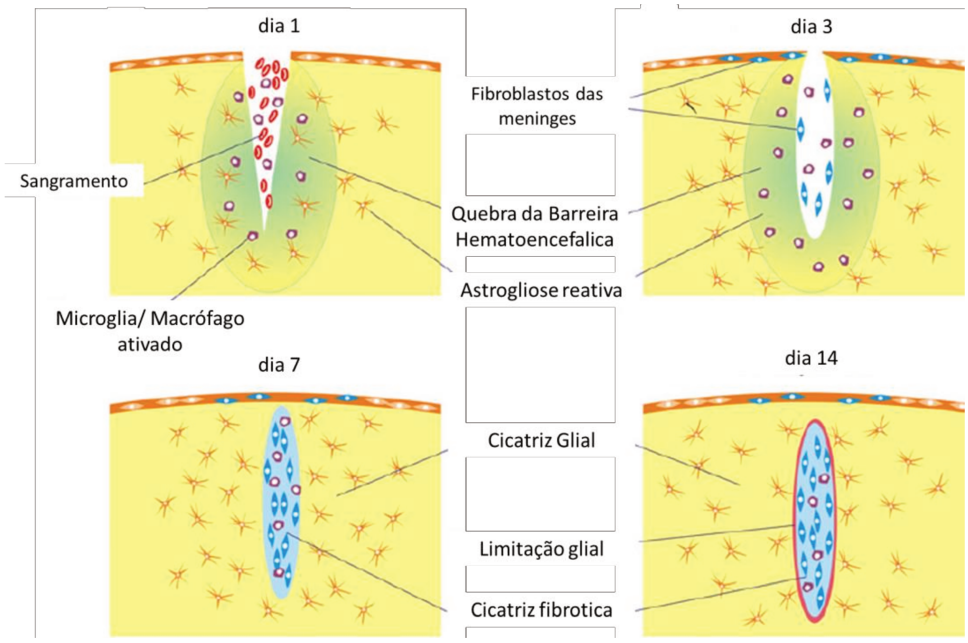


Figura 12. Esquema representando a formação da cicatriz glial em lesões que rompem as meninges. Ocorre a lesão com o rompimento da barreira hematoencefálica e a micróglia adentra a área de lesão. Três dias após a lesão, há aumento significativo astrócitos reativos(GFAP+) em torno do local da lesão, Fibroblastos penetram para o local de lesão pelas as meninges danificadas. Uma semana após a lesão, fibroblastos proliferam e secretam matriz extracelular para formar a cicatriz fibrótica. Astrócitos reativos reocupam a área circundante da lesão local e há restabelecimento da barreira hematoencefálica. Após 2 semanas, os processos de astrócitos reativos selam o local da lesão para formar uma barreira denominada glia limitante [226].

1.11.1. Astrócitos e astrogliose reativa

Os astrócitos constituem o tipo glial predominante no SNC[227, 228]. Apresentam morfologia tipo estrela e prolongamentos citoplasmáticos denominados processos astrocitários perivasculares, que é componente estrutural da barreira hemato-encefálica[229]. O processo astrocitário também envolve as sinapses de maneira especial, de forma a regular a transmissão sináptica[230]. Desta forma, a maturação sináptica e a atividade neuronal estão sujeitas ao controle astrocitário[231]. Ainda, esses processos, por meio de junções gap, interligam diferentes tipos celulares, formando uma rede[232, 233]. Assim, o astrócito é o ponto de ligação entre todas as células do SNC e controla diretamente o metabolismo neuronal[234]. A ablação destas células leva ao edema vasogênico e à falha do restabelecimento da barreira hemato-encefálica[235].

Além de importante elemento de suporte metabólico dos neurônios[236], as projeções celulares dos astrocitos, extremamente finas e livres de organelas, abundantes nas adjacências das regiões sinápticas[237], têm a capacidade de modular a excitabilidade neural pela difusão de íons(p.e. Ca2+)[227] e neurotransmissores [236, 238-243], e desta forma os astrocitos também são capazes de agir ativamente na resposta do SN[244, 245].

Os astrocitos têm a capacidade de responder a mudanças da homeostase do tecido nervoso e, em condições anômalas, através da formação da cicatriz glial, participar da retração e eliminação das terminações sinápticas, desempenhando papel ativo na plasticidade do sistema nervoso[230, 246]. As lesões no SNC induzem uma série de alterações nas células gliais. Tanto astrócitos quanto a microglia tornam-se reativos, constituindo a chamada gliose reativa, caracterizada pela hipertrofia do corpo e processos celulares dos astrócitos e pela hiperplasia de ambos os tipos celulares[247-249].

A astrogliose é a resposta astrocitária que se desenvolve pela hipertrofia e hiperplasia reativas [250]. No local da lesão, os astrócitos ocupam os sítios de neurônios degenerados formando a chamada cicatriz glial, que é o principal impedimento para a regeneração axonal, uma vez que atua como uma barreira física para os axônios em crescimento[251]. Além disso, os astrócitos participam da eliminação dos terminais pré-sinápticos, uma vez que a resposta glial coincide com a perda de sinapses em motoneurônios alfa medulares em cromatólise[252].

Na hipertrofia astrocitária pós-lesão de motoneurônios, há aumento da expressão de GFAP (glial fibrillary acidic protein) nos astrocitos, que é uma proteína constituinte da rede de filamentos intermediários dos astrócitos[253]. Membro da família de proteínas do citoesqueleto, o GFAP promove a estabilidade estrutural dos processos astrocitários e, portanto, está

relacionado à função na modulação da motilidade e morfologia glial. Dessa forma, esta proteína pode ser caracterizada como um indicador da astrogliose reativa.

1.11.2. Microglia e Ativação Microglial

A microglia são tipos específicos de macrófagos derivadas de precursores da medula óssea que monitoram o ambiente tecidual, ajudam na manutenção homeostática do tecido e fagocitam células morta (figura 13). Durante o desenvolvimento, a micróglia remove células apoptóticas e conexões neurais improprias, e, no SNC de adultos, fazem a vigilância do microambiente do SNC pronta para atuar ao primeiro sinal de distúrbio homeostático ou de lesão [254, 255]. Portanto, a micróglia faz parte da resposta imune inata pós-lesão do sistema nervoso.

Na lesão, as micróglias são as primeiras a responderem e agem sob estímulo de citocinas pró-inflamatórias produzindo estas mesmas citocinas (TNF-α e IL1β), proteases e outros fatores citotóxicos logo nas primeiras 5-12 horas. A super expressão de TNF-α pode causar desmielinização espontânea em função da ativação da micróglia, porque ela produz fatores que levam a morte de oligodendrócitos e danos na mielina[256], enquanto que a inibição de TNF-α contribui para uma melhora funcional e reduz apoptose celular[257]. A formação de subprodutos da ação oxido nítrico sintase (iNOS) e de radicais livres, produzidos pela micróglia, podem matar o neurônio [258]. Contudo, também tem importante papel na retirada de células mortas e demais detritos na lesão e no reconhecimento de agentes microbianos patogênicos, para que se inicie o processo de regeneração tecidual.

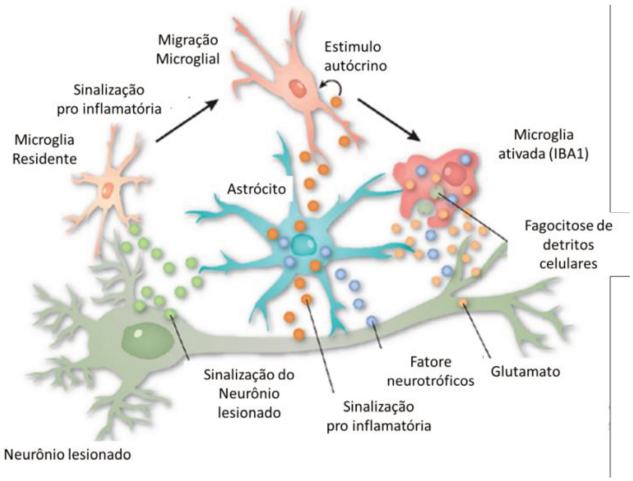


Figura 13. Ativação da micróglia. A sinalização do neurônio lesionado conduz a ativação da micróglia residente e esta inicia o processo de fagocitose das células mortas ou em apoptose.

1.12. Xenotransplante

Tendo em vista que o trabalho aqui descrito utlizou células-tronco humanas em modelo de lesão animal, torna-se notório um estudo na literatura de outras pesquisas cujo o foco foi xenotransplante de células-tronco. A capacidade imunomodulatória das células-tronco mesenquimais (MSCs) parece permitir transplante alogênico ou xenogênico sem o uso de agentes imunossupressores[259, 260]. Foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo (AT-MSC) não expressa antígenos maiores de histocompatibilidade complexa-II (MHC2)[261] e os seus efeitos imunossupressores são também mediados por prostaglandina E2[262]. Estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que o transplante alogênico de AT-MSC foi capaz de controlar a reação do enxerto contra o hospedeiro da doença[263].

Artigo de revisão realizado por Li & Cooper[259] identificou 94 relatórios da administração *in vivo* entre espécies de MSC em uma variedade de modelos experimentais. A maioria (n = 89) envolve o uso de MSC humano em várias outras espécies. As MSCs humanas utilizadas foram, em grande parte, derivadas da medula óssea, tecido adiposo, ou sangue de cordão umbilical e as vias de administração foram variadas, embora quase metade dos estudos utilizem a via intravenosa. A função das MSCs foi confirmada em vários modelos inter-espécies, sendo que as MSCs humanas funcionaram em nada menos do que sete espécies diferentes.

Em modelo de lesão da medula espinal, Neuhuber e colegas injetaram células mesenquimais de medula óssea humanas (BM-MSC) em ratos[264]. O grupo verificou que, em animais tratados, houve crescimento axonal robusto dos neurônios lesionados em função de fatores solúveis liberados pelas BM-MSC, embora houvesse notória variação deste crescimento entre os animais do grupo tratado, uma vez que as BM-MSC eram de doadores diferentes. Desta forma, as BM-MSC suportam crescimento axonal após a lesão espinal. Na mesma linha de estudo, mas utilizando células mesenquimais de sangue de cordão umbilical(UCB-MSC) em cachorros, Lee e colegas identificaram remielinização de axônios após lesão da medula espinal nos animais tratados[265].

Desta forma, existe uma base sólida para supor que as AT-MSC humanas em transplante xenográfico possam ter efeitos semelhantes ou próximos de um transplante alogênico ou de células-tronco da mesma espécie.

2. Objetivos

O tecido adiposo é uma nova fonte de células-tronco que tem potencial de se diferenciarem em diversos tipos celulares, inclusive em células neuronais *in vitro*, e a capacidade de secretar fatores imunossupressores e neuroprotetores. O objetivo desse estudo é verificar a ação destas células, após xenotransplante, em modelo animal de lesão medular.

2.1.1. Objetivos Gerais

Investigar os efeitos neuroprotetores e imunomoduladores das AT-MSC humanas sobre motoneurônios alfa medulares no transplante xenográfico em ratos fêmeas (6-8 semanas) submetidos à avulsão de raízes motoras

2.1.2. Objetivos Específicos

1 – Estabelecer cultura e caracterização de células mesenquimais obtidas de lipoaspiração (AT-MSC).

2 – Estabelecer marcação celular para identificação *in vivo*

3 – Analisar o impacto do tratamento com AT-MSC sobre a sobrevivência neuronal

4 – Avaliar efeitos das AT-MSC nos processos de eliminação sináptica, reação da astroglia, ativação da microglia e imunomodulação

3. Material e Métodos

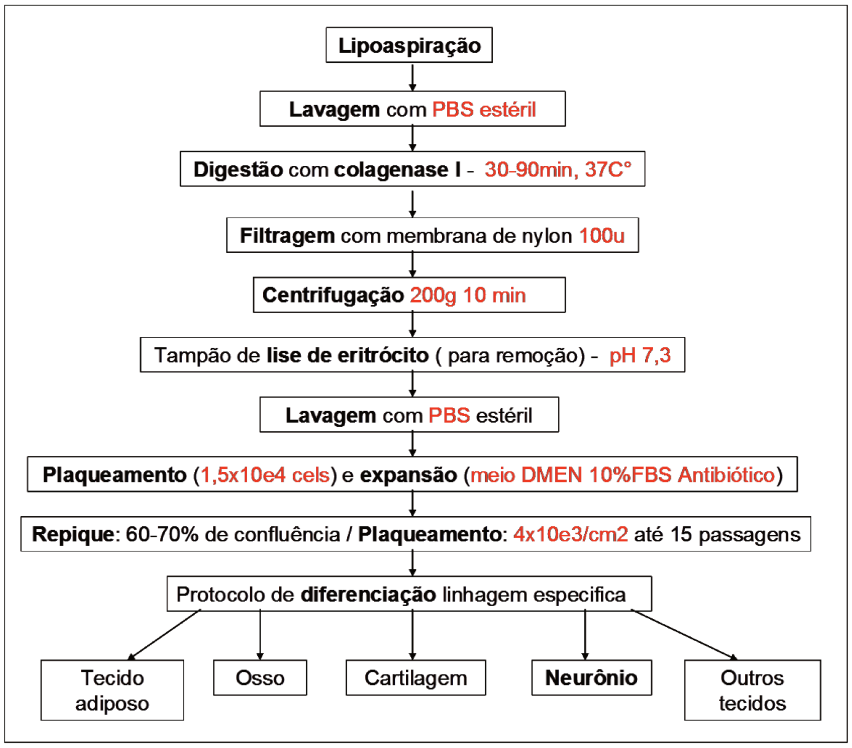
3.1. Obtenção de tecido adiposo

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (ANEXO 1 - processo CEP-N° 839/2008), o tecido adiposo foi doado pelos pacientes do Hospital das Clínicas UNICAMP quando estes eram submetidos a uma lipoaspiração. Foram selecionados pacientes com idade entre 25 e 50 anos e excluídos pacientes diabéticos e hipertensos.

3.2. Isolamento e cultura celular

As células mesenquimais (MSC) foram obtidas de tecido adiposo humano de pacientes submetidas à cirurgia de lipoaspiração, sob anestesia geral. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado a todos os pacientes submetidos a lipoaspiração que concordaram com a doação.

O tecido lipoaspirado foi lavado exaustivamente com PBS ("phosphate-buffered saline") para remover traves de tecido conjuntivo e hemácias. Para cada 10 g de tecido, a proporção das substâncias para o tampão de digestão continha é 20mg de colagenase tipo 1A, 200mg de albumina sérica bovina (BSA), 20ml de D-MEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose) e 10µl de gentamicina (filtrar a solução). A mistura foi tratada em banho-maria à 37ºC por 30 minutos, agitando o recipiente a cada 5 minutos. Após a digestão completa do tecido, a reação foi interrompida com 10 ml de soro fetal bovino (FBS). A seguir, foi centrifugada por 15 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspenso em 10 ml de D-MEM-LG com 10% do volume de FBS. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 3 dias consecutivos e depois a cada 2 dias até que as células aderidas ao plástico atingiram a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. As células foram retiradas da garrafa por adição de uma solução de tripsina a 0,05% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e expandidas até a 4ª passagem da cultura, quando eram caracterizadas como células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (Esquema 1).



Esquema 1. Obtenção de células-tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo

3.3. Citometria de Fluxo

Após a purificação e expansão das células mesenquimais indiferenciadas estas foram caracterizadas fenotipicamente por meio de citometria de fluxo empregando um conjunto de anticorpos monoclonais específicos. Foram utilizados os anticorpos CD 90 (Thy-1), CD105 (SH-2/endoglina), CD73 (SH3/SH4) e Stro-1 que correspondem aos antígenos de superfície expressos pelas células mesenquimais e os não expressos como CD34, CD45, CD14 e CD31 também serão utilizados.

Foram utilizadas 10^5 células diluídas em 100µl de PBS e 5 µl de anticorpo especifico em cada reação de marcação. Esta mistura foi mantida a 4ºC por 30 minutos e protegida da luz. As células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS por meio de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos e fixadas em 500 µl de paraformaldeído 1%. Foram mantidas em geladeira até o momento da aquisição.

Os controles foram realizados a partir de amostras de células sem marcação para verificação de auto-fluorescência e células marcadas com isotipos controles correspondentes para verificação de marcação inespecífica. Foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur e a análise dos dados foi realizada utilizando o programa CellQuest.

3.4. Diferenciação em linhagem mesodérmicas

Para comprovar obtenção de células-tronco mesenquimais, as células obtidas pelos procedimentos acima foram submetidas a três diferenciações: adipogênica, osteogênica e condrogênica. A diferenciação foi feita após a quarta passagem, substituindo o meio de cultura de crescimento (DMEM-LG/ 10% FSB) pelos meios indutores descrita na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Meios e suplementos para indução de adipogênese, osteogênese e condrogênese.

Diferenciação	**Meio**	**Suplementos**
Adipogênese	DMEM Alta Concentração de Glicose 10%FSB	Dexametasona – $5x10^{-6}$ M 3-isobutil- metilxantina – $4,5x10^{-4}$ M Insulina – 5ug/ml Indometacina – $3x10^{-4}$ M
Osteogênese	DMEM Baixa Concentração de Glicose 10%FSB	Dexametasona – $5x10^{-6}$ M Ácido Ascórbico – $2,8x10^{-4}$ M β-glicerol-fosfato – 10^{-2} M
Condrogênese	DMEM Baixa Concentração de Glicose 10%FSB	Ácido Ascórbico – 50 ug/ml TGF β3– 25ng/ml Insulina – 6,25ug/ml Dexametasona –1mM Albumina Humana- L-prolina 0,4mM

– **Diferenciação osteogênica**: as células-tronco mesenquimais foram cultivadas no meio de indução por três semanas e sua diferenciação foi avaliada pela coloração com Alzarin Red S.

– **Diferenciação adipogênica**: as células-tronco mesenquimais foram cultivadas no meio de indução por duas semanas e foram submetidas à coloração por Oil Red.

– **Diferenciação condrogênica**: as células-tronco mesenquimais foram cultivadas em meio de indução e após 3 semanas foram avaliadas pela coloração com Azul de toluidina.

3.5. Citoquímica das Células Mesenquimais Diferenciadas

A análise citoquímica das células mesenquimais diferenciadas foi realizada por meio da marcação com corantes celulares específicos e observação por microscopia óptica convencional.

Para a diferenciação adipogênica, as de células foram coletadas, fixadas com uma solução de formaldeído 1X durante 30 minutos e coradas com uma solução de Oil Red O a 0,3% durante 20 minutos e contracoradas com hematoxilina. O Oil Red O permite a visualização de acúmulo intracelular de lipídeos.

Para a diferenciação osteogênica, as celulas coletadas foram fixadas em etanol 50% durante 15 minutos a 4ºC e coradas com uma solução de Alizarin Red S 1% sob agitação constante por 45 minutos. O corante permite observar a calcificação na matriz extracelular.

Células submetidas à diferenciação condrogênica foram coletadas e marcadas com Azul de Toluidina a 1%. Após a retirada do corante as células ficarão expostas à temperatura ambiente por 2 horas e fixadas durante 1 minuto em soluções de etanol 70%, 90% e 100% respectivamente. Este tipo de marcação permitiu a visualização de uma matriz extracelular rica em proteoglicanos.

3.6. Imunocitoquímica e Microscopia confocal

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, foram realizados o bloqueio e a permeabilização celular com uma solução 3% de BSA e 0,1% de Triton 100x . Os anticorpos primário anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD105 foram diluídos para 10 μg/mL em solução 1% de BSA e incubados com as células, em câmara úmida a 4oC, durante 18 horas. As lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas utilizando-se meio para evidência de fluorescência (ProLong® Gold com DAPI, da Molecular Probes).

As lâminas foram analisadas por rastreamento em um laser LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 40x em óleo de imersão. Em todos os experimentos foram realizados controles negativos, somente com anticorpo secundário, os quais não apresentaram fluorescência.

3.7. Extração do RNA total para estudo de fatores imunomoduladores e neur tróficos

As células-tronco mesenquimais foram retiradas durante a cultura celular, submetidas a extração de RNA com o kit Mini RNA Isolation (GE Healthcare TM). A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) em espectofotômetro (Nano Drop Spectrophotometer, ND-1000 ®) com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e este normalmente variou entre 1,6 e 1,8.

3.7.1. Tratamento do RNA total com DNAse I

Com o objetivo de eliminar uma possíveis contaminações do RNA com DNA genômico, o RNA total foi tratado com DNAse livre de RNAse 1 U/µL (Life Techologies), utilizando-se 1 U da enzima para tratar 5 µg de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65ºC.

3.7.2. Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 5 µg de RNA e tratadas com DNAse I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20 µL (Life Techologies). A reação foi iniciada adicionando aos 5 µg de RNA tratado 1 µL de oligonucleotídeo (dT) 500 µg/mL e 1µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65ºC, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 µL do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl2 e 0,1 M DTT, e 200 U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos à 42ºC. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70ºC e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37ºC. As amostras de cDNA foram quantificadas através de espectrofotometria (Nano Drop Spectrophotometer (ND-1000 ®) com comprimento de onda equivalente a 260 nm.

Como controle da transcrição em cDNA foi realizado uma PCR para o gene β2–microglobulina. A PCR para amplificação de β2–microglobulina foi realizada para um volume final de 50 µL de reação que contém: 1,5 µL do cDNA síntetizado, 5 µl de tampão de reação, 3 µL MgCl2 50 mM, 2,5 unidades de Taq polimerase e 200 nM de cada iniciador. Foi realizado um controle negativo, sem adição de cDNA. As sequências dos iniciadores de β2–microglobulina utilizados foram: FW: ATGTCTCG CTCCGTGGCCTTAGCT; RV: CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC. O programa foi composto de 5 minutos de desnaturação à 94ºC, seguido por 35 ciclos de 40 segundos à 94ºC, 40 segundos à 55ºC e 40 segundos à 72ºC, com uma fase final de 72ºC por 7 minutos; os fragmentos resultantes contém 300 pb e foram visualizadas em luz ultravioleta em gel de agarose 2% (Figura 14).

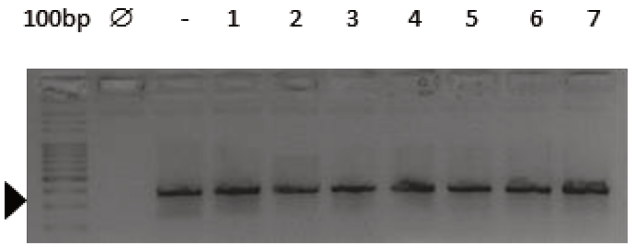


Figura 14. Produtos resultantes da PCR para amplificação de β2 –microglobulina visualizados em gel de agarose. 100bp: marcador de peso moledular 100 pb, (-): controle negativo, 1 – 7: produtos da amplificação das amostras de cDNA amplificados. As setas indicam a presença da banda de 300pb correspondente ao produto amplificado de β2 – microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida.

3.7.3. Desenho de oligos iniciadores

Os oligos iniciadores para amplificação dos genes específicos foram desenhados com dois programas diferentes. Primeiramente, o programa PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os iniciadores com uma temperatura de anelamento de 65°C e tamanho dos produtos entre 100 e 150 pares de bases. Posteriormente, o programa Gene Runner Version 3.5 (Hastings software®) foi utilizado para checar a ausência de estruturas que podem ser formadas dentro do iniciador ou entre os iniciadores sense e anti-sense, como dímeros ou alças, que podem diminuir a eficiência da reação.

Com o objetivo de evitar amplificação de possível DNA contaminante presente nas amostras, os iniciadores da fita sense e anti-sense foram desenhados em éxons diferentes sempre que possível. Para a delimitação de éxons e íntrons utilizou-se o progama BLAT (http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat).

Todos os pares de oligos iniciadores desenhados foram então analisados com o programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para certificação de que eles não amplificariam produtos inespecíficos. As sequências dos iniciadores utilizados neste estudo estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de iniciadores desenhados para avaliação dos fatores e citocinas liberados pelas AT-MSC.

Gene	Sequencia
BDNF	sense: 5' GGGCAAACACTGCATGTCTCTGGT 3' anti-sense: 5' TCCAGGCCATTCTGCAGGGTCA 3'
GDNF	sense: 5' CGCCCTTCGCGCTGAGCA 3' anti-sense: 5' CGCTCTCTTCTAGGAAGCACTGCCA 3'
TGF-β1	sense: 5' GCGTGCTAATGGTGGAAACC 3' anti-sense: 5' GCTTCTCGGAGCTCTGATGTG 3'
HGF	sense: 5' TGACTCCGAACAGGATTCTTTCA 3' anti-sense: 5' GCAGGGCTGGCAGGAGTT 3'
IDO1	sense: 5' TTGGAGAAAGCCCTTCAAGTG 3' anti-sense: 5' TGCCTT TCCAGCCAGACA A 3'
IL-10	sense: 5' GCTGAGAACCAAGACCCAGA 3' anti-sense: 5' AAATCGATGACAGCGCGGT 3'
Nestina	sense: 5' TCC CCCATTTACATGCTGTGA 3' anti-sense: 5' TGGCTCAGAGGAAGAGTCTGA 3'
B2-Microglobulina	sense: 5' ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT 3' anti-sense: 5' CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC 3'

3.8. Ensaio de proliferação de Linfocito T submetidos a estimulo especifico

Os ratos foram imunizados por via subcutânea com 50 µg da proteína básica de mielina (MBP- myelin basic protein) em 100µl de PBS por animal, em emulsão com igual volume de Adjuvante Completo de Freund enriquecido com 300µg Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco, Detroit, MI, USA), inoculado nas patas traseiras. Os animais imunizados com neuro-antígeno tiveram os linfonodos poplíteos e inguinais removidos. A concentração celular foi ajustada para $2x10^5$ por poço em placa de 96 poços e cultivadas com RPMI 1% soro de rato e 1% gentamicina e 10ug/ml de MBP por 2 dias e meio, na presença do neuro-antígeno. Após

esse tempo, 50% do meio foi removido e foi acrescentado meio de crescimento: RPMI 10% soro bovino fetal, 400UI/mL de IL-2 (proleukin) e sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados com Con-A(Sigma). As células foram cultivadas por mais 5 dias e então foi feito o primeiro reestimulo. Foram adicionadas APCs provenientes do timo, previamente irradiadas, o antígeno e as células foram cultivadas por mais sete dias. Esse ciclo se repetiu até o terceiro reestimulo. Os linfócitos foram contados e adicionados na quantidade total de $1x10^6$ células em cada poço da placa com APCs provenientes do timo e antígeno. A cultura ocorreu na presença ou ausência de AT-MSC de três amostras de diferentes pacientes (figura 15). Após três dias de cultura, os linfócitos foram coradas com Azul de Tripan e contadas na TC10 automated cell counter (BioRad, USA). Os resultados são mostrados em numero de células por mililitro.

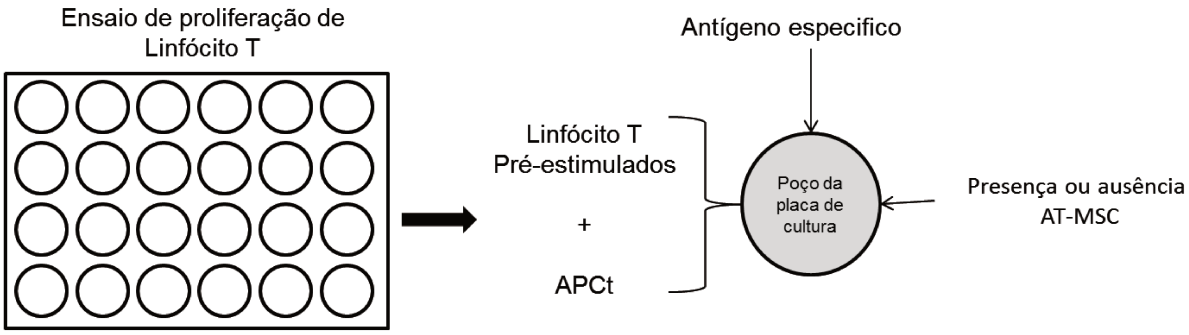


Figura 15. Esquema do experimento de Proliferação de linfócitos T sob estimulo especifico com e sem AT-MSC

3.9. Marcação para rastreamento celular *in vivo*

Para rastreamento das AT-MSC *in vivo* as células foram marcadas com o Qtracker Cell Labeling Kit (Invitrogen).

As células foram submetidas a ação de tripsina(Gibco) e suspendidas em meio de cultura normal (DMEM-LG / 10% SFB) e contadas. O protocolo a partir deste ponto segue o manual do produto. Sucintamente, prepara-se uma solução de marcação 10nM, misturando 1µl do componente A e do B (Kit) à temperatura ambiente por 5 minutos. Adiciona-se 0,2ml de meio de cultura de crescimento (DMEM-LG / 10% SFB) e mistura-os sob agitação vigorosa por 30 segundos. A solução contendo $1x10^6$ células é adicionada a solução de marcação, é levemente agitada e é incubada a 37°C por 45-60 min. Durante esse período, a solução foi levemente agitada a cada 5-10min. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com meio de cultura de crescimento e submetidas a teste *in vitro* de permanência da marcação,

durante as gerações posteriores (figuras 16 e 17) ou foram lavadas com PBS para posteriormente serem injetadas no animal.

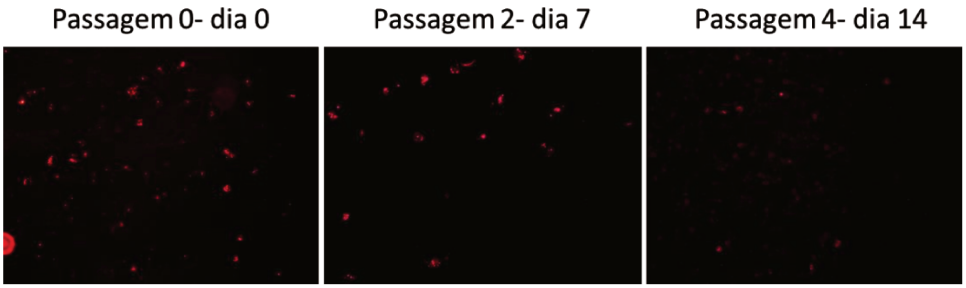


Figura 16. Marcação das AT-MSC nas 4 passagens em 14 dias. A marcação está presente, embora não seja tão forte quanto nas primeiras passagens. A divisão celular diminui a quantidade de qdot presente nas células.

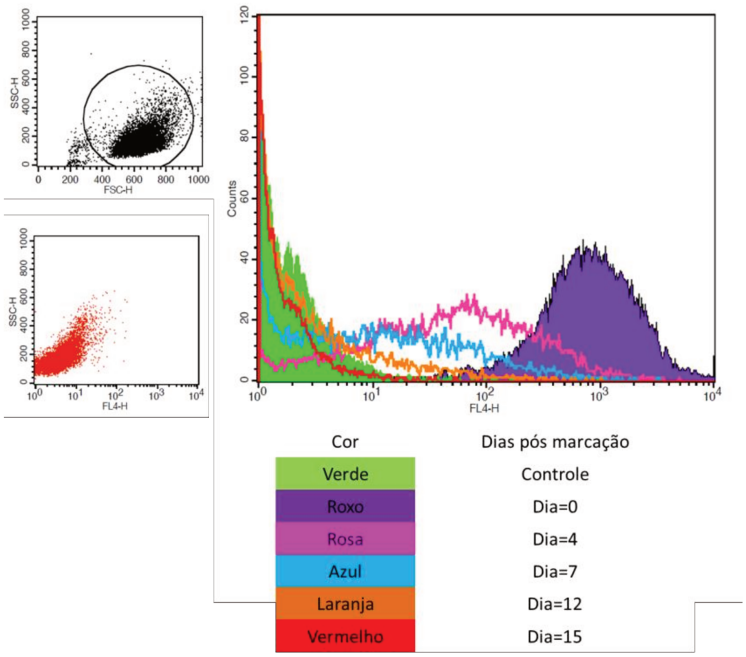


Figura 17. Citometria de fluxo das AT-MSC marcadas. Era esperado que houvesse redução da marcação nas células em função da divisão celular. Este resultado corrobora com as imagens de fluorescência em que é observada também a redução de células marcadas, mas é possível identificar as células até 15 dias, duração do experimento animal. ANA LEDA

3.10. Procedimentos *in vivo*

Neste estudo, foram utilizados ratos fêmeas da linhagem LEWIS/H com 6-8 semanas, obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

Todos os animais analisados tiveram as raízes nervosas ventrais na região da intumescência lombar do lado direito avulsionadas (n=5/grupo). O lado não avulsionado de cada animal foi utilizado como controle para a análise dos resultados. Os seguintes grupos experimentais foram constituídos:

i. Avulsão de raízes motoras

ii. Avulsão de raízes motoras e injeção de PBS

3.10.1. Comitê de ética

Os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética em experimentação animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA – IB – Unicamp, protocolo número 2543-1.

3.10.2. Avulsão das raízes motoras

Os animais foram anestesiados (60mg/Kg de quetamina e 10mg/Kg de xilasina) e tricotomizados. Com o auxilio de uma lupa cirúrgica, foi feita uma incisão paramediana dorsal. A musculatura eretora da coluna vertebral foi então removida para a exposição das vértebras torácicas. Foi feita a laminectomia de aproximadamente três vértebras para que a intumescência lombar fosse exposta. A dura máter foi seccionada longitudinalmente e as raízes dorsais e ventrais localizadas e identificadas. O procedimento de avulsão foi realizado nas raízes nervosas ventrais do lado direito com o auxílio de uma pinça tipo relojoeiro (nº 4), sendo três raízes avulsionadas (L4, L5 e L6). Encerrados os procedimentos cirúrgicos, a musculatura e a pele foram suturadas e os animais mantidos em biotério por um período de 2 semanas.

3.10.3. Transplante e rastreamento das células tronco mesenquimais

As CTM foram colocadas diretamente no funículo lateral do lado lesionado (ipsilateral) nos segmentos L4, L5 e L6 da medula espinal com o auxílio de uma pipeta Pasteur de espessura capilar acoplada a uma seringa de Hamilton instantes após a avulsão das raízes ventrais. Foram injetadas $3x10^5$ células distribuídas em três pontos eqüidistantes ao longo dos segmentos lesionados. Para as análises da plasticidade sináptica, da astrogliose reativa e microgliose, as

AT-MSC foram marcadas momentos antes do transplante com Qtracker 655 (Invitrogen), um marcador fluorescente estável.

3.10.4. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes

Todos os animais foram anestesiados (60mg/Kg de quetamina e 10mg/Kg de xilasina) e submetidos à toracotomia e perfusão trans-cardíaca (n=5 animais para cada grupo experimental) com o auxílio de uma bomba peristáltica e solução salina tamponada, tendo o objetivo de reduzir a contaminação do tecido com sangue. Para ambos os estudos, grupos de animais foram sacrificados duas semanas após o procedimento cirúrgico.

3.10.5. Estudo da sobrevivência neuronal e para imunohistoquímica

Após perfusão com salina tamponada, os animais já sacrificados foram perfundidos com formaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M; pH 7,38. O conjunto contendo a intumescência lombar e raízes nervosas foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas e, posteriormente, criopreservados. Os espécimes foram incluídos em meio de congelamento (Tissue Tek - Miles Inc., USA) e congelados a –37oC. Cortes histológicos com 12µm de espessura foram obtidos em criostato (Mícron M505) e posteriormente analisados.

3.10.6. Sobrevivência neuronal

Cortes congelados alternados de cada espécime foram corados por cresil violeta, marcação especifica de DNA e portanto marca o núcleo dos neurônios. A contagem dos motoneurônios foi feita no núcleo motor lateral do corno anterior da medula espinal do lado ipsilateral (lesionado) e contralateral (não lesionado) em vinte secções, ao longo da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 48µm. Apenas as células com núcleo visíveis foram contadas. Para corrigir contagens duplas de neurônios devido ao fato de um mesmo núcleo poder estar presente em duas secções, foi utilizada a fórmula de Abercrombie (Abercrombie & Johnson, 1946):

$$N=nt/(t+d)$$

onde N é o valor corrigido de neurônios, n é o número de células contadas, t é a espessura entre uma secção e outra (48 µm) e d é o diâmetro médio do núcleo (20µm). O diâmetro médio do núcleo foi calculado a partir de 30 neurônios distribuídos aleatoriamente em 3 secções

representativas diferentes ao longo da intumescência lombar. A porcentagem de sobrevivência neuronal foi determinada, sendo esta definida como a razão percentual entre o número de motoneurônios ipsilateral e contralateral para cada grupo.

3.10.7. Imunofluorescência

Cada lâmina foi lavada com PBS por 5 minutos para retirada do meio de congelamento. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito por uma hora com solução contendo 3% de BSA e 0,25% de Triton-X 100. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em uma solução contendo 1% de BSA, 0,1% de Triton-X 100 e o anticorpo primário por 18 horas (*over-night*) a 4 ^{0}C. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 0,1M (5 minutos cada lavagem) e incubadas com o anticorpo secundário adequado por 1 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 0,1M (5 minutos cada lavagem). As análises foram feitas por microscopia de fluorescência e as duplas marcações foram feitas pela sobreposição de imagens individuais obtidas no canal específico de cada fluorocromo.

As análises imunohistoquímicas foram feitas com os objetivos de:

a) Detectar e quantificar a cobertura sináptica: foi utilizado o anticorpo primário antisinaptofisina (1:200, Dako), sendo esta proteína encontrada no interior de todos os terminais sinápticos ativos. O anticorpo primário foi detectado através de um conjugado a cianina-2 (Cy-2, 1:250, Jackson). Análise realizada 2 e 6 semanas póstransplante

b) Detectar e quantificar a astrogliose reativa: foi utilizado o anticorpo primário anti-GFAP (1:100, Abcam), sendo que esta proteína tem sua expressão aumentada após inúmeros tipos de lesões do SN. O anticorpo primário foi detectado através de um secundário conjugado a Alexa 488 (1:400, Molecular Probes). Análise realizada duas semanas pós-transplante.

c) Detectar e quantificar a microgliose reativa: foi utilizado o anticorpo primário anti-anti-Iba-1 (1:600, Wako), sendo que esta proteína tem sua expressão aumentada após inúmeros tipos de lesões do SN. O anticorpo primário foi detectado através de um secundário conjugado a Alexa 488 (1:400, Molecular Probes). Análise realizada duas semanas pós-transplante.

c) Detectar ação de Linfócitos T CD3: foi utilizado o anticorpo anti-CD3 PE (1:200, Santa Cruz), já que sua presença em tecidos inflamados é descrita na literatura. Análise foi realizada duas semanas pós-transplante e n=3.

As fotos de cada lâmina foram realizadas no Microscópio de varredura à laser confocal da Zeiss (LSM-510). Foram feitas analises utilizando o software LSM Image Examiner Software Release 3.2 para analise de intensidade de pixel.

3.10.8. Análise quantitativa da cobertura sináptica, da astrogliose reativa e microgliose reativa detectadas pela imunohistoquímica

Para a quantificação, foram selecionadas três a quatro imagens representativas do lado ipsilateral e três a quatro imagens do lado contralateral à lesão de cada animal de todos os grupos. A densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcação das proteínas foi medida na imagem inteira, de acordo com De Freria e colegas (2012), utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A proporção de densidade integrada de pixels (lado ipsilateral/lado contralateral) foi calculada para cada animal e então estabelecida a média das proporções para cada grupo ± desvio padrão.

Também foi realizada análise de intensidade de pixel das fotos pelo software LSM Image Examiner Software Release 3.2.

3.10.9. Análise estatística

Os resultados numéricos foram submetidos à análise estatística descritiva e de variância. Para a comparação desses valores entre os grupos experimentais foi utilizado o teste U de Mann Whitney para dados não-paramétricos com nível de significância de $p<0,05$(*), $p<0,01$ (**) e $p<0,001$ (***).

4. Resultados

4.1. Caracterização das células mesenquimais obtidas de tecido adiposo (AT-MSC)

Para a obtenção de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo foi necessário padronizar o método de separação celular, expansão e caracterização destas células. Em análise de proliferação com BrdU (resultado não demonstrado), observou-se que as células obtidas de pacientes obesos apresentava uma taxa de proliferação bem menor (passagem celular a cada 10-14 dias) do que as de pacientes não obesos (a cada 4-7 dias). Desta forma, todos os pacientes obesos e ex-obesos foram excluídos do estudo.

Após os procedimentos de digestão por colagenase e centrifugação, as células foram colocadas em cultura (DMEN/10%.SFB). Observou-se uma diversidade de populações celulares com predominância de hemácias e células pequenas, arredondadas, não aderidas ao frasco de cultivo. Nos três dias posteriores, realizou-se a lavagem da cultura com PBS com a finalidade de manter as células aderidas (primeira característica da população de células-tronco mesenquimais). A partir do terceiro dia, já era possível observar células aderidas na placa de cultura com morfologia fusiforme semelhante a de fibroblasto.

4.1.1. Morfologia e aderência das AT-MSC em placa de cultura

Na terceira passagem, foi possível observar uma população homogênea com morfologia fibroblástica, citoplasma extenso e achatado e prolongamentos não ramificados (figura 18A). Essas células expressam, em suas membranas e em seu citoplasma, marcadores de células-tronco mesenquimais (CD105, CD90 e CD73), confirmados pela análise de microscopia de fluorescência(figura 18 B,C e D). A expressão de CD90 foi confirmada na membrana celular e em vesículas citoplasmáticas, enquanto CD105 e CD73 estavam expressos na superfície celular. As células mantiveram seu fenótipo estável mesmo até 10 passagens em cultura (resultado não demonstrado).

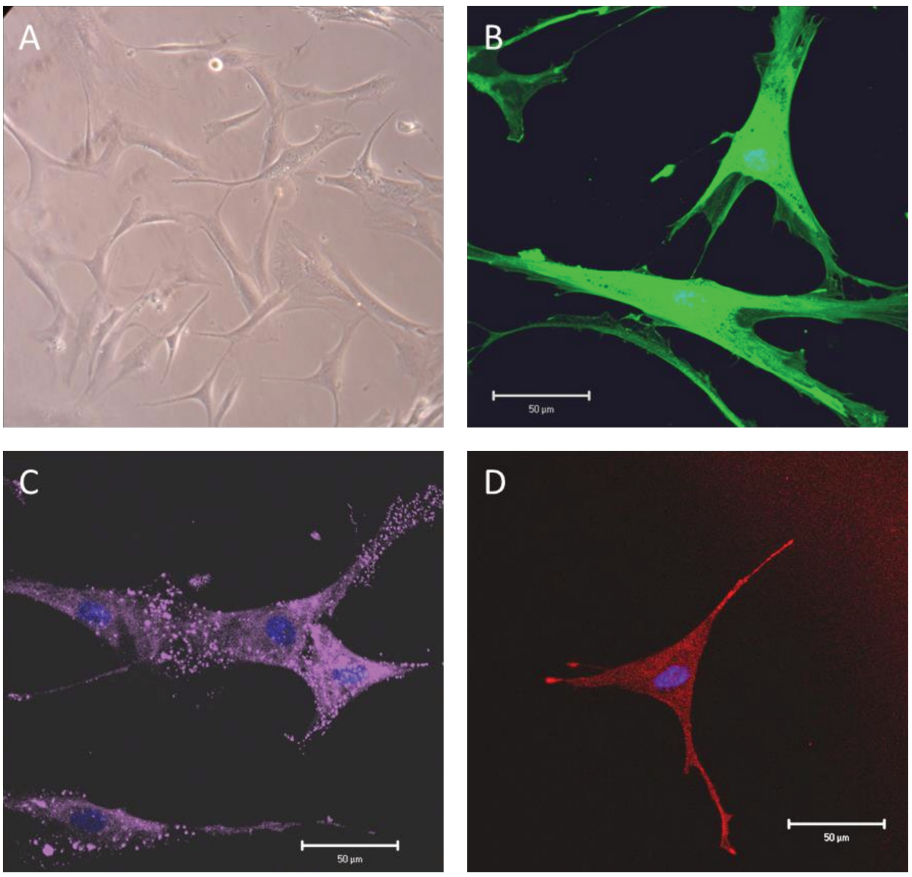


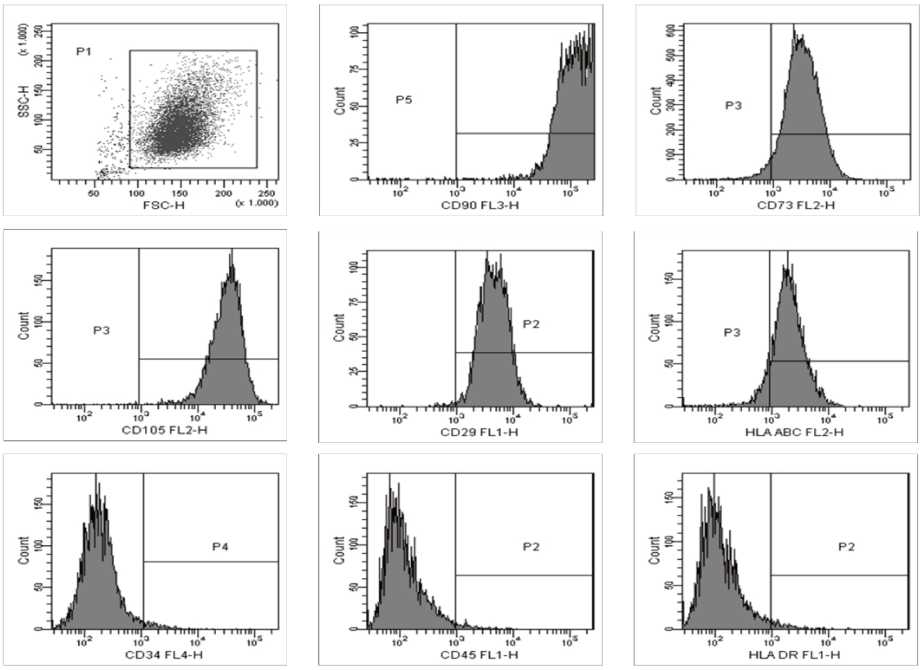
Figura 18. Microscopia optica e de imunofluorescência de AT-MSC na quarta passagem. A) foto de microscopia optica com aumento de 10x. B-D) Imunocitoquímica das AT-MSC dos marcadores CD73(verde), CD90 (roxo), CD105 (vermelho) e nuclear(DAPI) em aumento de 40x.

4.1.2. Caracterização das moléculas de superfície celular

A caracterização dos antígenos de superfície das AT-MSC obtida é fundamental e realizada por citometria de fluxo utilizando um painel de anticorpos. Para cada amostra de células obtida dos pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP (n=7) foram realizadas análises dos marcadores celulares conforme descrito anteriormente. As células analisadas neste estudo apresentaram homogeneidade quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e possuíam o mesmo perfil de expressão dos marcadores descrita; CD90 (99,60% ±0,25), CD105 (99 , 61%), CD73 (97,85%±3,71), CD29 (99,52%±2,27) e HLA-ABC (94,03%±1,45), sendo que o marcador CD90 apresentou marcação mais intensa em todos os experimentos, enquanto os marcadores CD34 (0,85%±0,31), CD45 (2.31%±2,79) e HLA-DR (0.96%±0,95) mostraram baixa expressão (figura 19). Assim, a caracterização dessas células com os marcadores

específicos definiu a população obtida do tecido adiposo como uma população de células-tronco mesenquimais.

A



B

Marcadores	Média(n=7)	Desvio
CD90	99,60%	± 0,25
CD73	97,85 %	± 3,71
CD105	99,61 %	± 0,59
CD29	84,11 %	± 2,27
HLA-ABC	94,03 %	± 1,45
CD34	0,85 %	± 0,31
CD45	2,31 %	± 2,79
HLA-DR	0,97 %	± 0,95

Figura 19. Citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais após a quarta passagem. A) Dot-Plot das células, mostrando característica homogênea dessa população e painel de histogramas dos marcadores de superfície celular. As AT-MSC possuem expressão dos marcadores CD105, CD90, CD29, CD73 e HLA-ABC e ausência de expressão de HLA-DR, CD45, e CD34. B) Tabela com as médias das porcentagens dos marcadores celulares positivos e negativos (n=7).

4.1.3. Capacidade de diferenciação das AT-MSC em linhagens mesodérmicas

O ultimo atributo fundamental para definir a população de células-tronco mesenquimal é a capacidade de diferenciação em pelo menos 3 tipos celulares mesodermais ou verificação da multipotência. Para isso, protocolos de diferenciação foram padronizados no laboratório e foram realizados após a caracterização por citometria de fluxo.

4.1.3.1. Diferenciação Osteogênica

O processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais para a linhagem osteogênica foi evidenciado com a coloração Alzarin Red S que cora em vermelho os depósitos de cálcio e outros minerais. Como podemos observar na Figura 20B, encontram-se regiões avermelhadas em volta das células diferenciadas, as quais supõem-se que sejam depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. Outra característica marcante é a mudança de morfologia, pois as células fibroblásticas alteram seu formato para células alongadas e alinhadas, recobrindo toda placa de cultura e em alguns lugares formando aglomerados celulares.

4.1.3.2. Diferenciação Adipogênica

Após a diferenciação adipogênica, as células-tronco mesenquimais apresentaram coloração vermelha citoplasmática em pequenas vesículas quando submetidas à coloração com Oil Red. A propriedade desse corante de interagir com lipídeos e triglicerídeos neutros mostra uma coloração vermelha que evidencia o acúmulo dessas substâncias em vesículas citoplasmáticas das células diferenciadas. Como podemos observar na Figura 20C as células-tronco mesenquimais perderam sua morfologia fibroblástica e adquiriram uma morfologia redonda e com inúmeras vesículas, caracterizando o acúmulo de lipídeos.

4.1.3.3. Diferenciação Condrogênica

Após três semanas, as células-tronco mesenquimais induzidas para diferenciação condrogênica foram coradas com Alcian blue (Figura 20D). As células apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento do citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas. É possível observar uma coloração celular azulada devido à interação do corante com as glicosaminoglicanas expressas durante a diferenciação.

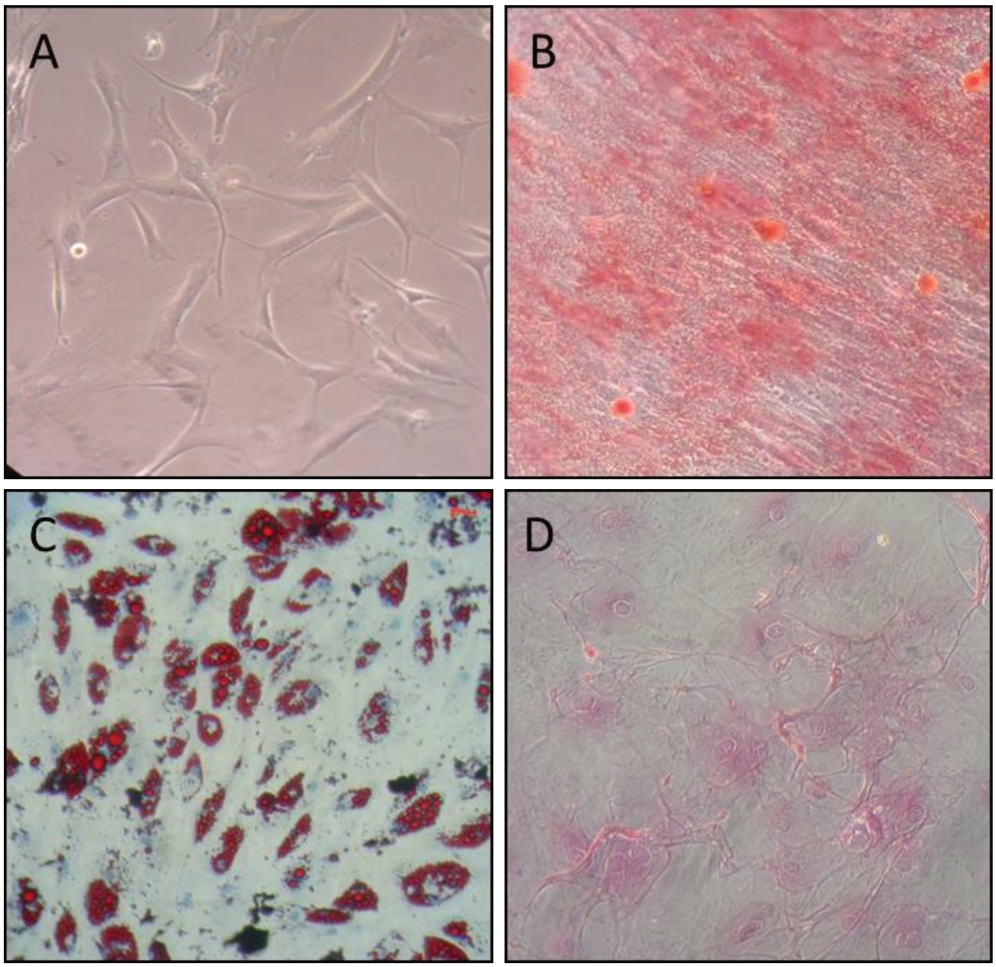


Figura 20. Microscopia optica de célula-tronco submetidas à diferenciação nas linhagens mesodermais em aumento de 10X. A) Célula apresenta morfologia de fibroblasto. B)As AT-MSC foram submetidas à diferenciação osteogênica. O depósito de cálcio foi revelado com a coloração com Alzarin Red S. C) Na diferenciação para linhagem adipogênica, o Oil Red O marcaram as vesículas de gorduras presentes no citoplasma celular. D) As fibras de colágeno e a produção de matriz proteoglicana são coradas por Alcian blue, indicando potencial das AT-MSC de diferenciação para linhagem condrogênica.

4.1.4. Marcação das AT-MSCs por Qtracker(Invitrogen)

A marcação das células foi padronizada para posterior uso em animais. Na figura 21, observa-se que o qdot655(vermelha) são pontos que emitem fluorescência na faixa 655. Em algumas células, é possível notar a concentração dessas partículas perto do núcleo(DAPI) de algumas células, mas, na grande maioria, estão presentes em todo o citoplasma (Actina marcada em verde). Por FACS, foi demonstrado que 98,9% das células submetidas a marcação possuem

qdot655 no citoplasma. Assim, antes da injeção das AT-MSC no modelo, as células estão marcadas para posterior rastreamento.

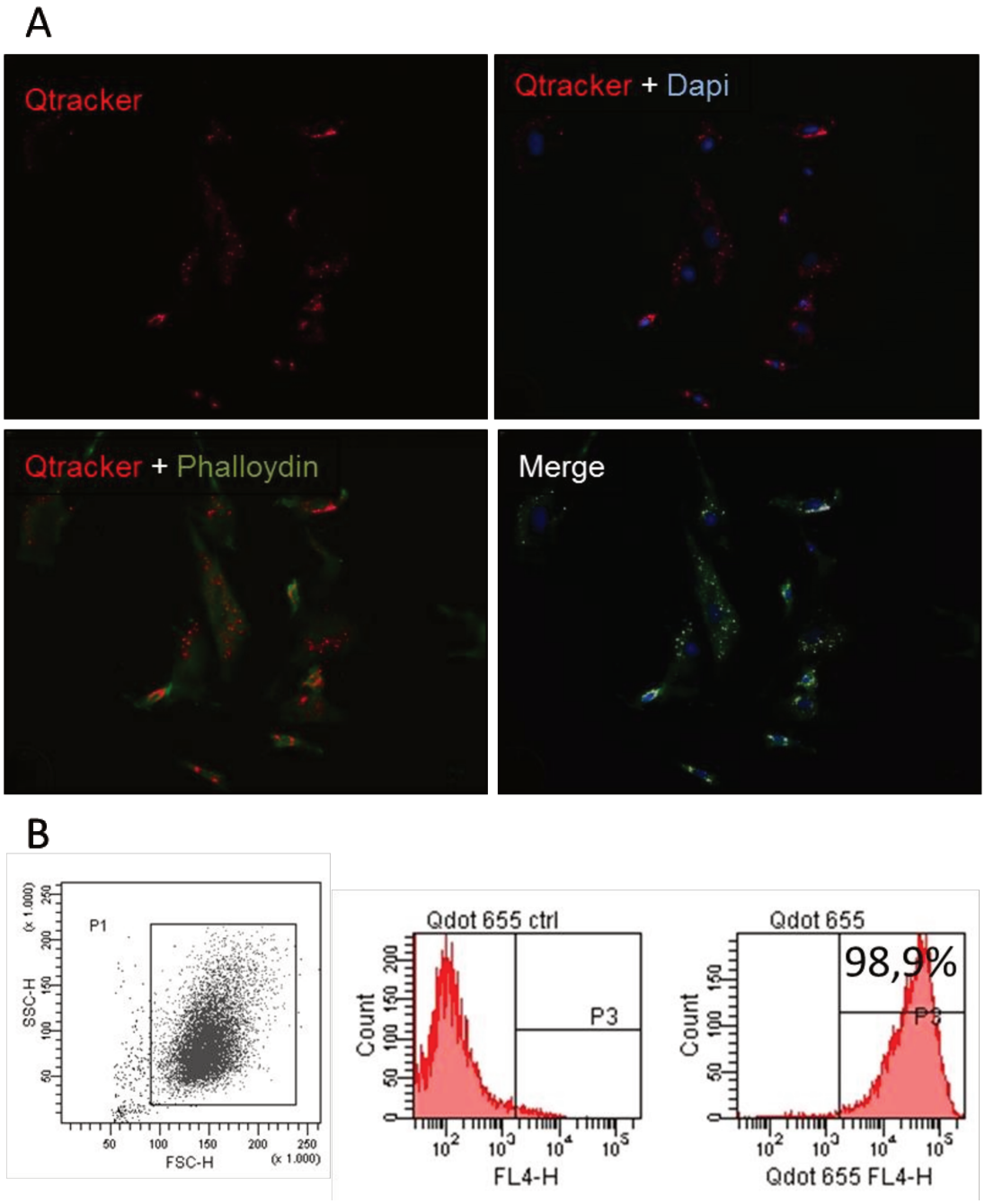


Figura 21. Marcação das AT-MSC com qdot655(invitrogen) e microscopia de fluorescência e citômetria de fluxo. A) A marcação de qdot(vermelho) esta presente no citoplasma(actina esta marcada com faloidina alexa flúor 488 - verde) e perto do núcleo celular(DAPI). verificou-se por FACS que 98,9% das células estavam marcadas com qdot655 (vermelho).

4.1.5. Expressão do RNAm dos genes BDNF, GDN, TGF-β1, HGF, IDO, IL-10, Nestina e β2-Microglobulina em AT-MSC

Para cada amostra de células(AT-MSC) obtidas dos doadores do Hospital das Clínicas da UNICAMP (n=7) foi realizada análise da expressão dos genes para fatores neurotróficos (GDNF e BDNF), fatores imunossupressores (TGF-β1, HGF, IDO e IL-10) e controles endógenos Nestina e β2-Microglobulina por RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) (figura 22).

Os transcritos dos genes controle demonstraram que as amostras possuem padrão de expressão semelhantes. Observou-se também que os transcritos dos fatores GDNF e BDNF são fortemente expressos, assim como os fatores imunossupressores TGF-B1 e HGF, demonstrando que a expressão desses genes segue um nível semelhante em todas as amostras celulares dos diferentes doadores de tecido lipoaspirado.

Contudo, os outros genes relacionados à imunossupressão, IDO e IL-10, apresentaram níveis de expressão variáveis entre as amostras dos doadores analisadas, sugerindo que todos os indivíduos analisados expressam esses genes, mas em diferentes níveis.

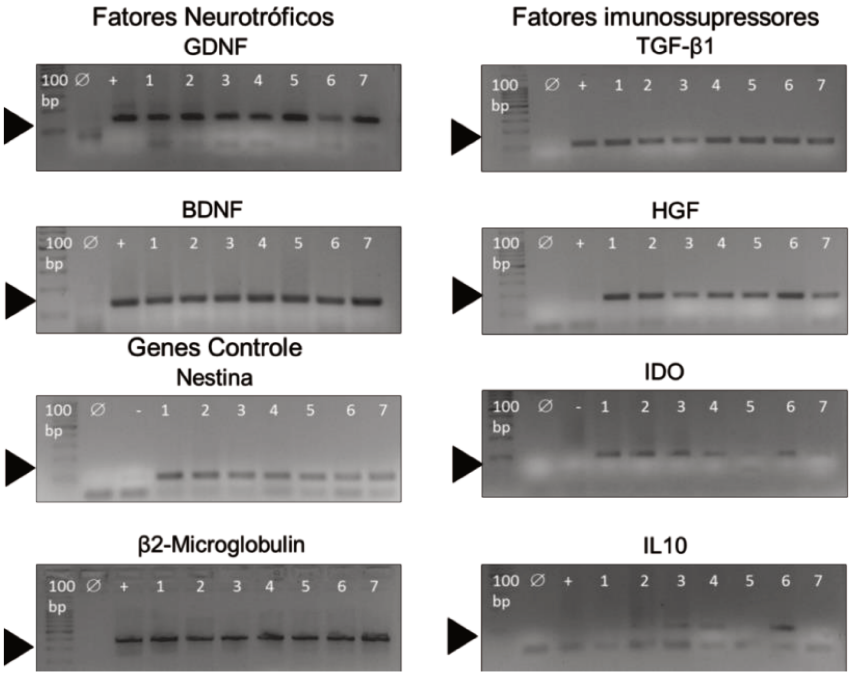


Figura 22. RT-PCR em gel de agarose de transcritos de fatores neurotróficos, fatores imunossupressores e genes de controle da reação. Os transcritos de Nestina, β2-Microglobulina, GDNF, BDNF, TGF- β1 e HGF possuem padrão de expressão em todas as amostras de AT-MSC, enquanto que os transcritos de IDO e IL-10 têm níveis de expressão diferente nas amostras.

4.1.6. Ação imunossupressora das AT-MSC em teste de proliferação *in vitro* de Linfócitos T

As AT-MSC humanas foram colocadas em duas concentrações diferentes: barra cinza ($6x10^4$celulas por poço- barra cinza) e barra branca ($1,2x10^5$ células por poço- barra branca) em cultura por dois dias. Após esses dias, adicionou-se 1x 10^6 Linfócitos T específico para proteína básica de mielina (MBP=myelin basic protein) e com células apresentadoras de antígenos (APCs) do timo (ambas as células de ratos Lewis) e a cultura prosseguiu por mais três dias. Na contagem do controle, que é a proliferação na ausência de AT-MSC, observou-se que a quantidade de linfócitos T atingiu aproximadamente $4x10^6$. A proliferação de linfócito T na cultura de $6x10^4$ AT-MSC (barra cinza) atingiu $2x10^6$($p<0,001$) e na concentração de $1,2x10^6$ AT-MSC (barra branca), a quantidade de linfócito T chegou a $1,5X10^6$($p<0,001$)(figura 23). Ou seja, em ambas as concentrações houve redução da proliferação de linfócitos T. Ainda, quando comparada a taxa de proliferação entre as diferentes concentrações de AT-MSC, percebe-se que existe menor proliferação na maior concentração de células AT-MSC ($p<0.05$) Desta forma, está claro que existe efeito das AT-MSC humanas na proliferação de linfócito T de ratos submetidos a estímulo específico. Também observou-se que quanto maior a concentração de AT-MSC humanas, maior impacto ou efeito imunossupressor na proliferação de linfócito T de rato.

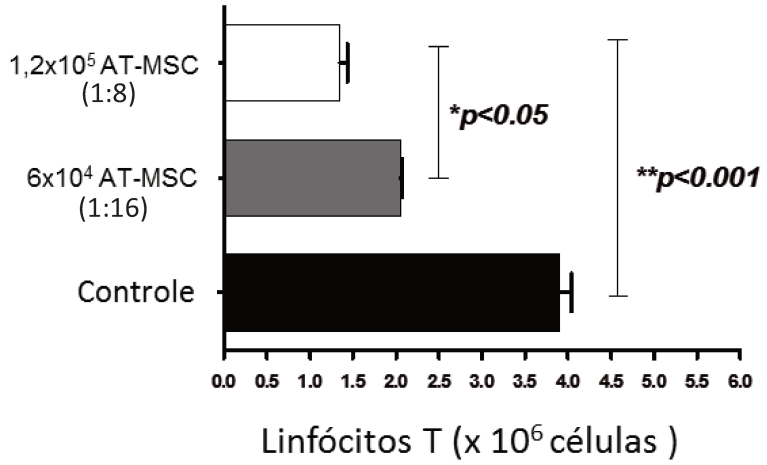


Figura 23. Os linfócitos T (1×10^6 células inicial) somado aos APCs do timo foram estimulados na presença do seu antígeno específico (barra preta). Duas concentrações diferentes de ADSC foram adicionadas a cultura. Em ambas as concentrações, $6x10^5$ (barra cinza) e 1,2 $x10^6$ (barra branca), houve uma redução significativa da resposta proliferativa dos linfócitos T específicos do MBP

4.2. Modelo Animal

4.2.1. Enxerto das AT-MSC em medula espinal de ratos

As AT-MSC foram anteriormente marcadas com qdot655 e injetadas no funículo lateral da medula espinal conforme o esquema da figura 24A. Após duas semanas, o animal foi sacrificado e cortes histológicos seriados da medula foram realizados. Em alguns cortes foi possível observar o sitio de injeção (figura 24B) na massa branca. Também foi possível encontrar um número significativo de células marcadas com qdot655 no sitio de injeção na região da massa branca e na região periférica da medula em tecido muscular, comprovando que as AT-MSC humanas sobreviveram por pelo menos duas semanas na medula de rato Lewis (Figura 24C). Ainda, não foi identificado AT-MSC na região da substância cinzenta, nem migração para áreas do entorno medular. As AT-MSC parecem ter permanecido próximas ao local da injeção.

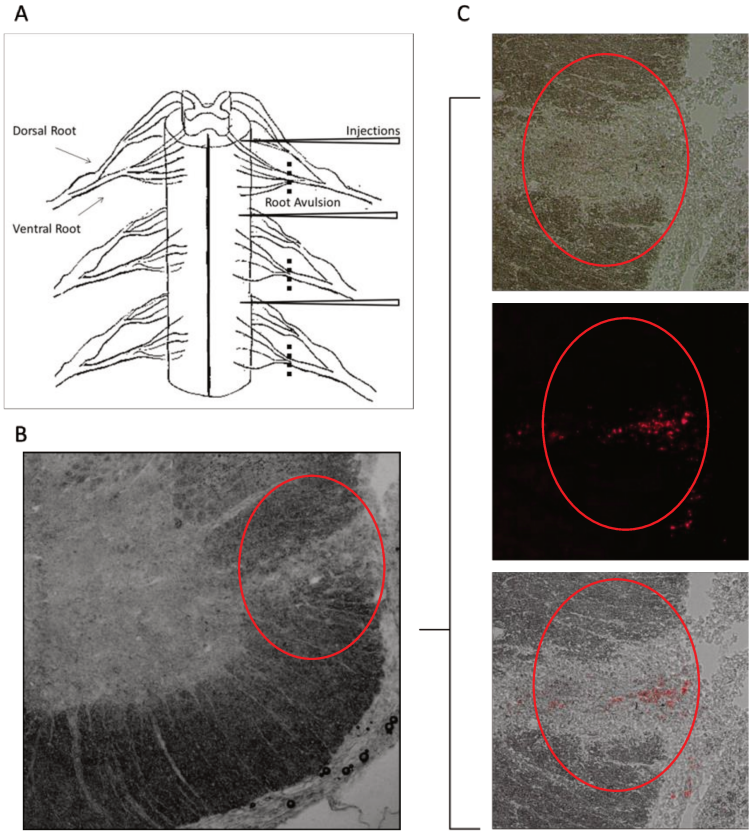


Figura 24. Ilustração esquemática da cirurgia e injeção das AT-MSC e foto de microscopia ótica e fluorescência da medula de animais tratados com AT-MSC. A) Esquema do procedimento da avulsão das raízes ventrais L4-L6 e a injeção das células. B) Medula de animal lesionado e o sítio de injeção na substancia branca da medula (5x) C) O sitio de injeção e a presença de AT-MSC marcadas com qdots na substancia branca, após 2 semanas da lesão.

4.2.2. Efeito imunossupressor das AT-MSC no modelo animal

Para analisar a capacidade das AT-MSC humanas atuarem no sistema animal, o experimento foi realizado com o objetivo de comprovar o experimento *in vitro* de proliferação de linfócito T e verificar se na região inflamada (lesão) há a presença de linfócito T, através de imunohistoquímica realizada com o anticorpo CD3. Verificou-se que a marcação de CD3 na região medular inflamada do rato é fracamente positiva em animais tratados com AT-MSC(Figura 25A). Contudo, em animais não tratados, observou-se que a marcação de CD3 está presente praticamente em toda a região ventral da medula, demonstrando que há a presença de Linf T na região afetada(figura 25B). Desta forma, as AT-MSC estão agindo no sistema imunológico do animal de forma supressora.

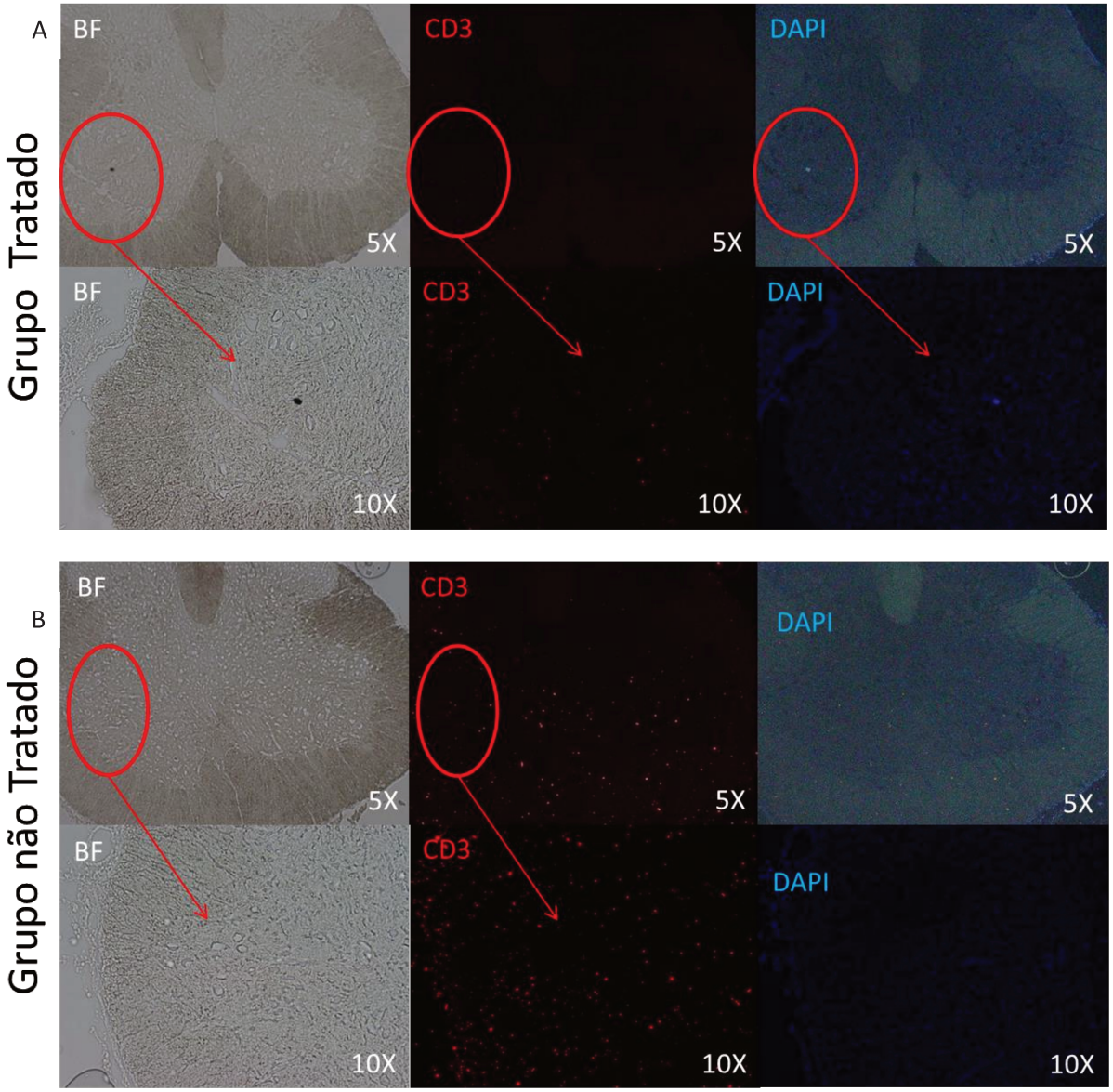


Figura 25. Microscopia optica e de fluorescência mostrando a secção transversal da medula espinal lesada e linfócitos T, marcadas com anti-CD3(vermelho) e DAPI(azul)(n=3) e aumento do lado ipslateral (lado da lesão). A) No grupo tratado, os Linf T CD3 são poucos frequentes no tecido nervoso na área da lesão devido a ação imunossupressora das AT-MSC. B) Na imagem da medula do grupo não tratado, percebemos maior presença de Linf T CD3, que já era esperado por se tratar de uma área inflamada.

4.2.3. Efeito neuroprotetor das AT-MSC sobre os motoneurônios

O efeito do tratamento com AT-MSC foi analisado determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal. A porcentagem é a razão percentual entre o número de motoneurônios

ipsilateral e contralateral para o período de sobrevida (duas semanas após a avulsão) (figura 7 – Azul de Cresil Violeta).

Não houve diferenças estatísticas no número absoluto de motoneurônios no lado contralateral(Figura 26C-D) à lesão nas diferentes condições experimentais (tratado 13,31 ± 1,74; não tratado 13,56 ± 2,38; valores médios absolutos por corte ± DP). Desta maneira, foi possível expressar a porcentagem de sobrevivência neuronal em relação ao lado contralateral nas diferentes situações experimentais.

Após duas semanas, há intensa degeneração dos motoneurônios lesados no núcleo motor dos animais dos grupos não tratados(figura 26B). Observou-se neurônios remanescentes picnóticos e com intensa cromatólise. Contudo, há a presença de vários neurônios no núcleo motor do grupo tratado. Há um número estatisticamente maior de neurônios sobreviventes, com sinais mais brandos de cromatólise (Figura 26A). Apesar do número de motoneurônios encontrado no lado ipsilateral ser menor que no lado contralateral, este número foi aproximadamente 50% maior que o número de neurônios encontrados no grupo não tratado. Calculou-se então a razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsilateral e contralateral, obtendo-se os seguintes resultados: tratado 56,25% ± 8,04; não tratado 36,66% ± 4,83 (média ± DP); p=0,0079. (Figura 26E).

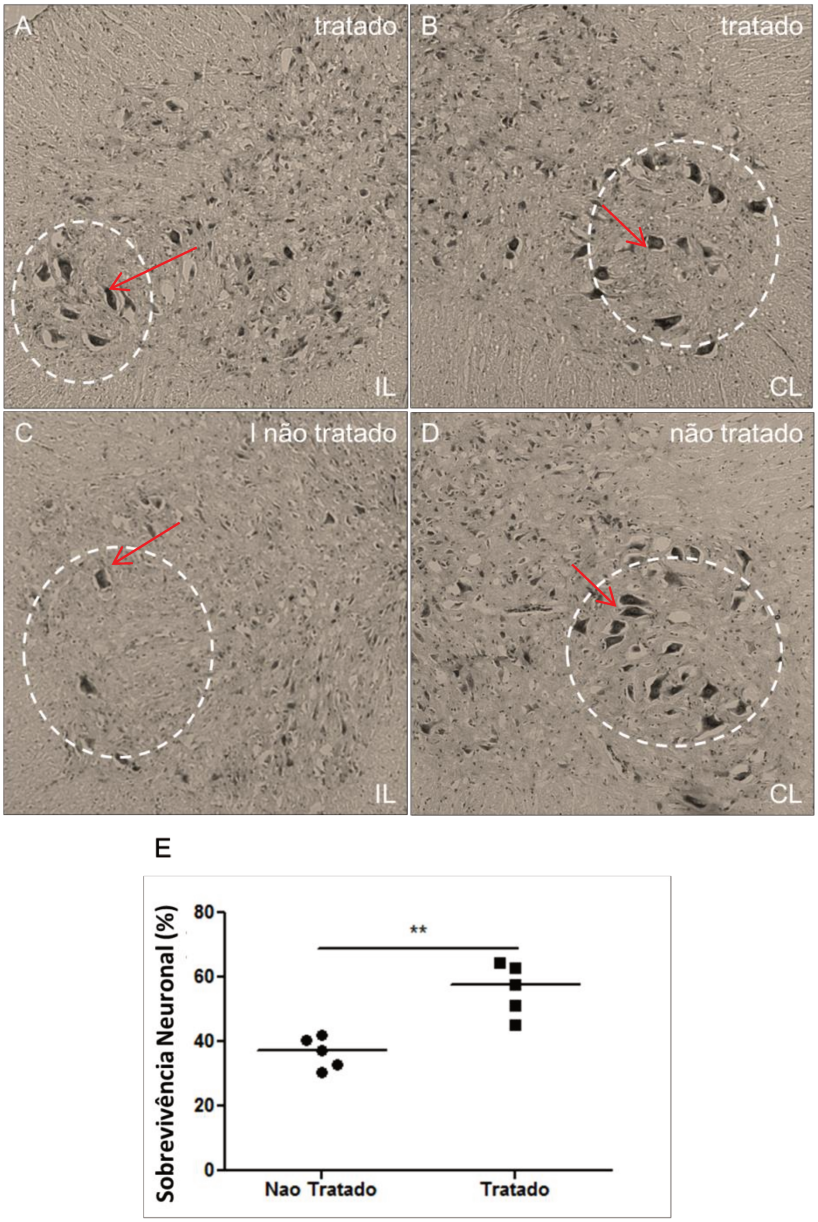


Figura 26. Efeito neuroprotetor das AT-MSC na sobrevivência neuronal. Corte histológicos corados com cresil violeta, evidencia núcleo dos motoneurônios (seta vermelha) na região demarcada (circulo branco) . A-C) Lado ipsilateral à lesão dos animais tratados e não tratados. Observa-se a presença de motoneurônios com grande corpo celular e em maior numero nos animais tratados. B-D) Lados contralateral a lesão dos animais tratados e não tratados. E) Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal após duas semanas da lesão das raízes motoras. Em que é possível observar que o tratamento resultou num aumento de sobrevivência neuronal de até 50% ($p<0,01$).

4.2.4. Efeitos das AT-MSC na atividade sináptica

Para avaliar as alterações na atividade sináptica após avulsão das raízes motoras e o tratamento com AT-MSC, foi feita uma análise imunohistoquímica da presença da proteína sinaptofisina no núcleo motor lateral da coluna ventral da medula espinal, duas semanas após a lesão. Há similaridade entre os lados contralaterais à lesão para a marcação com sinaptofisina em ambos os tempos analisados (figura 27 C e D). A marcação adjacente à superfície celular dos grandes motoneurônios que compõem o núcleo motor é bem definida. Há uma intensa reatividade nesta área, a qual é atribuída ao grande número de botões pré-sinápticos aos motoneurônios alfa (figura 27 G e H). Pela análise de intensidade de pixel, é possível confirmar que há integridade dos botões pré-sinápticos ao redor dos motoneurônios(figura 27 K e L).

Em contraste ao lado contralateral, a intensidade da expressão da sinaptofisina foi drasticamente reduzida na superfície dos motoneurônios axotomizados dos animais tratados e não tratados, indicando uma grande diminuição dos terminais em aposição a estes neurônios (figura 27 A e B). Também foi observada uma grande diferença na expressão de sinaptofisina entre o grupo tratado(Figura 27E) e o grupo não tratado(figura 27F). Nota-se que os neurônios avulsionados e tratados com as células tronco apresentaram menor redução de terminais em aposição ao corpo celular, resultado de uma possível diminuição do processo de eliminação sináptica. A análise pelo software revela que, no grupo tratado, há uma queda da integridade dos botões pré-sinápticos ao redor do motoneurônio, representado por ausência de marcação de sinaptofisina, embora haja regiões na superfície do neurônio em que elas estão preservadas(figura 27I). Diferentemente, ao redor dos motoneurônios dos animais não tratados não existe área preservada(figura 27J).

A avaliação quantitativa foi calculada pela média das razões da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateal de cada grupo após duas semanas e representada por gráfico (figura 28). Quanto mais próximo a razão for de 1(um), maior proximidade da reatividade basal do lado contralateral, o que significa que existe maior quantidade de visiculas sinapticas ao redor do corpo neuronal. Desta forma, o grupo tratado (Rt) apresentou razão de Rt= 0,772± 0,200 e o grupo não tratado(Rn), Rn=0,507 ±0,0,143. A diferença entre os grupos foi significativa (p=0,0015).

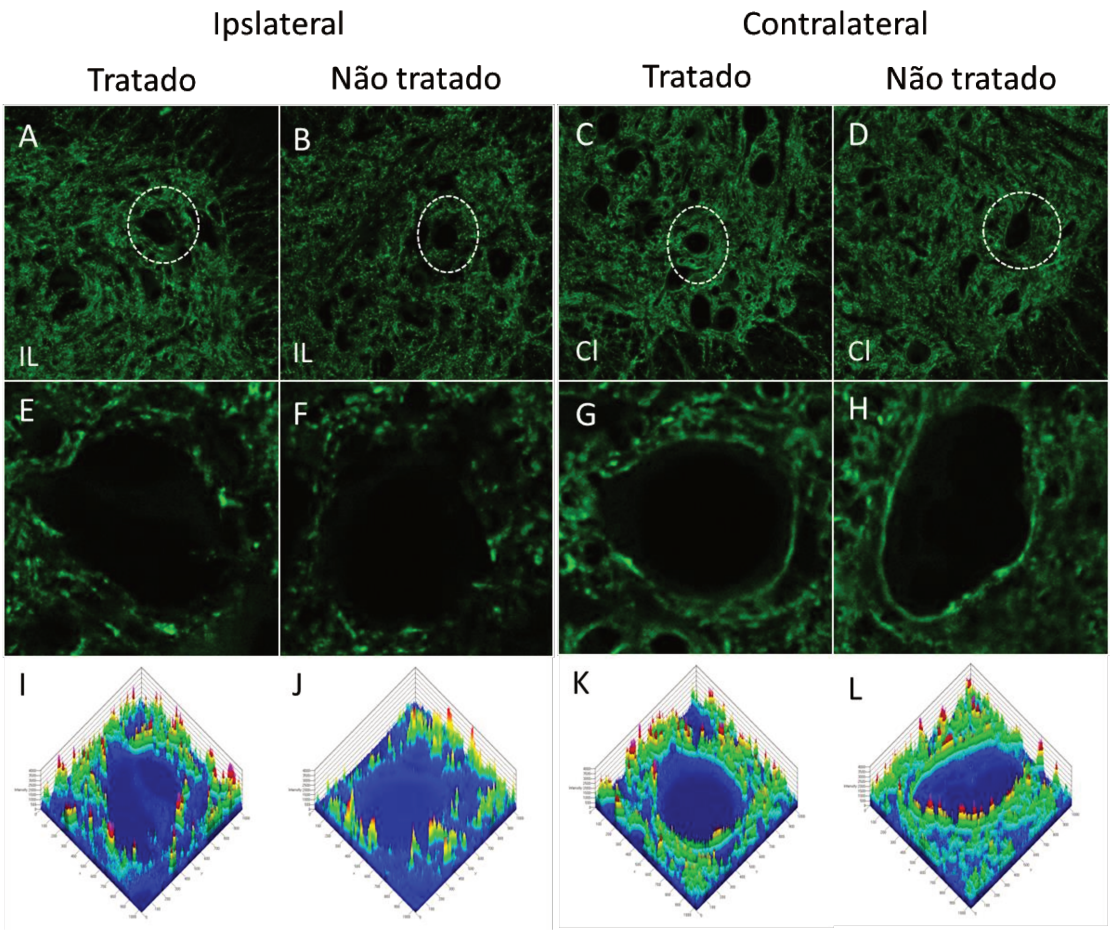


Figura 27. Imunohistoquimica de sinaptofisina do lado Ipslateral e contralateral. No lado ipslateral, tanto em animais tratado(A,E) como em animais não tratados(B,F), há redução de integridade dos botões pré-sinápticos ao redor dos motoneurônios. No lado contralateral, há intensa marcação ao redor dos neurônios em função da grande quantidade de botões pré-sinápticos aos motoneurônios nos animais tratados e não tratados (C,D,G e H). Pela analise de intensidade de pixel realizada pelo software LSM Image Examiner Software Release 3.2, há diferenças entre os lados ipslaterais dos grupos. Observa-se que existem regiões ao redor dos motoneurônios dos animais tratados em que os botões pré-sinápticos estão preservadas(I), o que não ocorre ao redor dos motoneurônios dos animais não tratados(J), em que há ausência de marcadores de sinaptofisina ao redor de todo corpo celular. No lado contralateral, observa-se que a marcação de sinaptofisina é muito intensa ao redor dos motoneurônios dos grupos tratados e não tratados(K,L).

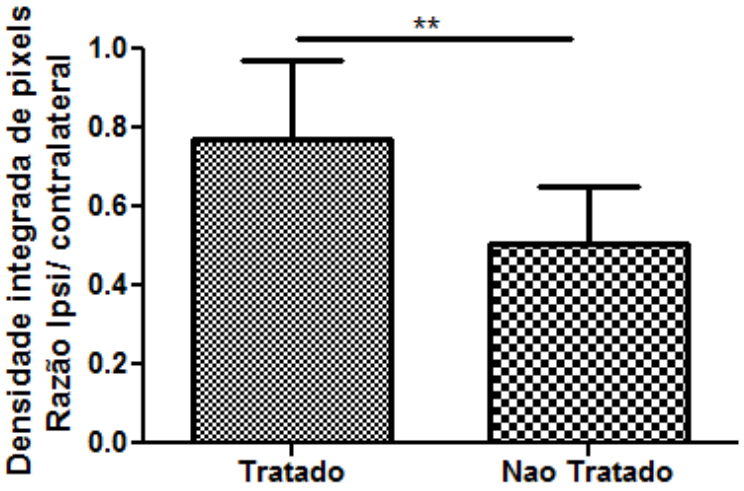


Figura 28. Representação gráfica da quantificação de fluorescência de sinaptofisina. A proximidade da razão com o numero 1 representa maior presença de vesículas sinápticas. Desta forma, o grupo tratado apresenta maior preservação das vesículas sinápticas ao redor do corpo neuronal, enquanto que no grupo não tratado há redução dessas vesículas. A diferença é significativa (p=0,0015).

4.2.5. Efeito das AT-MSC na astrogliose reativa

A avaliação de astrogliose reativa foi realizada por meio de marcação com GFAP após duas semanas da lesão. Existe uma reatividade basal no lado contralateral de ambos os grupos representada pela presença de processos astrocitários GFAP-positivo ao redor dos corpos celulares dos motoneurônios(figura 28 C,D). Na região afetada pela lesão de ambos os grupos, observa-se maior atividade de astrocitos GFAP positivos. No entanto, quando os grupos são comparados entre si, observa-se que a intensidade de astrogliose reativa é menor no grupo tratado (figura 28A) do que no grupo não tratado (figura 28C). A análise por intensidade de pixel representa graficamente a similaridade na intensidade de marcação de GFAP de ambos os lados contralaterais (figura 28 F, H) e ressalta a diferença entre os lados afetados pela lesão do grupo tratado (figura 28E) e do não tratado (figura 28G).

A avaliação quantitativa foi calculada pela média das razões da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateal de cada grupo após duas semanas e representada por gráfico (figura 29). Quanto mais próximo a razão for de 1(um), maior proximidade da reatividade basal do lado contralateral. Desta forma, o grupo tratado (Rt) apresentou razão de Rt= 1,227± 0,223 e o grupo não tratado(Rn), Rn=1,870±0,345. A diferença entre os grupos foi significativa (p=0,0004).

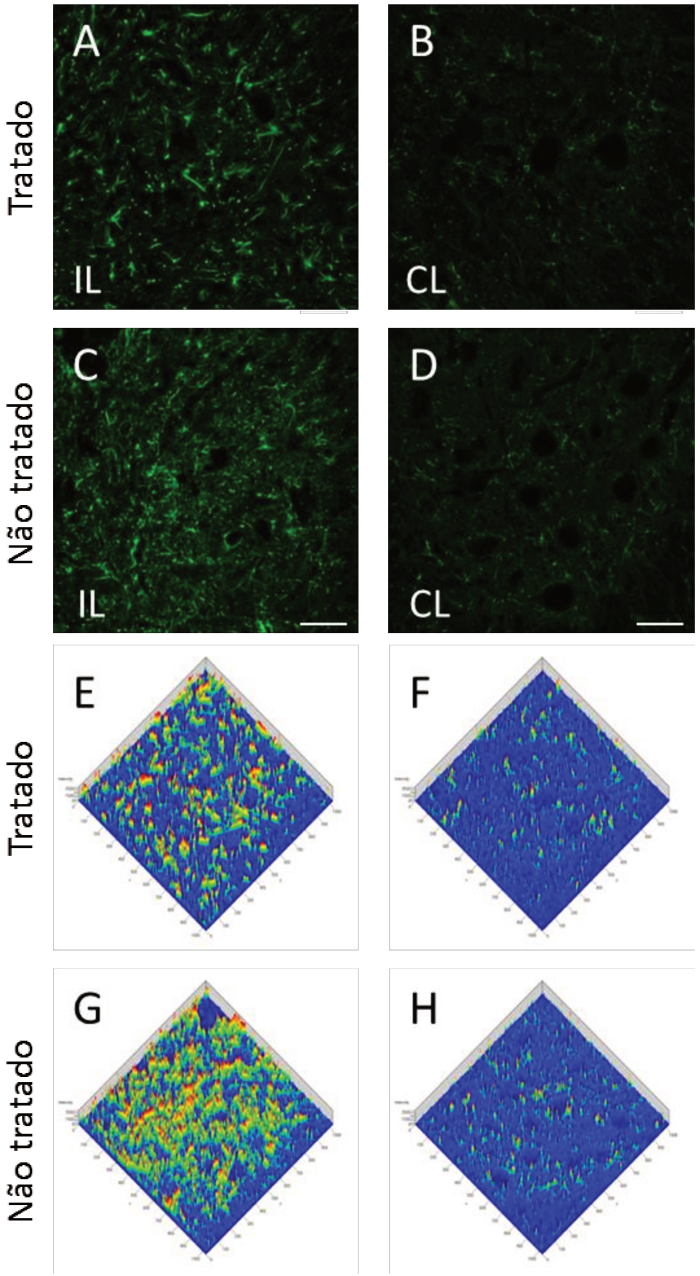


Figura 29.Imunohistoquímica do corno anterior ventral da massa cinzenta da medula espinal marcada com anti-GFAP, duas semanas após a lesão. Em ambos os grupos, observa-se aumento de marcação GFAP no lado ipsilateral (A,C), quando comparados com os respectivos lados contralaterais (B,D), caracterizando a astrogliose reativa . Contudo, nota-se menor marcação de GFAP no grupo tratado (A) quando comparada ao grupo não tratado(C), indicando que no grupo tratado a astrogliose reativa é menor. A análise de intensidade de pixel esclarece a observação (E,F,G e H). Barra de escala = 50μm

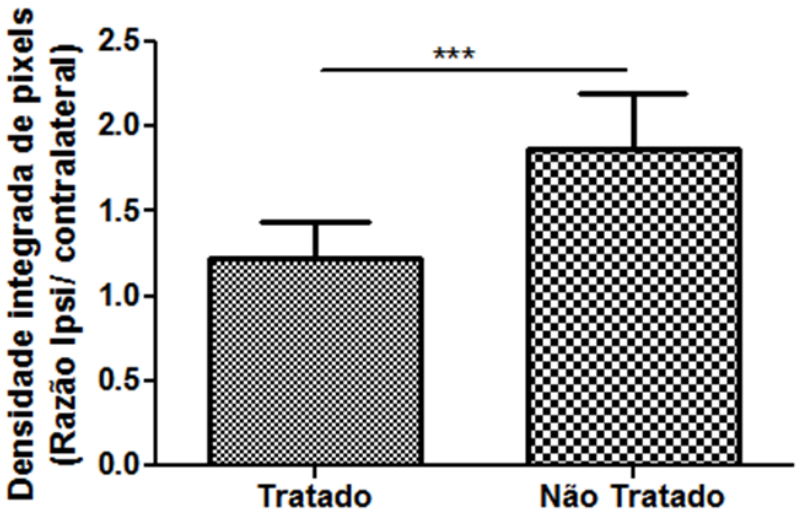


Figura 30. Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa duas semanas após a lesão. A proximidade da razão com o numero 1 representa menor atividade astrocitária. Desta forma, observa-se que há diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado (p=0,0004), na qual a astrogliose reativa é mais intensa no grupo não tratado.

4.2.6. Avaliação da ativação microglial

A ativação microglial foi avaliada por meio de marcação com IBA-1 após duas semanas da lesão. Existe atividade da microglia no lado contralateral de ambos os grupos em condições normais (Figura 30 B, D). Na região afetada pela lesão de ambos os grupos, observa-se aumento de atividade da microglia. No entanto, quando os grupos são comparados entre si, a intensidade da atividade microglial é mais intensa no grupo não tratado (figura 30C) do que no grupo tratado (figura 30A). A análise por intensidade de pixel representa graficamente a similaridade da atividade microglial de ambos os lados contralaterais (figura 30 F, H) e ressalta a diferença entre os lados afetados pela lesão do grupo tratado (figura 30E) e do não tratado (figura 30G).

A avaliação quantitativa foi calculada pela média das razões da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo, após duas semanas e representada por gráfico (figura 31). Quanto mais próximo a razão for de 1(um), maior a atividade microglial na região lesionada. Desta forma, o grupo tratado (Rt) apresentou razão de Rt=2,697 ± 1,623 e o grupo não tratado (Rn), Rn=5,094 ± 1,633. A diferença entre os grupos foi significativa (p=0,0032).

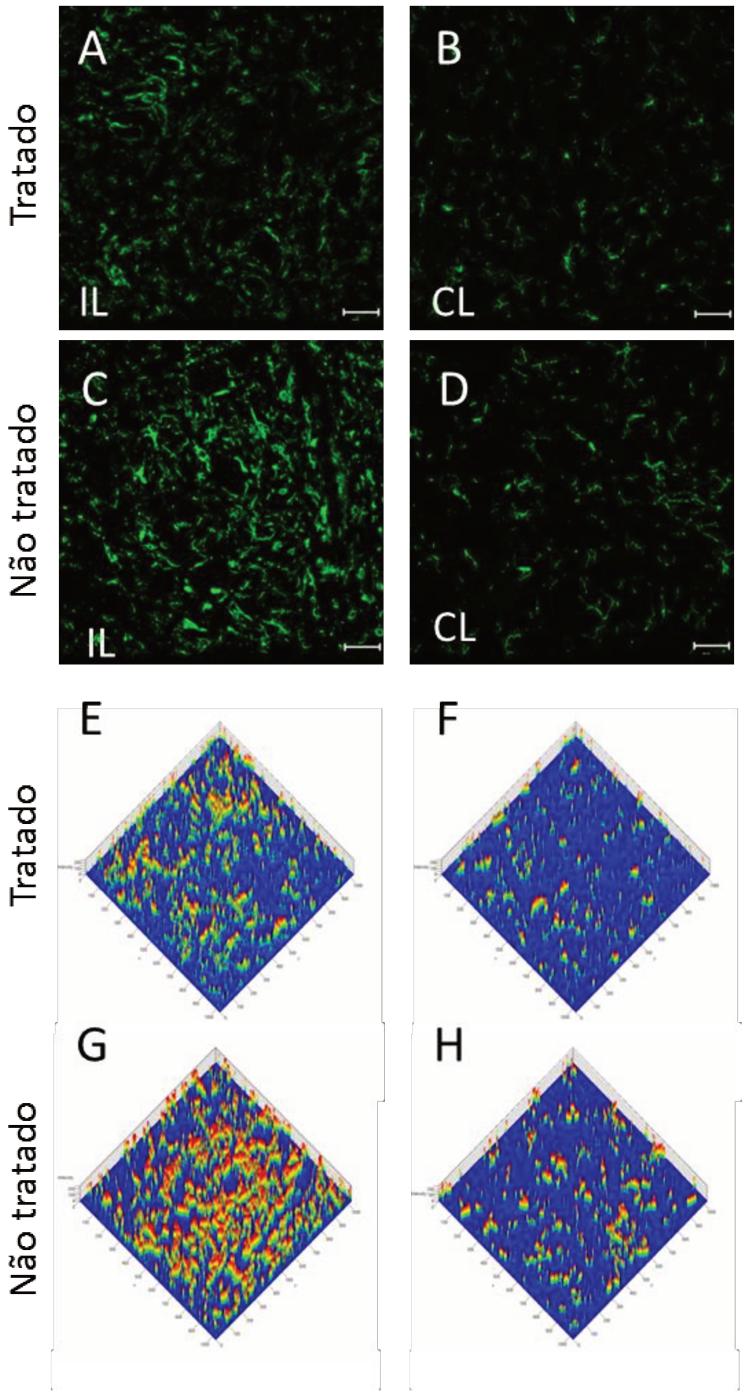


Figura 31. Imunohistoquímica do corno anterior ventral da massa cinzenta da medula espinal marcada com anti-IBA1, duas semanas após a lesão. Em ambos os grupos, observa-se a ativacao microglial do lado ipsilateral (A,C), quando comparados com os respectivos lados contralaterais (B,D). Contudo, há menor marcação de IBA1 no grupo tratado (A) quando comparada ao grupo não tratado(C), indicando que no grupo tratado a ativação microglial é menor. A análise de intensidade de pixel esclarece a observação (E, F, G e H). Barra de escala = 50μm

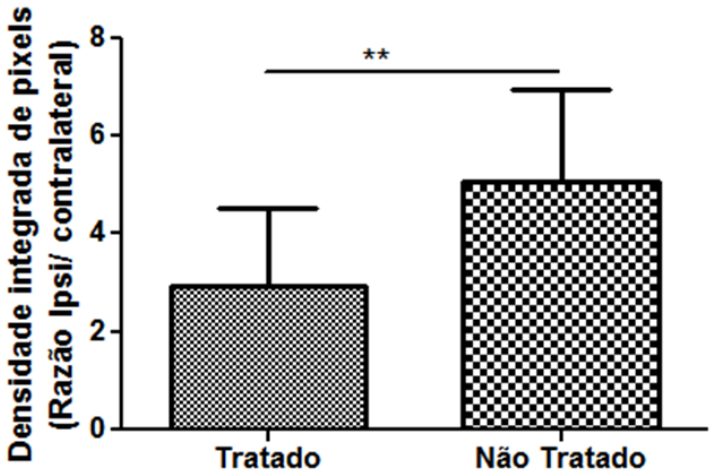


Figura 32. Representação gráfica da quantificação da ativação microglial duas semanas após a lesão. A proximidade da razão com o numero 1 representa menor ativação microglial. Há diferença significativa entre os grupos (p=0,0032), na qual a ativação microglial é menos intensa no grupo tratado do que no grupo não tratado.

5. Discussão

No presente trabalho, o protocolo de extração e seleção de células mesenquimais obtidas de tecido adiposo humano foi realizado e padronizado, seguindo os critérios estabelecidos pelo Comitê de Células Tronco Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular[62] e utilizadas no modelo animal de avulsão da raiz ventral medular. As células mesenquimais(AT-MSC) foram extraídas de lipoaspirado de doadores do Hospital das Clinicas da Unicamp. O tecido foi tratado por digestão enzimática com colagenase e as células obtidas foram submetidas à cultura celular por 3-4 passagens, quando a sua caracterização foi realizada. As AT-MSC eram aderentes em plásticos, expressaram marcadores CD90, CD73, CD105 e CD29, não apresentaram marcadores CD34, CD45 e HLA-DR e foram capazes de diferenciação em 3 linhagens celulares(adipócito, osteócito e condrócito). Além disso, apresentavam transcritos de fatores neurotróficos (BDNF e GDNF) e imunossupressores (TGF-β1, HGF, IDO1 e IL-10). Também foi possível verificar *in vitro*, a capacidade imunossupressora das AT-MSC sobre a proliferação de linfócitos T. A marcação por Qtracker, para posterior rastreamento *in vivo*, ficou presente por ate 15 dias ou 4 passagens.

No modelo animal, as AT-MSC humanas foram identificadas no tecido nervoso ao fim do período experimental (14 dias) por microscopia de fluorescência. Estes resultados indicaram que as células humanas permaneceram viáveis por até 14 dias e, portanto, não foram mortas pelo sistema imunológico do animal. Comparado com os animais não tratados, foi possível observar que nos animais tratados houve maior sobrevivência de motoneurônios e, nestes, houve maior preservação das vesículas sinápticas, mostrando que as AT-MSC tiveram ação neuroprotetora . Também se observou que nos animais enxertados com as AT-MSCs, houve uma redução de linfócitos T e de duas populações gliais (astroglia e micróglia), sugerindo que houve efeito das AT-MSC no sistema imunológico do animal.

A utilização do tecido adiposo como fonte de células-tronco mesenquimais é vantajosa e o uso de AT-MSC autólogas, como material de pesquisa e para terapia celular, é possível, segura e eficaz em estudos pré-clínicos [266, 267].

Os efeitos das AT-MSC em terapia celular têm se mostrado muito benéficos nos diversos modelos, embora seus efeitos positivos sejam mais em função dos produzidos pelas AT-MSC do que pela capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares[268], assim como as células mesenquimais de medula óssea[269].

O efeito imunomodulador das AT-MSC é a ação mais discutida, embora a capacidade das células em secretar fatores de crescimento contribua fundamentalmente para a regeneração do tecido, ora estimulando células-tronco da área afetada a diferenciar-se em progenitoras[124], ora ajudando na sobrevivência celular do tecido lesionado[130]. Também descreve-se na

literatura a fusão entre células do tecido e as MSC como forma de ação no processo regenerativo[270]. Contudo, ainda não foi comprovado que o transplante de MSC induza a sua própria diferenciação *in vivo* em células do tecido lesionado e nem que essa diferenciação resulte em funcionalidade absoluta.

Estudos recentes sugerem a viabilidade do transplante de células tronco para o tratamento de doenças e lesões no SNC[271-273]. Neste contexto, o presente trabalho propôs o uso de AT-MSC humanas no tratamento de ratos submetidos a avulsão de raízes motoras.

Revisão de protocolos de outras pesquisas, cujo o foco foi xenotransplante de células-tronco, mostrou mais de 100 estudos pré-clínicos que utilizaram AT-MSC isoladas de seres humanos em receptores animais imunocompetentes (rato, camundongo , coelho e cão) sem a utilização de imunossupressores. As doenças-alvo eram variadas, mas todos (exceto um estudo em que as células AT-MSC diferenciadas morreram nos primeiros dias) mostraram melhorias significativas após xenotransplante AT-MSC. É importante ressaltar que as células humanas tiveram algum tipo de ação em 7 espécies[259, 260]. Estes estudos condicionaram a presença das MSCs em animais ao fato destas células terem baixa expressão de MHC-II e possuírem conhecida capacidade imunossupressora.

No presente estudo, as AT-MSC humanas no modelo de avulsão sobreviveram por pelo menos 14 dias na área lesionada. A ausência de antígeno de superfície HLA-DR nas AT-MSC somada à capacidade de expressar transcritos imunossupressores como TGF-β1, HGF, IDO1 e IL-10 indicam que as células AT-MSC podem ter sobrevivido em função da ação destes fatores. Além disso, o ensaio de proliferação de linfócito T foi realizado em cultura com ou sem AT-MSC e células T estimuladas por processo especifico (proliferação na presença de epítopos da bainha de mielina) demonstrou que as células humanas reduziram a proliferação de linfócitos T, numa relação inversamente proporcional. Ou seja, quanto maior a concentração de células AT-MSC, menor a proliferação de células T. O ensaio de imunohistologia da secção transversal da medula espinal de rato com anticorpo anti-CD3(rato) demonstrou qualitativamente uma redução da presença de Linfócitos T nos animais tratados com AT-MSC. Os resultados sugerem que as células não possuem uma ação localizada, mas abrange todo o sitio de lesão.

Há vários estudos que indicam que as AT-MSC modulam negativamente o sistema imune[274]. Em estudo realizado em modelo de esclerose múltipla (doença autoimune com encefalomielite) utilizando transplante alogênico de AT-MSC de camundongo, Constantin e colaboradores observaram que a administração dessas células em fase pré-clínica da doença teve efeito anti-proliferativo dos linfócitos T[124]. Em outra doença autoimune, o diabetes tipo 1, as células T inflamatórias, num processo mediado pelas células Th1 CD4+ efetoras e por citocinas

pro-inflamatórias (Interferon-IFN-γ, Interleucina 2 -IL-2 e fatores de necrose tumoral-TNFα), causam a destruição das células β (produtoras de insulina) na ilha pancreática. O tratamento com MSC induziu a proliferação de células T regulatórias, reduzindo a ação das células Th1 e as citocinas pro-inflamatórias, enquanto houve aumento das citocinas anti-inflamatórias no microambiente ao final do tratamento de 35 dias[275]. Peng e colegas realizaram experimento com células AT-MSC e células dendríticas submetidas à co-cultura com células T CD4+. O estudo demonstrou que moléculas co-estimulatórias foram suprimidas (IL-12 e TNFα), houve aumento da expressão de IDO1 das dendríticas e as células dendríticas inibiram a ativação de Células T CD4+, confirmando o efeito imunossupressor das AT-MSC. Desta forma, estes estudos corroboram os nossos resultados, demonstrando que, apesar de espécie diferente, as AT-MSC humanas tem ação imunossupressora no modelo animal.

Conforme descrito anteriormente, as lesões proximais na medula espinal afetam os axônios dos motoneurônios e resultam em perda de aproximadamente 80% destas células durante as primeiras duas semanas [168, 194, 197]. Os resultados deste estudo mostraram que a terapia com AT-MSC humanas manteve um número significativo de motoneurônios nos animais tratados (56,25%) quando comparados aos animais sem tratamento (36,66%). A análise dos transcritos de AT-MSC mostra também que estas células expressam conhecidos fatores neurotróficos, como BDNF e GDNF. A presença das AT-MSC favoreceu a sobrevivência dos motoneurônios lesados, uma vez que a relação entre o tempo e a degeneração é bem conhecida neste modelo experimental e a maior parte dos motoneurônios havia degenerado após 2 semanas nos grupos sem tratamento.

A desconexão entre o motoneurônio e o alvo muscular durante longo período torna-se um fator preponderante para que haja morte neuronal[162]. Neste estudo, a avulsão não foi seguida do reimplante das raízes nervosas, o que não possibilitou o desenvolvimento de um eventual processo regenerativo nem a recuperação de movimentos da pata do animal. Desta forma, estudos futuros deverão ser realizados no sentido de se avaliar o potencial regenerativo dos motoneurônios avulsionados, submetidos ao tratamento com AT-MSC e reimplante das raízes.

Um grupo de moléculas essenciais para o crescimento do neurito e consequentemente para a sobrevivência dos motoneurônios após uma lesão proximal são os componentes da matriz extracelular. No nervo periférico, tem sido atribuído à laminina um importante papel na aderência de substratos para o crescimento do axônio. Desta forma, a presença da laminina é um fator preponderante para a capacidade regenerativa do neurônio. Interessantemente, ocorre uma regulação positiva da produção de receptores (α-6 e α-7) para as lamininas no caso da avulsão

de raízes ventrais[276]. Lopatina e colegas, em análise de transcritos, observaram que as AT-MSCs expressam laminina e sugerem que estas células podem servir como suporte para brotos nervosos em crescimento *in vivo*[277].

Também foi demonstrado que tratamento da medula espinal pós-lesão com MSC de medula óssea de rato resultou em significativa redução da expressão de caspase-3 [278]. Neste sentido, o enxerto de AT-MSC na medula poderia contribuir, em parte, para a sobrevivência neuronal através da sua ação anti-apoptótica.

A secreção de fatores neurotroficos pelas AT-MSC pode ter colaborado para a neuroproteção após a lesão medular. Embora ainda seja controverso quanto a secreção de GDNF, diversos trabalhos descrevem a secreção de fatores neurotróficos pelas AT-MSC[129, 279, 280]. Apesar do efeito GDNF ser significativamente mais potente do que o BDNF na promoção da regeneração axonal motora após secção do nervo tibial em ratos adultos, o tratamento combinado de GDNF e BDNF aumentou significativamente o número de motoneurônios que regeneraram seus axônios mostrando que, embora a ação neurotrófica destas moléculas se realize por vias intracelulares distintas, elas, quando juntas, têm efeitos sinérgicos[210]. Neste estudo, o efeito sinérgico dos fatores pode ter ocorrido, uma vez que o ensaio de RT-PCR para análise de transcritos de AT-MSC identificou a expressão desses dois fatores neurotróficos.

Em outro estudo, motoneurônios axotomizados foram transfectados com adenovírus e passaram a expressar continuadamente BDNF e GDNF. Isso resultava em intenso brotamento dos axônios, mas estes não foram capazes de regenerar, porque o crescimento axonal acontecia em torno do motoneurônio, ou seja, o axônio não saía do sitio de lesão[281]. Também é conhecido que fatores neurotróficos não são capazes de manter a sobrevivência de motoneurônios lesados em um animal adulto por longos períodos caso não haja conexão entre o corpo celular e o alvo[208]. Portanto o estimulo continuo pode ser maléfico; mas isto não acontece com transplante de AT-MSC, porque estas células respondem a estímulos fisiológicos, como migrar para áreas lesionadas[282, 283] e controlar a secreção de citocinas de acordo com o microambiente.

Desta forma, a terapia celular com MSC poderia ser a primeira frente de combate na lesão, pois permite que os motoneurônios permaneçam vivos por um período de até 14 dias que poderia ser crucial para o reimplante da raiz.

Ainda, MSCs modificadas geneticamente para super-expressar BDNF foram transplantados em ratos com oclusão transitória da artéria cerebral média (isquemia cerebral) e

causaram melhora na recuperação da isquemia após 7-14 dias e redução do numero de células apoptóticas na penumbra isquêmica[284]. Experimento com células modificadas geneticamente também foi realizado em modelo de lesão da medula espinal e foi observado que houve aumento da sobrevivência neuronal em relação ao grupo com MSC não modificadas[285], sugerindo que as MSCs podem ser parte de uma estratégia alternativa de combinação entre terapia gênica e celular.

A interrupção do contato entre o motoneurônio e as fibras musculares após uma lesão resulta na retração de botões sinápticos da superfície da célula axotomizada[188]. Há uma perda significativa dos botões sinápticos diminuindo ou mesmo abolindo a transmissão sináptica desses neurônios [189, 190], que pode tornar-se permanente se a reinervação do órgão alvo não ocorrer[188].

Neste estudo, observou-se que, além de promover a sobrevivência de motoneurônios lesionados, as AT-MSC também contribuiram para a organização dos botões sinápticos. A sinaptofisina é uma glicoproteína de membrana que ocorre em vesículas pré-sinápticas em praticamente todos os neurônios do sistema nervoso central que fazem transmissão sináptica[286, 287]. Na análise imunohistológica com anticorpos anti-sinaptofisina, observa-se claramente que os animais tratados possuem a marcação mais intensa ao redor dos motoneurônios, consequência de mais vesículas pré-sinápticas ao redor do corpo celular, sugerindo que a estrutura sináptica esta mais preservada nestes motoneurônios do que naqueles de animais não tratados. Este resultado decorre da expressão do fator BDNF pelas AT-MSC, o que corrobora os resultados de Novikov e colegas, no qual o tratamento com BDNF exógeno preveniu o destacamento de sinapses após avulsão e restabeleceu a frequência e a cobertura sináptica[288].

Além disso, os resultados de imunohistologia realizada com anticorpos específicos para populações gliais ativadas mostram que o tratamento com AT-MSC reduziu significativamente a reação astroglial e ativação microglial.

A interação entre os motoneurônios e o microambiente circunvizinho é de crucial importância para a estabilidade sináptica e a homeostase[192, 219]. As células da glia exibem uma variedade de funções com destaque nos processos de homeostase neuronal. A astroglia participa diretamente do destacamento das sinapses na superfície do motoneurônio. Desta forma, a atenuação da astrogliose reativa pode ser um dos mecanismos envolvidos na redução da eliminação sináptica. Ainda, a hipertrofia dos processos astrocitários em torno do sítio de lesão forma densas fibras que limitam o brotamento do axônio e a regeneração nas margens da lesão [289], contribuindo para a formação da cicatriz glial, fundamental para conter o sitio de

lesão e manter a homeostase medular [225]. O implante de MSC pode sustentar um crescimento axonal após lesões agudas[264] e crônicas[290] no SNC, pois estas células alteram o microambiente, permitindo o crescimento dos axônios através da cicatriz glial. Contudo, o equilibrio entre fatores inibitórios e estimulatórios, produzidos localmente pelas MSC e pelas células residentes, é essencial para que o processo aconteça. Em co-cultura de neurônios e astrocitos GFAP+, o crescimento de neurito e a sobrevivência neuronal é significativamente menor do que em co-cultura de astrocito GFAP- (não ativado)[291] e já há modelo *in vitro* para estudo de astrogliose reativa[292].

Alguns estudos indicam que a atuação de uma subpopulação de microglia (M1) nas primeiras duas semanas contribui para o dano tecidual secundário (perda de neurônios e desmielinização)[293, 294], justamente por liberar fatores pró-inflamatórios e radicais livres no processo de fagocitose. Além disso, elas expressam um proteoglicano, sulfato de condroitina, que é potente inibidor de crescimento axonal[295]. Contudo, a fagocitose da mielina e células vermelhas do sangue promove mudanças dessas células para um fenótipo anti-inflamatório, contribuindo para o início da atividade da subpopulação de micróglia M2. Estas células, muito pouco presente no inicio da lesão, expressam altos níveis de IL10 e TGFβ em uma resposta anti-inflamatória, favorecendo o reparo tecidual.

Tanto a redução da astrogliose quanto da ativação da micróglia observada neste trabalho ocorreu muito provavelmente em função da ação parácrina das AT-MSC. Estudos mostram que células da astroglia ativadas foram tratadas com fatores anti-inflamatórios (TGF-β, IL10 e IL4) e houve redução na produção dos fatores pro-inflamatórios por elas produzidos, como óxido nítrico, TNF-α e IL6[296]. Ao mesmo tempo, a micróglia M1 também é afetada por esses fatores[296, 297]. Além disso, a sinalização por TGF-β, presente nas AT-MSCs, é fundamental para quiescência das micróglias ativadas[298]. Desta forma, os nossos resultados sugerem que a produção dos fatores imunossupressores liberados pelas AT-MSC humanas tenham colaborado para a redução de astrogliose reativa e ativação microglial, contribuindo para a sobrevivência dos motoneurônios.

Um ponto a ser investigado é o que acontece com as subpopulações de micróglia. Existe uma redução da presença dela que possivelmente é a subpopulação M1, já que ela é o primeiro tipo celular a ser ativado. Mas não é possível saber se as AT-MSC podem estimular a atividade da subpopulação M2, responsável pelo inicio da regeneração tecidual. Duas questões que precisam ser esclarecidas é i)se o microambiente anti-inflamatório gerado pela AT-MSC é suficiente para o surgimento da M2 ou se é necessário uma sinalização via M1 e ii) o efeito das AT-MSC na reconstrução da barreira hemato-encefálica.

Em estudo comparativo com xenotransplante de AT-MSC e BM-MSC em lesão aguda da medula espinal na região torácica T9, Zhou e colegas[299] observaram que os dois tipos celulares contribuíram para a recuperação do tecido. Contudo, as AT-MSC tiveram uma ação neuroprotetora maior que as BM-MSC. Além disso, houve um aumento da angiogenese, recuperação axonal, redução da presença de micróglias e aumento de fatores tróficos do tecido. O estudo não observou diferenciação das células transplantadas. Desta forma, o estudo sugere que as células agem de forma parácrina e os resultados corroboram os resultados do presente estudo.

Diante do exposto, nosso estudo sugere que os benefícios da infusão das AT-MSC no reparo tecidual decorreria da ativação de vias de sinalização e interação local com as células residentes, promovendo mecanismos reparadores e regenerativos, por meio da síntese de fatores neurotróficos e imunossupressores, que parece ser o principal meio de ação das AT-MSC. Desta forma, o efeito positivo do implante de AT-MSC asseguraria síntese local de importantes fatores sem a necessidade de diferenciar-se.

Em conclusão, este trabalho uniu avaliação imunológica e funcional das AT-MSC humanas em modelo animal. O efeito imunossupressor somado ao efeito neuroprotetor de células mesenquimais de tecido adiposo humanas em modelo de avulsão da raiz medular em ratos, sugerem que essas células, em condições GMP, poderiam eventualmente ser usadas em estudos clínicos de transplante autólogo e alógeno.

6. Conclusão

As AT-MSC humanas sobrevivem em xenotransplante em ratos, pois têm um potente efeito imunossupressor sobre as células T e células do sistema imune do sistema nervoso.

As AT-MSC expressam fatores neurotróficos que, apesar de espécie diferente, têm papel fundamental na sobrevivência de motoneurônios submetidos a avulsão.

A principal ação das AT-MSCs no modelo de avulsão da raiz ventral da medula espinal é o efeito parácrino.

Ainda é necessário desvendar os efeitos das AT-MSCs na barreira hematoencefálica, elucidando se o transplante celular restabelece a homeostase do microambiente medular e a forma que ele afeta a ação das micróglias/macrófagos M2, células essenciais para a regeneração do tecido nervoso.

Não foi possível estabelecer o efeito do xenotransplante a longo prazo nem a taxa de morte celular dia-a-dia após a lesão e após o transplante. Essa informação é relevante quando se pensa em um possível tratamento ou estudo clinico.

Ainda seguindo essa linha de raciocínio e indo além do estudo, a criação de um banco de células mesenquimais pode ser uma proposta interessante a ser analisada para futuro uso clinico.

7. Referências Bibliográficas

1. Mimeault, M., R. Hauke, and S.K. Batra, *Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies.* Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(3): p. 252-64.
2. Eckfeldt, C.E., E.M. Mendenhall, and C.M. Verfaillie, *The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(9): p. 726-37.
3. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
4. Perry, A.R. and D.C. Linch, *The history of bone-marrow transplantation.* Blood Rev, 1996. **10**(4): p. 215-9.
5. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility.* Blood, 1996. **87**(1): p. 1-13.
6. Lange, C., et al., *CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo.* Stem Cells Dev, 2007. **16**(2): p. 297-304.
7. O'Brien, T.A., K. Tiedemann, and M.R. Vowels, *No longer a biological waste product: umbilical cord blood.* Med J Aust, 2006. **184**(8): p. 407-10.
8. Miraglia, S., et al., *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning.* Blood, 1997. **90**(12): p. 5013-21.
9. Hao, H.N., et al., *Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro.* J Hematother Stem Cell Res, 2003. **12**(1): p. 23-32.
10. Harris, D.T., *Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications.* Stem Cell Rev, 2008. **4**(4): p. 269-74.
11. Ahrens, I., et al., *Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23210.
12. Nishiyama, N., et al., *The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro.* Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2017-24.
13. Ende, N. and R. Chen, *Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood.* J Med, 2002. **33**(1-4): p. 173-80.
14. Jang, Y.K., et al., *Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells.* J Neurosci Res, 2004. **75**(4): p. 573-84.
15. Zwart, I., et al., *Analysis of neural potential of human umbilical cord blood-derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli.* J Neurosci Res, 2008. **86**(9): p. 1902-15.
16. Partridge, T.A., et al., *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts.* Nature, 1989. **337**(6203): p. 176-9.
17. Geng, J., et al., *Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.* Cytotherapy, 2009. **11**(7): p. 849-63.
18. Cossu, G. and F. Mavilio, *Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective?* J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1669-74.
19. Tarnowski, M. and A.L. Sieron, *Adult stem cells and their ability to differentiate.* Med Sci Monit, 2006. **12**(8): p. RA154-63.
20. Tajbakhsh, S., *Losing stem cells in the aged skeletal muscle niche.* Cell Res, 2013.
21. Asakura, A., M. Komaki, and M. Rudnicki, *Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation.* Differentiation, 2001. **68**(4-5): p. 245-53.
22. Huang, S., et al., *Osteogenic differentiation of muscle satellite cells induced by platelet-rich plasma encapsulated in three-dimensional alginate scaffold.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012. **114**(5 Suppl): p. S32-40.

23. Corotto, F.S., J.A. Henegar, and J.A. Maruniak, *Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain.* Neurosci Lett, 1993. **149**(2): p. 111-4.
24. Luskin, M.B., *Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.* Neuron, 1993. **11**(1): p. 173-89.
25. Yen, B.L., et al., *Isolation of multipotent cells from human term placenta.* Stem Cells, 2005. **23**(1): p. 3-9.
26. Huang, H.I., *Isolation of human placenta-derived multipotent cells and in vitro differentiation into hepatocyte-like cells.* Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **Chapter 1**: p. Unit 1E 1.
27. Chien, C.C., et al., *In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells.* Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1759-68.
28. Li, D., et al., *Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells and their proliferative response to various cytokines.* Cells Tissues Organs, 2007. **186**(3): p. 169-79.
29. Kanematsu, D., et al., *Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta.* Differentiation, 2011. **82**(2): p. 77-88.
30. Yen, B.L., et al., *Placenta-derived multipotent cells differentiate into neuronal and glial cells in vitro.* Tissue Eng Part A, 2008. **14**(1): p. 9-17.
31. Portmann-Lanz, C.B., et al., *Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes.* Am J Obstet Gynecol, 2010. **202**(3): p. 294 e1-294 e11.
32. Zhou, Y., et al., *Genetic Modification of Primate Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Produces Pancreatic Progenitor Cells in vitro.* Cells Tissues Organs, 2013.
33. Zipori, D., et al., *Cultured mouse marrow stromal cell lines. II. Distinct subtypes differing in morphology, collagen types, myelopoietic factors, and leukemic cell growth modulating activities.* J Cell Physiol, 1985. **122**(1): p. 81-90.
34. Zipori, D., J. Toledo, and K. von der Mark, *Phenotypic heterogeneity among stromal cell lines from mouse bone marrow disclosed in their extracellular matrix composition and interactions with normal and leukemic cells.* Blood, 1985. **66**(2): p. 447-55.
35. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
36. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.* Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
37. Kim, J.B., et al., *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4.* Nature, 2009. **461**(7264): p. 649-3.
38. Kim, D., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins.* Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 472-6.
39. Amabile, G. and A. Meissner, *Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine.* Trends Mol Med, 2009. **15**(2): p. 59-68.
40. Dimos, J.T., et al., *Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons.* Science, 2008. **321**(5893): p. 1218-21.
41. Wernig, M., et al., *Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5856-61.
42. Yamanaka, S., *A fresh look at iPS cells.* Cell, 2009. **137**(1): p. 13-7.
43. Friedenstein, A.J., *Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo.* Haematol Blood Transfus, 1980. **25**: p. 19-29.
44. Castro-Malaspina, H., et al., *Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.* Blood, 1980. **56**(2): p. 289-301.

45. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 568-84.
46. Anghileri, E., et al., *Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells.* Stem Cells Dev, 2008. **17**(5): p. 909-16.
47. Banas, A., et al., *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure.* J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(1): p. 70-7.
48. Franchini, M., *[Mesenchymal stem cells: from biology to clinical applications].* Recenti Prog Med, 2003. **94**(11): p. 478-83.
49. Nasef, A., N. Ashammakhi, and L. Fouillard, *Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms.* Regen Med, 2008. **3**(4): p. 531-46.
50. Gnecchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement.* Faseb J, 2006. **20**(6): p. 661-9.
51. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.* Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
52. Keating, A., *Mesenchymal stromal cells: new directions.* Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 709-16.
53. Jackson, W.M., L.J. Nesti, and R.S. Tuan, *Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells.* Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(1): p. 44-50.
54. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow.* Blood, 2001. **98**(8): p. 2396-402.
55. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.* Br J Haematol, 2000. **109**(1): p. 235-42.
56. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta.* Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1338-45.
57. Lee, O.K., et al., *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.* Blood, 2004. **103**(5): p. 1669-75.
58. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord.* Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1330-7.
59. Yoshimura, K., et al., *Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates.* J Cell Physiol, 2006. **208**(1): p. 64-76.
60. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
61. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
62. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies.* Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
63. Casteilla, L., et al., *Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases?* Arch Mal Coeur Vaiss, 2005. **98**(9): p. 922-6.
64. Oedayrajsingh-Varma, M.J., et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure.* Cytotherapy, 2006. **8**(2): p. 166-77.
65. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.* Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.

66. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood.* Exp Hematol, 2005. **33**(11): p. 1402-16.
67. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.* Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.
68. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.* Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
69. Song, H.Y., et al., *Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.* Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(11): p. 2357-65.
70. Adegani, F.J., et al., *A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells.* Mol Biol Rep, 2012.
71. Rodriguez, A.M., et al., *The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.* Biochimie, 2005. **87**(1): p. 125-8.
72. Mohsen-Kanson, T., et al., *Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2012.
73. Fujimura, J., et al., *Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(1): p. 116-21.
74. Guidotti, S., et al., *Enhanced osteoblastogenesis of adipose derived stem cells upon spermine delivery via beta-catenin activation.* Stem Cells Dev, 2013.
75. Hattori, H., et al., *Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006. **76**(1): p. 230-9.
76. Guasti, L., et al., *High plasticity of pediatric adipose tissue-derived stem cells: too much for selective skeletogenic differentiation?* Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(5): p. 384-95.
77. Cowan, C.M., et al., *Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects.* Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 560-7.
78. Chang, J.C., S.H. Hsu, and D.C. Chen, *The promotion of chondrogenesis in adipose-derived adult stem cells by an RGD-chimeric protein in 3D alginate culture.* Biomaterials, 2009. **30**(31): p. 6265-75.
79. Strem, B.M., et al., *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells.* Keio J Med, 2005. **54**(3): p. 132-41.
80. Shi, Y.Y., et al., *The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging.* Plast Reconstr Surg, 2005. **116**(6): p. 1686-96.
81. Im, G.I., Y.W. Shin, and K.B. Lee, *Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?* Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(10): p. 845-53.
82. Hui, J.H., et al., *Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit.* Tissue Eng, 2005. **11**(5-6): p. 904-12.
83. Hong, L., et al., *Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells.* Cells Tissues Organs, 2006. **183**(3): p. 133-40.
84. Yang, Z., et al., *Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro.* J Orthop Res, 2011. **29**(8): p. 1291-7.
85. Strauss, S., et al., *Induction of osteogenic differentiation of adipose derived stem cells by microstructured nitinol actuator-mediated mechanical stress.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51264.
86. Mizuno, H., M. Tobita, and A.C. Uysal, *Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine.* Stem Cells, 2012. **30**(5): p. 804-10.

87. Shi, Z., et al., *Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography.* J Tissue Eng Regen Med, 2012.
88. Boquest, A.C., et al., *CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage.* Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 852-61.
89. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells functional characterization.* Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(8): p. 318-22.
90. Planat-Benard, V., et al., *Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives.* Circulation, 2004. **109**(5): p. 656-63.
91. Lee, H.J., et al., *Comparison of in vitro hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes.* Differentiation, 2012. **84**(3): p. 223-31.
92. Banas, A., *Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells.* Methods Mol Biol, 2012. **826**: p. 61-72.
93. Seo, M.J., et al., *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(1): p. 258-64.
94. Timper, K., et al., *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(4): p. 1135-40.
95. Lee, J., et al., *Differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into aggregate of insulin-producing cells through overexpression of pancreatic and duodenal homeobox gene-1.* Cell Transplant, 2012.
96. Corre, J., et al., *Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors.* J Cell Physiol, 2006. **208**(2): p. 282-8.
97. De Toni, F., et al., *Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies.* Stem Cells Dev, 2011. **20**(12): p. 2127-38.
98. Han, J., et al., *Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells.* Blood, 2010. **115**(5): p. 957-64.
99. Blogowski, W., et al., *Adipose tissue as a potential source of hematopoietic stem/progenitor cells.* Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(5): p. 923-31.
100. Rodriguez, A.M., et al., *Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse.* J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1397-405.
101. Carvalho, P.H., et al., *Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes.* Arq Bras Cardiol, 2012.
102. Chang, W., et al., *Phorbol myristate acetate differentiates human adipose-derived mesenchymal stem cells into functional cardiogenic cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **424**(4): p. 740-6.
103. Geng, J., et al., *Decorin promotes myogenic differentiation and mdx mice therapeutic effects after transplantation of rat adipose-derived stem cells.* Cytotherapy, 2012. **14**(7): p. 877-86.
104. Di Rocco, G., et al., *Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 14): p. 2945-52.
105. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
106. Jang, S., et al., *Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin.* BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 25.

107. Ahmadi, N., et al., *Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols.* Tissue Cell, 2012. **44**(2): p. 87-94.
108. Woodbury, D., et al., *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.* J Neurosci Res, 2000. **61**(4): p. 364-70.
109. Neuhuber, B., et al., *Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype.* J Neurosci Res, 2004. **77**(2): p. 192-204.
110. Lu, P., A. Blesch, and M.H. Tuszynski, *Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact?* J Neurosci Res, 2004. **77**(2): p. 174-91.
111. Bossolasco, P., et al., *Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro.* Exp Neurol, 2005. **193**(2): p. 312-25.
112. Long, X., et al., *Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells.* Stem Cells Dev, 2005. **14**(1): p. 65-9.
113. Montzka, K., et al., *Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression.* BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 16.
114. Chen, Y., F.Y. Teng, and B.L. Tang, *Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties.* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1649-57.
115. Cho, H.H., et al., *Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells.* Tissue Eng, 2006. **12**(1): p. 111-21.
116. Akiyama, T., *Wnt/beta-catenin signaling.* Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(4): p. 273-82.
117. Kim, M.H., et al., *Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via Wnt/beta-catenin signalling or lipolysis.* Cell Prolif, 2010. **43**(6): p. 594-605.
118. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells.* Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
119. Kim, Y.J., et al., *ICAT participates in proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell.* Life Sci, 2008. **83**(25-26): p. 851-8.
120. Brandon, C., L.M. Eisenberg, and C.A. Eisenberg, *WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells.* Blood, 2000. **96**(13): p. 4132-41.
121. Zhao, Y., S.D. Waldman, and L.E. Flynn, *Multilineage co-culture of adipose-derived stem cells for tissue engineering.* J Tissue Eng Regen Med, 2012.
122. Abumaree, M., et al., *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells.* Stem Cell Rev, 2012. **8**(2): p. 375-92.
123. Soleymaninejadian, E., K. Pramanik, and E. Samadian, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors.* Am J Reprod Immunol, 2012. **67**(1): p. 1-8.
124. Constantin, G., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis.* Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2624-35.
125. Ivanova-Todorova, E., et al., *Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells and Increases IL-10 Secretion.* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 295167.
126. Bassi, E.J., et al., *Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells.* Stem Cell Rev, 2012. **8**(2): p. 329-42.

127. Karussis, D., et al., *Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases.* J Neurol Sci, 2008. **265**(1-2): p. 131-5.
128. Marconi, S., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush.* Tissue Eng Part A, 2012. **18**(11-12): p. 1264-72.
129. Taghi, G.M., et al., *Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors.* Cell Biol Int, 2012. **36**(12): p. 1239-49.
130. Rodrigues Hell, R.C., et al., *Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion.* Neurobiol Dis, 2009. **33**(2): p. 290-300.
131. Crigler, L., et al., *Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis.* Exp Neurol, 2006. **198**(1): p. 54-64.
132. Brohlin, M., et al., *Aging effect on neurotrophic activity of human mesenchymal stem cells.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45052.
133. Weissleder, R., et al., *Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity.* AJR Am J Roentgenol, 1989. **152**(1): p. 167-73.
134. Kraitchman, D.L., et al., *In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction.* Circulation, 2003. **107**(18): p. 2290-3.
135. Wang, L., et al., *Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H1020-31.
136. Berman, S.C., et al., *Long-term MR cell tracking of neural stem cells grafted in immunocompetent versus immunodeficient mice reveals distinct differences in contrast between live and dead cells.* Magn Reson Med, 2011. **65**(2): p. 564-74.
137. Lepore, A.C., et al., *MR imaging of lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult spinal cord.* Exp Neurol, 2006. **201**(1): p. 49-59.
138. Cromer Berman, S.M., P. Walczak, and J.W. Bulte, *Tracking stem cells using magnetic nanoparticles.* Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2011. **3**(4): p. 343-55.
139. Keren, K., et al., *Intracellular fluid flow in rapidly moving cells.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(10): p. 1219-24.
140. Zhang, L.W. and N.A. Monteiro-Riviere, *Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake.* Toxicol Sci, 2009. **110**(1): p. 138-55.
141. Xiao, Y., et al., *Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake.* J Nanobiotechnology, 2010. **8**: p. 13.
142. Skokos, D., et al., *Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes.* Nat Immunol, 2007. **8**(8): p. 835-44.
143. Gould, T.W. and R.W. Oppenheim, *Motor neuron trophic factors: therapeutic use in ALS?* Brain Res Rev, 2011. **67**(1-2): p. 1-39.
144. Oppenheim, R.W., et al., *Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF.* Nature, 1995. **373**(6512): p. 344-6.
145. Hamburger, V., *Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia.* Am J Anat, 1958. **102**(3): p. 365-409.
146. Oppenheim, R.W., *Cell death during development of the nervous system.* Annu Rev Neurosci, 1991. **14**: p. 453-501.
147. Sendtner, M., et al., *Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors.* Cell Tissue Res, 2000. **301**(1): p. 71-84.

148. Kim, W.R. and W. Sun, *Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system.* Dev Growth Differ, 2011. **53**(2): p. 225-35.
149. Buss, R.R., W. Sun, and R.W. Oppenheim, *Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development.* Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 1-35.
150. Burls, A., et al., *Absence of Nerve - muscle Interaction Influences the Survival of Developing Motoneurons.* Eur J Neurosci, 1991. **3**(3): p. 216-21.
151. Lowrie, M.B. and G. Vrbova, *Dependence of postnatal motoneurones on their targets: review and hypothesis.* Trends Neurosci, 1992. **15**(3): p. 80-4.
152. Edenfeld, G., T. Stork, and C. Klambt, *Neuron-glia interaction in the insect nervous system.* Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(1): p. 34-9.
153. Oland, L.A. and L.P. Tolbert, *Key interactions between neurons and glial cells during neural development in insects.* Annu Rev Entomol, 2003. **48**: p. 89-110.
154. Milligan, C. and D. Gifondorwa, *Isolation and culture of postnatal spinal motoneurons.* Methods Mol Biol, 2011. **793**: p. 77-85.
155. Oppenheim, R.W., *Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches.* Neuron, 1996. **17**(2): p. 195-7.
156. Lamballe, F., et al., *Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support.* J Neurosci, 2011. **31**(31): p. 11144-58.
157. Verhovshek, T., L.M. Rudolph, and D.R. Sengelaub, *Brain-derived neurotrophic factor and androgen interactions in spinal neuromuscular systems.* Neuroscience, 2012.
158. Wendell-Smith, C.P., M.J. Blunt, and F. Baldwin, *The ultrastructural characterization of macroglial cell types.* J Comp Neurol, 1966. **127**(2): p. 219-40.
159. Gingras, M., et al., *In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model.* Glia, 2008. **56**(3): p. 354-64.
160. Brain, N.I.o.N.D.a. Stroke, and N.I.o. Health. *neuron architecture*. 2012; Available from: http://www.ninds.nih.gov/disorders/brain_basics/ninds_neuron.htm.
161. Anderson, C.R., et al., *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas* First Edition ed. 2009, New Yourk: Elsevier Ltd.
162. Greensmith, L. and G. Vrbova, *Motoneurone survival: a functional approach.* Trends Neurosci, 1996. **19**(11): p. 450-5.
163. Kuno, M., *Target dependence of motoneuronal survival: the current status.* Neurosci Res, 1990. **9**(3): p. 155-72.
164. Nogradi, A. and G. Vrbova, *Improved motor function of denervated rat hindlimb muscles induced by embryonic spinal cord grafts.* Eur J Neurosci, 1996. **8**(10): p. 2198-203.
165. Linda, H., et al., *Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons.* Exp Brain Res, 1992. **91**(2): p. 284-95.
166. Chang, H.Y. and L.A. Havton, *Surgical implantation of avulsed lumbosacral ventral roots promotes restoration of bladder morphology in rats.* Exp Neurol, 2008. **214**(1): p. 117-24.
167. Carlstedt, T., *Nerve root replantation.* Neurosurg Clin N Am, 2009. **20**(1): p. 39-50, vi.
168. Koliatsos, V.E., et al., *Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons.* J Comp Neurol, 1994. **342**(1): p. 35-44.
169. Li, L., et al., *Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice.* J Comp Neurol, 1998. **396**(2): p. 158-68.
170. De Freria, C.M., R. Barbizan, and A.L. De Oliveira, *Granulocyte colony stimulating factor neuroprotective effects on spinal motoneurons after ventral root avulsion.* Synapse, 2012. **66**(2): p. 128-41.

171. Snider, W.D., J.L. Elliott, and Q. Yan, *Axotomy-induced neuronal death during development.* J Neurobiol, 1992. **23**(9): p. 1231-46.
172. Selvaraj, B.T., et al., *Local axonal function of STAT3 rescues axon degeneration in the pmn model of motoneuron disease.* J Cell Biol, 2012. **199**(3): p. 437-51.
173. Fontana, X., et al., *c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling.* J Cell Biol, 2012. **198**(1): p. 127-41.
174. Liu, C., et al., *Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury.* Brain Res, 2011. **1374**: p. 100-9.
175. Martin, L.J. and Z. Liu, *Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is p53- and Bax-dependent.* J Neurobiol, 2002. **50**(3): p. 181-97.
176. Park, O.H., et al., *Bax-dependent and -independent death of motoneurons after facial nerve injury in adult mice.* Eur J Neurosci, 2007. **26**(6): p. 1421-32.
177. Yamada, M., et al., *Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 protects spinal motor neurons from degeneration following root avulsion.* Exp Neurol, 2001. **168**(2): p. 225-30.
178. Chan, Y.M., et al., *Caspase inhibitors promote the survival of avulsed spinal motoneurons in neonatal rats.* Neuroreport, 2001. **12**(3): p. 541-5.
179. Oliveira, A.L. and F. Langone, *GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats.* Neurosci Lett, 2000. **293**(2): p. 131-4.
180. Flores, L.P., *[Epidemiological study of the traumatic brachial plexus injuries in adults].* Arq Neuropsiquiatr, 2006. **64**(1): p. 88-94.
181. Romanes, G.J., *Motor localization and the effects of nerve injury on the ventral horn cells of the spinal cord.* J Anat, 1946. **80**(Pt 3): p. 117-31.
182. Umemiya, M., I. Araki, and M. Kuno, *Electrophysiological properties of axotomized facial motoneurones that are destined to die in neonatal rats.* J Physiol, 1993. **462**: p. 661-78.
183. Mentis, G.Z., et al., *Early alterations in the electrophysiological properties of rat spinal motoneurones following neonatal axotomy.* J Physiol, 2007. **582**(Pt 3): p. 1141-61.
184. Vergun, O., et al., *Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture.* J Physiol, 2001. **531**(Pt 1): p. 147-63.
185. Mehta, A., et al., *Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders.* Eur J Pharmacol, 2013. **698**(1-3): p. 6-18.
186. Kostic, M., N. Zivkovic, and I. Stojanovic, *Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity.* Rev Neurosci, 2012: p. 1-18.
187. Amalric, M., et al., *Group III and subtype 4 metabotropic glutamate receptor agonists: Discovery and pathophysiological applications in Parkinson's disease.* Neuropharmacology, 2013. **66**: p. 53-64.
188. Brannstrom, T. and J.O. Kellerth, *Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy.* Exp Brain Res, 1998. **118**(1): p. 1-13.
189. Delgado-Garcia, J.M., et al., *Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--III. Axotomized motoneurons.* Neuroscience, 1988. **24**(1): p. 143-60.
190. Barbizan, R. and A.L. Oliveira, *Impact of acute inflammation on spinal motoneuron synaptic plasticity following ventral root avulsion.* J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 29.
191. Cullheim, S., et al., *Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord.* Brain Res Brain Res Rev, 2002. **40**(1-3): p. 309-16.

192. Oliveira, A.L., et al., *A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17843-8.
193. Linda, H., et al., *Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy.* J Comp Neurol, 2000. **425**(1): p. 10-23.
194. Piehl, F., et al., *Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury.* Exp Brain Res, 1998. **119**(2): p. 191-204.
195. Ernfors, P., et al., *Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons.* Neuron, 1989. **2**(6): p. 1605-13.
196. Aebischer, J., et al., *Necdin protects embryonic motoneurons from programmed cell death.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23764.
197. Piehl, F., et al., *Increased trkB mRNA expression by axotomized motoneurones.* Neuroreport, 1994. **5**(6): p. 697-700.
198. Reichardt, L.F., *Neurotrophin-regulated signalling pathways.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1545-64.
199. Paratcha, G. and F. Ledda, *GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons.* Trends Neurosci, 2008. **31**(8): p. 384-91.
200. Alsina, F.C., F. Ledda, and G. Paratcha, *New insights into the control of neurotrophic growth factor receptor signaling: implications for nervous system development and repair.* J Neurochem, 2012. **123**(5): p. 652-61.
201. Clatterbuck, R.E., D.L. Price, and V.E. Koliatsos, *Further characterization of the effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor on axotomized neonatal and adult mammalian motor neurons.* J Comp Neurol, 1994. **342**(1): p. 45-56.
202. Birling, M.C. and J. Price, *Influence of growth factors on neuronal differentiation.* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 878-84.
203. Hawryluk, G.W., et al., *An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury.* Stem Cells Dev, 2012. **21**(12): p. 2222-38.
204. Yan, Q., J. Elliott, and W.D. Snider, *Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death.* Nature, 1992. **360**(6406): p. 753-5.
205. Ghitza, U.E., et al., *Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review.* Neurosci Biobehav Rev, 2010. **35**(2): p. 157-71.
206. Terenghi, G., *Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors.* J Anat, 1999. **194 (Pt 1)**: p. 1-14.
207. Usui, N., et al., *Role of motoneuron-derived neurotrophin 3 in survival and axonal projection of sensory neurons during neural circuit formation.* Development, 2012. **139**(6): p. 1125-32.
208. Vejsada, R., Y. Sagot, and A.C. Kato, *Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo.* Eur J Neurosci, 1995. **7**(1): p. 108-15.
209. Airaksinen, M.S. and M. Saarma, *The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value.* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(5): p. 383-94.
210. Boyd, J.G. and T. Gordon, *Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo.* Exp Neurol, 2003. **183**(2): p. 610-9.
211. Vejsada, R., et al., *Synergistic but transient rescue effects of BDNF and GDNF on axotomized neonatal motoneurons.* Neuroscience, 1998. **84**(1): p. 129-39.

212. Kishino, A., et al., *BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth.* Exp Neurol, 1997. **144**(2): p. 273-86.
213. Watabe, K., Y. Hayashi, and Y. Kawazoe, *Peripheral nerve avulsion injuries as experimental models for adult motoneuron degeneration.* Neuropathology, 2005. **25**(4): p. 371-80.
214. Martin, L.J., K. Chen, and Z. Liu, *Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation.* J Neurosci, 2005. **25**(27): p. 6449-59.
215. Kasahara, K., T. Nakagawa, and T. Kubota, *Neuronal loss and expression of neurotrophic factors in a model of rat chronic compressive spinal cord injury.* Spine (Phila Pa 1976), 2006. **31**(18): p. 2059-66.
216. Douglas-Escobar, M., et al., *Neurotrophin-induced migration and neuronal differentiation of multipotent astrocytic stem cells in vitro.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51706.
217. Galindo-Romero, C., et al., *Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013.
218. Frias, B., et al., *Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), acting at the spinal cord level, participates in bladder hyperactivity and referred pain during chronic bladder inflammation.* Neuroscience, 2013.
219. Boulanger, L.M., G.S. Huh, and C.J. Shatz, *Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms.* Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(5): p. 568-78.
220. Rouach, N. and C. Giaume, *Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction.* Prog Brain Res, 2001. **132**: p. 203-14.
221. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *Neuroglia: the 150 years after.* Trends Neurosci, 2008. **31**(12): p. 653-9.
222. Herbrandson, C., *Learning the Nervous System*. 2005: Kellogg Community College.
223. Liu, W., et al., *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase antagonizes morphine antinociceptive tolerance by decreasing activation of p38 MAPK in the spinal microglia.* Neurosci Lett, 2006. **410**(3): p. 174-7.
224. Verge, G.M., et al., *Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions.* Eur J Neurosci, 2004. **20**(5): p. 1150-60.
225. Fitch, M.T. and J. Silver, *CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure.* Exp Neurol, 2008. **209**(2): p. 294-301.
226. Kawano, H., et al., *Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system.* Cell Tissue Res, 2012. **349**(1): p. 169-80.
227. Araque, A. and G. Perea, *Glial modulation of synaptic transmission in culture.* Glia, 2004. **47**(3): p. 241-8.
228. Jessen, K.R., *Glial cells.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1861-7.
229. Tanigami, H., et al., *Astroglial integrins in the development and regulation of neurovascular units.* Pain Res Treat, 2012. **2012**: p. 964652.
230. Aldskogius, H. and E.N. Kozlova, *Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury.* Prog Neurobiol, 1998. **55**(1): p. 1-26.
231. Kawano, H., et al., *Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48034.
232. Guthrie, P.B., et al., *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves.* J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 520-8.
233. Nedergaard, M., B. Ransom, and S.A. Goldman, *New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain.* Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 523-30.

234. Haydon, P.G. and G. Carmignoto, *Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling.* Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 1009-31.
235. Bush, T.G., et al., *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice.* Neuron, 1999. **23**(2): p. 297-308.
236. Verkhratsky, A., J.J. Rodriguez, and V. Parpura, *Neurotransmitters and integration in neuronal-astroglial networks.* Neurochem Res, 2012. **37**(11): p. 2326-38.
237. Spacek, J., *Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath.* Anat Embryol (Berl), 1985. **171**(2): p. 245-52.
238. Schools, G.P. and H.K. Kimelberg, *mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats.* J Neurosci Res, 1999. **58**(4): p. 533-43.
239. Verkhratsky, A. and C. Steinhauser, *Ion channels in glial cells.* Brain Res Brain Res Rev, 2000. **32**(2-3): p. 380-412.
240. Derouiche, A. and T. Rauen, *Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance.* J Neurosci Res, 1995. **42**(1): p. 131-43.
241. Sykova, E. and A. Chvatal, *Glial cells and volume transmission in the CNS.* Neurochem Int, 2000. **36**(4-5): p. 397-409.
242. Araque, A., et al., *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner.* Trends Neurosci, 1999. **22**(5): p. 208-15.
243. Oliet, S.H., R. Piet, and D.A. Poulain, *Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons.* Science, 2001. **292**(5518): p. 923-6.
244. Grosche, J., et al., *Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells.* Nat Neurosci, 1999. **2**(2): p. 139-43.
245. Kang, J., et al., *Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission.* Nat Neurosci, 1998. **1**(8): p. 683-92.
246. Aldskogius, H., L. Liu, and M. Svensson, *Glial responses to synaptic damage and plasticity.* J Neurosci Res, 1999. **58**(1): p. 33-41.
247. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).* Neurochem Res, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.
248. Norton, W.T., et al., *Quantitative aspects of reactive gliosis: a review.* Neurochem Res, 1992. **17**(9): p. 877-85.
249. Privat, A., J. Valat, and J. Fulcrand, *Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study.* J Neuropathol Exp Neurol, 1981. **40**(1): p. 46-60.
250. Gimenez y Ribotta, M., V. Menet, and A. Privat, *The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS.* Prog Brain Res, 2001. **132**: p. 587-610.
251. Rogers, S.D., et al., *Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS.* Glia, 2003. **41**(2): p. 180-90.
252. Emirandetti, A., et al., *Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy.* Brain Res, 2006. **1095**(1): p. 35-42.
253. Tetzlaff, W., et al., *Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus.* Glia, 1988. **1**(1): p. 90-5.
254. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.* Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
255. David, S. and A. Kroner, *Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury.* Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(7): p. 388-99.

256. Probert, L., et al., *TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease.* Brain, 2000. **123 (Pt 10)**: p. 2005-19.
257. Genovese, T., et al., *TNF-alpha blockage in a mouse model of SCI: evidence for improved outcome.* Shock, 2008. **29**(1): p. 32-41.
258. Lijia, Z., et al., *A self-propelling cycle mediated by reactive oxide species and nitric oxide exists in LPS-activated microglia.* Neurochem Int, 2012. **61**(7): p. 1220-30.
259. Li, J., M.B. Ezzelarab, and D.K. Cooper, *Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation.* Xenotransplantation, 2012. **19**(5): p. 273-85.
260. Lin, C.S., G. Lin, and T.F. Lue, *Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants.* Stem Cells Dev, 2012. **21**(15): p. 2770-8.
261. Niemeyer, P., et al., *Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro.* Tissue Eng, 2007. **13**(1): p. 111-21.
262. Cui, L., et al., *Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2.* Tissue Eng, 2007. **13**(6): p. 1185-95.
263. Yanez, R., et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease.* Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2582-91.
264. Neuhuber, B., 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, 2005. **1035**(1): p. 73-85.
265. Lee, J.H., et al., *Schwann cell-like remyelination following transplantation of human umbilical cord blood (hUCB)-derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury.* J Neurol Sci, 2011. **300**(1-2): p. 86-96.
266. Tobita, M., H. Orbay, and H. Mizuno, *Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives.* Discov Med, 2011. **11**(57): p. 160-70.
267. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.* Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
268. Kim, W.S., B.S. Park, and J.H. Sung, *Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging.* Arch Dermatol Res, 2009. **301**(5): p. 329-36.
269. Lee, R.H., et al., *Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair.* J Cell Biochem, 2011. **112**(11): p. 3073-8.
270. Ferrand, J., et al., *Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells.* PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19569.
271. Cabanes, C., et al., *Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration.* Neurobiol Dis, 2007. **26**(2): p. 408-18.
272. Cizkova, D., et al., *Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells.* Neuroscience, 2007. **147**(2): p. 546-60.
273. Pastor, D., et al., *Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motorneuron degenerative mouse model.* Stem Cell Rev, 2012. **8**(2): p. 445-58.
274. Peng, W., et al., *Adipose-derived stem cells induced dendritic cells undergo tolerance and inhibit Th1 polarization.* Cell Immunol, 2012. **278**(1-2): p. 152-7.
275. Bassi, E.J., et al., *Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes.* Diabetes, 2012. **61**(10): p. 2534-45.

276. Hammarberg, H., et al., *Regulation of laminin-associated integrin subunit mRNAs in rat spinal motoneurons during postnatal development and after axonal injury.* J Comp Neurol, 2000. **428**(2): p. 294-304.
277. Lopatina, T., et al., *Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo.* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17899.
278. Dasari, V.R., et al., *Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats.* Neurochem Res, 2007. **32**(12): p. 2080-93.
279. Reid, A.J., et al., *Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis.* Neuroscience, 2011. **199**: p. 515-22.
280. Yang, K.L., et al., *Human adipose-derived stem cells for the treatment of intracerebral hemorrhage in rats via femoral intravenous injection.* Cell Mol Biol Lett, 2012. **17**(3): p. 376-92.
281. Arce, V., et al., *Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1).* J Neurosci, 1998. **18**(4): p. 1440-8.
282. Kakudo, N., et al., *Effects of transforming growth factor-beta1 on cell motility, collagen gel contraction, myofibroblastic differentiation, and extracellular matrix expression of human adipose-derived stem cell.* Hum Cell, 2012. **25**(4): p. 87-95.
283. Cho, K.S., et al., *IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model.* Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 259-65.
284. Kurozumi, K., et al., *BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model.* Mol Ther, 2004. **9**(2): p. 189-97.
285. Sasaki, M., et al., *BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury.* J Neurosci, 2009. **29**(47): p. 14932-41.
286. Wiedenmann, B., et al., *Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3500-4.
287. Calhoun, M.E., et al., *Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses.* J Neurocytol, 1996. **25**(12): p. 821-8.
288. Novikov, L.N., et al., *Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons.* Neuroscience, 2000. **100**(1): p. 171-81.
289. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar.* Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.
290. Lu, P., L.L. Jones, and M.H. Tuszynski, *Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury.* Exp Neurol, 2007. **203**(1): p. 8-21.
291. Menet, V., et al., *GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth.* Glia, 2000. **31**(3): p. 267-72.
292. Yu, P., et al., *An in vitro model of reactive astrogliosis and its effect on neuronal growth.* Methods Mol Biol, 2012. **814**: p. 327-40.
293. Ghasemlou, N., et al., *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) contributes to secondary damage after spinal cord injury.* J Neurosci, 2010. **30**(41): p. 13750-9.
294. Ghasemlou, N., et al., *Beneficial effects of secretory leukocyte protease inhibitor after spinal cord injury.* Brain, 2010. **133**(Pt 1): p. 126-38.

295. Galtrey, C.M. and J.W. Fawcett, *The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system.* Brain Res Rev, 2007. **54**(1): p. 1-18.
296. Ledeboer, A., et al., *Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells.* Glia, 2000. **30**(2): p. 134-42.
297. Wirjatijasa, F., et al., *Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells.* J Neurosci Res, 2002. **68**(5): p. 579-87.
298. Spittau, B., et al., *Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro.* Glia, 2013. **61**(2): p. 287-300.
299. Zhou, Z., et al., *Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury.* Cytotherapy, 2013. **15**(4): p. 434-48.

8. Anexos

8.1. Anexo1- Comitê de ética Faculdade de Ciências Medicas

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 06/11/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 839/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0667.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDO *ADIPOSO (ADSC), DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E MARCAÇÃO COM* NANOPARTÍCULAS SUPER-PARAMAGNÉTICAS".**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/Unicamp
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/10/2008
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 06/11/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Obter células mesenquimais a partir de material de descarte de lipoaspiração, diferenciá-las em neurônios e marcá-las com nanopartículas super-paramagnéticas.

III - SUMÁRIO

Será coletado material de oito sujeitos submetidos a procedimento cirúrgico (lipoaspiração), sendo solicitado consentimento para utilização deste material, que seria descartado, para a presente pesquisa. As células obtidas serão manuseados em laboratório visando a obtenção de células tronco e sua diferenciação em células neuronais, as quais serão marcadas com nanopartículas super-paramagnéticas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Recomendação: Acertar o telefone do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de outubro de 2008.

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

8.2.Anexo2- Comitê de Ética-Instituto de Biologia

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O,

Certificamos que o projeto **"Cultura de Células Mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ADSC), Diferenciação Neuronal em Modelo de Avulsão da Raiz Nervosa Dorsal"** (protocolo nº **2543-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad / Thiago Borsoi Ribeiro**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **07 de novembro de 2011**.

Campinas, 07 de novembro de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/UNICAMP

2543-1	Protocolo para uso de animais em pesquisa		
Protocolo	1ª submissão		
Título do projeto	Cultura de Células Mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ADSC), Diferenciação Neuronal em Modelo de Avulsão da Raiz Nervosa Dorsal		
Interessado	Thiago Borsoi Ribeiro		
Unidade	Faculdade de Ciências Médicas		
Departamento / Setor	Dep. De Fisiopatolgia Médica _ Hemocentro		
Contato	Thiago	Ramal	18734
E-mail	thiagoborsoiribeiro@gmail.com		
1. Finalidade			
Finalidade do projeto	Pesquisa		
2. Período			
Início	03/2008	Término	02/2013
3. Pesquisador(es)			
Executor	Thiago Borsoi Ribeiro		
Nível acadêmico	Doutorado		
Nome do orientador	Profa Dra Sara Teresinha Olalla Saad		
Faculdade / Instituto	Faculdade de Ciências Médicas		
Departamento	Dep. de Fisiopatologia Médicas		
Telefone / Ramal	3521-8734	Fax	
E-mail	thiagoborsoiribeiro@gmail.com		
Agência Financiadora	CNPq		
Colaboradores			
Nome	Prof Dr Alexandre Leite R. de Oliveira		
Nível acadêmico	Doutorado		
Faculdade / Instituto	Faculdade de Ciêcias Biologicas - IB		
Departamento	Dep. de Anatomia		
Telefone / Ramal	3521-6295	E-mail	alreoliv@unicamp.br
4. Título do Projeto			
Em Português	Cultura de Células Mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ADSC), Diferenciação Neuronal em Modelo de Avulsão da Raiz Nervosa Dorsal		
Em Inglês (opcional)	Culture of mesenchymal cells obtained from adipose tissue (ADSC), and Neuronal Differentiation in Dorsal Nerve Root Avulsion Model		
5. Objetivo(s) da Pesquisa			
5.1 Descrição	O tecido adiposo é uma nova fonte de células-tronco mesenquimal que tem potencial de se diferenciarem em osteocitos, condrocitos, adipocitos e outros tipos celulares, tais como células neuronais. A possibilidade do uso de células mesenquimais numa futura terapia regenerativa de tecido nervoso é promissora, uma vez que há descrito na literatura o uso delas em diversos modelos nervosos (AVC – Acidente Vascular Cerebral). Também já é de conhecimento que as células mesenquimais tambem		

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea

8.3. Anexo3- Termo de consentimento

- TERMO DE CONSENTIMENTO -

Tecido adiposo

Eu, _____, registro hospitalar: _____, RG: _____, autorizo a doação de 20 ml de tecido adiposo, coletados durante a cirurgia de lipoaspiração a que serei submetida em _____/_____/_____. Este material será utilizado para pesquisa a serem realizadas na UNICAMP. Informo que fui devidamente esclarecido (a) sobre todas as possíveis intercorrências que possam decorrer deste procedimento, já descritas no termo de consentimento livre esclarecido de autorização para cirurgia. Fui informado(a) que se não quiser autorizar esta doação, não haverá nenhum prejuizo ao meu atendimento nestes hospitais (Complexo Hospitalar HC, CAISM, Hemocentro da UNICAMP).

Informaram-me de que o material coletado será utilizado na pesquisa "Cultura de Células Mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ADSC), diferenciação neuronal e marcação com nanoparticula super-paramagnética" e será conduzido pelo aluno de mestrado Thiago Borsoi Ribeiro sob orientação da Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad. O projeto consiste na extração de células do material coletado de tecido adiposo (lipoaspiração) e o estudo destas células no processo de diferenciação neuronal e marcação por particulas magnéticas.

Todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas e minhas dúvidas esclarecidas. A opção de doação foi tomada de modo consciente, livre e voluntário.

_____

Doador

Campinas, _____/_____/_____

Telefone para contato

Pesquisador (Hemocentro): (19) 35218734

Comitê de Ética da Unicamp: (19) 3521-8942