# ERIKA TOLEDO DA FONSECA

Identificação de áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (Cavia porcellus, Linnaeus 1758): cultura, caracterização e diferenciação de precursores neurais



São Paulo 2012

# ERIKA TOLEDO DA FONSECA

# Identificação de áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (*Cavia porcellus*, Linnaeus 1758): cultura, caracterização e diferenciação de precursores neurais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

# Departamento:

Cirurgia

**Área de Concentração:** Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Miglino

São Paulo 2012 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÀPICE FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP 22/11/12

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2709
Fonseca, Erika Toledo da Identificação de áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (*Cavia porcellus*, Linnaeus 1758): cultura, caracterização e diferenciação de precursores neurais / Erika Toledo da Fonseca. -- 2012. 89 f. : il.
Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.
Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.
1. Cobaias. 2. Células-tronco. 3. Neurais. 4. Zona subventricular. 5. Cultura.
6. Caracterização in vitro. I. Título.

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação de áreas neurogênicas do sistema nervoso central de guinea pigs (*Cavia porcellus*): cultivo, caracterização e diferenciação de precursores neurais", protocolado sob o nº 1999/2010, utilizando 5 (cinco) guinea pigs, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/09/2010.

We certify that the Research "Identification of neurogenic areas in the central nervous system of guinea pigs (*Cavia porcellus*): culture, characterization and differentiation of neural precursors", protocol number 1999/2010, utilizing 5 (five) guinea pigs, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/29/2010.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP – Brasil 05508-270 Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757 Fone: + 55 11 3091-7671/7676 E-mail: fmvz@usp.br http://www.fmvz.usp.br

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FONSECA, Erika Toledo da

Título: Identificação de áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (*Cavia porcellus*, Linnaeus1758): cultura, caracterização e diferenciação de precursores neurais

> Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Prof. Dr.

Banca Examinadora

Instituição:	Julgamento:

Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:

Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:

Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:

Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:

# DEDICATÓRIA

À minha mãe **Suely**, meu irmão **Átila** e meu namorado **Eduardo Flores**. Sem o amor e apoio de vocês eu não teria conseguido!

### AGRADECIMENTOS

No decorrer desta jornada muitos foram os obstáculos e muitos foram os desafios, mas sempre tive a sorte de ter em meu caminho pessoas amigas com as quais eu pude contar, seja para dar uma ajuda técnica ou uma palavra de conforto num momento difícil. A todos vocês meu muito obrigada!

Ao meu pai **Roberto** pelo exemplo de superação na vida, à minha prima-irmã **Edna** pela amizade eterna e à minha tia **Cida**: família é a base de tudo! Palavras são insuficientes para agradecer à todos de minha família que me apoiaram e me incentivaram, não só durante esta jornada, mas em todos os momentos da minha vida.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida de realizar o curso de Pós-graduação.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, pela orientação deste trabalho.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À querida **Layla** pelos grandes ensinamentos e ajuda indispensável na realização deste trabalho. Você é um anjinho que caiu do céu em minha vida!

A **Profa. Dra. Marimélia Porcionatto**, por disponibilizar seu laboratório para a realização de grande parte deste projeto de pesquisa. Este apoio foi fundamental!

À todos os colegas e amigos da pós-graduação em especial André Luís Franciolli, Carlos Alberto Sarmento, Dayane Alcântara, Fernanda Menezes, Graciela Pignatari, Greyson Esper, Juliana Passos, Márcio Nogueira, Marina Brolio, Paula Fratini, Phelipe Favaron, Rafael Cardoso Carvalho e Valdir Pavanelo. Vocês fizeram deste um caminho muito mais leve de se trilhar. E por isso têm minha eterna gratidão!

Aos funcionários e técnicos de laboratório: Rosemary dos Santos, Jaqueline Santana, Maicon Barbosa, Rose Eli Graci e Ronaldo Agostinho, por facilitar o nosso dia-a-dia durante a pós-graduação.

À Desirrèe Cristina, Epaminondas Augusto (*in memorian*), Cangibrina Alice, Pitty, Filha e Mel (*in memorian*). Vocês são minha inspiração.

"Não importa se os animais são incapazes ou não de pensar. O que importa é que são capazes de sofrer"

(Jeremy Bentham)

"Obstáculos são aquelas coisas medonhas que você vê quando tira os olhos do seu

objetivo"

Henry Ford

### RESUMO

FONSECA, E. T. Identificação de áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (*Cavia porcellus*, Linnaeus 1758): cultura, caracterização e diferenciação de precursores neurais. [Identification of neurogenic areas in the central nervous system of guinea pigs (*Cavia porcellus*): culture, characterization and differentiation of neural precursors]. 2012. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente trabalho relata a identificação de áreas neurogênicas, o cultivo, identificação e caracterização de precursores neurais obtidos do encéfalo de fetos de cobaias. Areas potencialmente neurogênicas no encéfalo de neonatos foram identificadas por imunohistoquímica para a bromodeoxiuridina (BrdU), após inoculação da droga. A incorporação de BrdU foi detectada principalmente em células das áreas subjacentes ao ventrículo lateral, hipocampo e bulbo olfatório, indicando proliferação celular e sugerindo o potencial neurogênico dessas áreas. A seguir, realizou-se o cultivo de precursores neurais a partir da zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais. Após aproximadamente uma semana de cultivo, as células da SVZ em multiplicação ativa originaram abundantes massas celulares (neuroesferas, NSFs). Células dissociadas a partir das NSFs primárias foram capazes de gerar novas neuroesferas após alguns dias de cultivo. As NSFs proliferaram em número e em tamanho, podendo ser subcultivadas por até 5-6 passagens, com intervalos de uma semana, permanecendo viáveis por até 60 dias. Nesse período, as NSFs foram congeladas e descongeladas, tendo sido preservadas a sua viabilidade e capacidade proliferativa. Ensaios de viabilidade pelo método colorimétrico de MTT revelaram diferenças de viabilidade entre NSFs cultivadas a partir de SVZs de animais de diferentes idades (fetos, 7, 30 e 180 dias de vida). NSFs dissociadas apresentaram cerca de 2,3% de morte celular por apoptose e cerca de 3,1% de morte por necrose. NSFs íntegras e dissociadas foram submetidas a imunofluorescência (IF), utilizando-se anticorpos para marcadores de células-tronco (nestina), neurônios (Beta-III-tubulina), oligodendrócitos (mGALC) e astrócitos (GFAP). Marcação difusa, de intensidade variável, foi observada no citoplasma de células das NSFs e nas células individualizadas, mas o percentual de células expressando os diferentes marcadores não foi determinado. Quando cultivadas em meio contendo B27, sem fatores de crescimento, as NSFs apresentaram evidências de diferenciação,

originando células aderentes a superfície do frasco, com características morfológicas diferentes as das NSFs, indicando diferenciação. Citometria de fluxo de células das NSFs após a diferenciação revelou 13,3% positivas para nestina, aproximadamente 5,5% positivas para beta-III-tubulina, 9% positivas para GFAP e 7,8% positivas para mGaIC. Células diferenciadas foram então submetidas a teste de funcionalidade, pela mensuração de influxo de cálcio após estímulo com ácido gama amino butírico (GABA) e glutamato. A adição de GABA e glutamato resultou em estimulação de algumas células diferenciadas, que foi observado por meio do aumento da fluorescência das mesmas. Portanto, células cultivadas e diferenciadas *in vitro* a partir da SVZ de fetos de cobaias apresentam indicadores funcionais de neurônios. A capacidade das células da SVZ de fetos cobaias originarem células neurais funcionais *in vitro* é promissora no sentido de aprofundar as pesquisas e viabilizar o uso terapêutico de células-tronco em disordens do sistema nervoso.

Palavras-chave: Cobaias, Células-tronco neurais, Zona subventricular, Cultura e Caracterização *in vitro.* 

### ABSTRACT

FONSECA, E. T. Identification of neurogenic areas in the central nervous system of guinea pigs (*Cavia porcellus*, Linnaeus 1758): culture, characterization and differentiation of neural precursors. [Identificação de áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (*Cavia porcellus*, Linnaeus 1758): cultura, caracterização e diferenciação de precursores neurais]. 2012. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The present study concerns the identification of neurogenic areas, culture, identification and characterization of neural precursors obtained from the brain of guinea pigs. Potentially neurogenic areas in the brain of neonates were identified by immunohistochemistry for bromodeoxyuridine (BrdU), following administration of the drug. BrdU incorporation was detected mainly in cells underlying the lateral ventricle, in hippocampus and olfactory bulbs, indicating cell proliferation and suggesting a neurogenic potential for these areas. Subsequently, neural precursors were cultured from cells obtained from the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles. After approximately one week culture, SVZ cells in active multiplication originated abundant cellular masses (neurospheres, NSFs). Cells dissociated from primary NSFs were capable of originating new NSFs after a few days of culture. NSFs proliferated in number and size, allowing 5-6 weekly subculturings and maintaining growth and viability for up to 60 days. In the meantime, NSFs were frozen and thawed, maintaining the viability and proliferative ability. Viability assays by the colorimetric MTT revealed viability differences among NSFs originated from SVZs from animals of different ages (fetuses, 7, 30 and 180 days of age). Dissociated NSFs underwent approximately 2.3% cell death by apoptosis and 3.1% death by necrosis. Intact and dissociated NSFs were submitted to immunofluorescence (IF), using antibodies for cell markers of stem cells (nestin), neurons (beta-III tubulin), oligodendrocytes (mGalC) and astrocytes (GFAP). A diffuse staining of variable intensity was observed in the cytoplasm of NSFS and dissociated cells, yet the rate of cells expressing each individual marker could not be determined. Upon culture in medium containing B27, without NSFs-specific growth factors, NSFs displayed evidence of neural differentiation, originating cells with morphology distinct from that of NSFs, suggesting differentiation. Flow cytometry analysis of NSFs cells after differentiation revealed approximately 13.3% positive for nestin, around 5.5% positive for beta-III-tubulin, 9% GFAP positive and approximately 7.8% positive for mGalC. Differentiated cells were then submitted to a functional test, by measuring calcium influx upon gamma butiric amino acid (GABA) and glutamate stimuli. GABA and glutamate stimulated some differentiated cells. Thus, cells cultured and differentiated from guinea pig SVZ present physiological indicators of neuronal physiology. Thus, the ability of guinea pig SVZ cells to originate functional neurons *in vitro* is promising towards further studies and potential therapeutic use of neural stem cells in disorders of the nervous system.

Key words: Guinea pigs, Neural stem cells, Subventricular zone, Culture and *In vitro* characterization.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenvolvimento do sistema nervoso central	17
Figura 2 -	Desenvolvimento das principais regiões do encéfalo	18
Figura 3 -	Células-tronco neurais (CTNs) durante o desenvolvimento embrionário/fetal e no adulto	21
Figura 4 -	Áreas neurogênicas do encéfalo	25
Figura 5 -	Rota migratória rostral	26
Figura 6 -	Organização e linhagem celular na zona subventricular (SVZ)	27
Figura 7 -	Incorporação de BrdU em áreas do encéfalo de cobaias	52
Figura 8 -	Neuroesferas derivadas da zona subventricular (SVZ) de fetos de cobaias	53
Figura 9 -	Subcultivos de neurosferas (NSFs) derivadas da SVZ de fetos de cobaias	54
Figura 10 -	Subcultivo de neurosferas (NSFs) derivadas da SVZ de fetos de cobaias, após dissociação enzimática	55
Figura 11 -	Cultivo de células descongeladas derivadas da zona subventriluar (SVZ) de fetos de cobaias cultivadas como neuroesferas	56
Figura 12 -	Viabilidade das células derivadas da zona subventricular (SVZ) de cobaias	58
Figura 13 -	Morte celular por apoptose	59
Figura 14-	Ensaios de diferenciação celular de células derivadas da zona subventricular (SVZ) de fetos de cobaias cultivadas como neurosferas (NSFs)	60
Figura 15 -	Imunofluorescência (IF) em células de neurosferas (NSFs) cultivadas sob condições de diferenciação	62
Figura 16 -	Dot Plot e histogramas da imunofenotipagem das NSFs diferenciadas provenientes de fetos de cobaias	64
Figura 17 -	Células provenientes de NSFs cultivadas sob condições de diferenciação incubadas com o marcador de Ca <sup>2+</sup> intracelular Fluo 3AM	66

# LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Marcadores de células-tronco neurais (CTNs) e células diferenciadas	31
Quadro 2 -	Anticorpos primários utilizados para caracterização/quantificação das células da SVZ de cobaias por meio da técnica de imunofluorescência e citometria de fluxo	46
Quadro 3 -	Anticorpos secundários utilizados para caracterização das células da SVZ de cobaias por meio da técnica de imunofluorescência	47
Quadro 4 -	Anticorpos secundários utilizados para quantificação das células diferenciadas derivadas da SVZ de cobaias por meio da técnica de citometria de fluxo	48

# LISTA DE ABREVIATURAS

AVE	Acidente vascular encefálico
BMP4	Proteína óssea morfogenética
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbon
-COOH	Ácido carboxílico
CTNs	Células-tronco Neurais
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GalC	Galactocerebroside
GD	Giro denteado
GFAP	Glial Acidic Fibrillary Protein
IF	Imunofluorescência
lgG	Imunoglobulina da classe G
IM	Intramuscular
MAP2ab	Microtubule Associated Protein 2ab
MTT	Brometo de 3,-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5, difeniltetrazoilo
NE	Neuroepitélio
NeuN	Neuron-Specific Nuclear Protein
NSFs	Neuroesferas
O1	Oligodendrocyte Marker O1
O4	Oligodendrocyte Marker O4
OB	Olfactory bulb

PBS	Tampão Salina Fosfato
PFA	Paraformoldeído
Poly-hema	Poli [2-hidroxietil metacrilato]
PSA-NCAM	Poly-Sialated Neural Cell Adhesion Molecule
Rpm	Rotação por minute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SFB	Soro Fetal Bovino
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+-</sup> ATPase
SGZ	Subgranular zone
SNC	Sistema Nervoso Central
-SO3	Trióxido de enxofre
Sox2	SRY bom2, sex determining regin Y-2
SVZ	Subventricular Zone
SVZa	Anterior subventriular zone
SVZp	Posterior subventricular zone
TBS	Tris buffered saline
TEXAS RED	Sulforhodamine 101 acid chlorid
Tuj1	Neuron-specific class III $\beta$ – tubulin
Vectashield	Mounting medium for fluorescence – with DAPI
VZ	Ventricular Zone
β-III tubulin	Classe III β-tubulina
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA	12
1.2 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	13
	15
	15
	15
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	17
3.1.1 Sinapses do Sistema Nervoso Central	21
3.2 COBAIAS (CAVIA PORCELLUS)	23
3.3 CÉLULAS-TRONCO NEURAIS E ÁREAS NEUROGÊNICAS	23
3.4 ÁREAS NEUROGÊNICAS NAS DIFERENTES ESPÉCIES	29
3.4.1 Humanos	29
3.4.2 Roedores	32
3.4.3 Outras Espécies	35
3.5 USOS TERAPÊUTICOS DAS CTNS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 ANIMAIS	39
4.2 EUTANÁSIA	39
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS NEUROGÊNICAS – MARCAÇÃO POR BrdU	40
4.3.1 Marcação por BrdU	40
4.3.2 Coloração anti-BrdU	40
4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO CELULAR	41
4.5 DISSOCIAÇÃO DE NSFs	42
4.6 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO	43

4.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR	43
4.7.1 Atividade de Desidrogenase Mitocondrial (Método Colorimétrico MTT)	43
4.7.2 Viabilidade celular por Azul de Trypan	44
4.7.3 Avaliação da morte celular por Anexina V	44
4.8 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)	45
4.9 CITOMETRIA DE FLUXO	47
4.10 MODULAÇÃO DE CÁLCIO (Ca <sup>2+</sup> ) INTRACELULAR	48
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49

5 RESULTADOS	51
5.1 IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS NEUROGÊNICAS - MARCAÇÃO POR BrdU	51
5.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE NEUROESFERAS (NSFs)	53
5.3 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE NEUROSFERAS	55
5.4 VIABILIDADE E MORTE DAS NSFs	57
5.5 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NEURAIS	59
5.6 CITOMETRIA DE FLUXO	63
5.7 MODULAÇÃO DE CÁLCIO (Ca <sup>2+</sup> ) INTRACELULAR	65
6 DISCUSSÃO	68
6.1 IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS NEUROGÊNICAS	69
6.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE NEUROESFERAS	70
6.3 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO	72
6.4 MARCADORES CELULARES	73

7 CONCLUSOES	81
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

### 1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso dos mamíferos é extremamente complexo e possui uma capacidade muito limitada de se recuperar após lesões. Essa característica faz com que grande parte dos tratamentos para doenças e desordens apresentem resultados insatisfatórios (MANSERGH et al., 2004).

A descoberta de que certas regiões do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos apresentam neurogênese durante a vida pós-natal, juntamente com o fato de que estas células podem ser isoladas e cultivadas *in vitro* gerando neurônios, levou a acreditar-se que o tecido nervoso abriga células-tronco neurais (TAUPIN; GAGE, 2002; BERNINGER et al., 2006).

Embora se saiba que células-tronco neurais (CTNs) existam em grandes quantidades durante a vida embrionária e fetal e que apresentam um rápido declínio logo após o nascimento (JANDIAL et al., 2007), é também sabido que tais células persistem no SNC de mamíferos adultos, incluindo o homem (GAGE, 2000; TAUPIN; GAGE, 2002; BERNINGER et al., 2006).

O termo célula-tronco neural tem sido largamente utilizado para descrever células que (1) podem gerar tecido neural ou são derivadas do sistema nervoso, (2) possuem certa capacidade de auto-renovação, e (3) podem gerar outras células além delas mesmas, por meio de divisão celular assimétrica (GAGE, 2000; TAUPIN; GAGE, 2002). Estas células são consideradas multipotentes uma vez que são capazes de originar os principais tipos celulares do tecido de origem, ou seja, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (JANDIAL et al., 2007).

Vários estudos tem sido realizados no sentido de mapear as áreas do SNC onde ocorre a neurogênese, tanto na vida embrionária/fetal quanto na vida pós-natal. Seaberg e Kooy (2002) e Taupin e Gage (2002) demonstraram que, nos mamíferos em idade adulta, a neurogênese ocorre em duas áreas do SNC: o bulbo olfatório (roedores e primatas não-humanos), e hipocampo (roedores, humanos e primatas não-humanos). Gage (2000) também concluiu que estas áreas são reconhecidamente neurogênicas nos fetos de roedores, e que níveis baixos de neurogênese também tem sido

reportados nos Cornos de Amon de ratos adultos. Piper et al. (2001) e Manganas e Maletic-Savatic (2005) demonstraram que CTNs multipotentes também estão presentes na região subventricular e no hipocampo do encéfalo de fetos e humanos adultos.

As novas células neurais encontradas no bulbo olfatório de mamíferos adultos, incluindo o homem, são geradas a partir de células progenitoras neurais existentes na região anterior da zona subventricular. Esta zona caracteriza-se por uma estreita faixa de tecido na parede dos ventrículos laterais do prosencéfalo. As células progenitoras neurais desta região migram para o bulbo olfatório ao longo da chamada rota migratória rostral (RMS), onde se diferenciam em interneurônios do bulbo olfatório (UCHIDA et al., 2000; TAUPIN; GAGE, 2002; LIU et al., 2004; COSKUN et al., 2008).

As CTNs se constituem em uma alternativa futura em potencial para o tratamento farmacológico tradicional para uma extensa gama de patologias do SNC. A capacidade, não somente de minimizar, como também de reparar e regenerar a degeneração neural e glial representa uma perspectiva promissora da investigação da medicina regenerativa (JANDIAL et al., 2007). Estudos extensos tem sido feitos na busca da aplicabilidade das CTNs no tratamento de doenças como a esclerose múltipla (MANGANAS; MALETIC-SAVATIC, 2005), mal de Parkinson, acidente vascular cerebral, traumas medulares (JANDIAL et al., 2007) e lesões diversas no tecido nervoso (MANSERGH et al., 2004).

O desenvolvimento do sistema nervoso das cobaias apresenta maior similaridade com humanos, comparando-se com outros modelos animais. O desenvolvimento prénatal do SNC é mais extenso. O encéfalo de neonatos é singularmente maduro e apresenta um crescimento restrito até maturidade (ALTMAN; DAS, 1967). Por isso, optou-se pelo desenvolvimento deste estudos em cobaias, na expectativa de que seus resultados que possam ser mais adequadamente comparáveis e, eventualmente, extrapoláveis para humanos.

### **1.1 JUSTIFICATIVA**

A perspectiva do uso de CTNs na terapia de importantes distúrbios neurológicos humanos, tidos até então como intratáveis pela natureza do tecido nervoso, tem gerado grande expectativa na comunidade científica, médica e na população em geral. O potencial impacto dessas terapias na saúde e bem-estar justifica a grande ênfase que tem se dado às pesquisas nessa área.

Grande parte das pesquisas com CTNs tem sido realizada em modelos animais, notavelmente ratos e camundongos. Essas espécies são caracterizadas por um período curto de desenvolvimento embrionário/fetal e os recém-nascidos são imaturos do ponto de vista somático e comportamental. Por essa razão, o encéfalo dessas espécies sofre um considerável desenvolvimento pós-natal, incluindo a continuação da neurogênese. Assim, a extrapolação de resultados obtidos nessas espécies para humanos sempre deve ser cautelosa, pelas peculiaridades e diferenças entre as espécies. Nesse sentido, comparando-se com os modelos animais mais utilizados, o desenvolvimento do sistema nervoso das cobaias apresenta maior similaridade com humanos. O desenvolvimento pré-natal do SNC de cobaias é mais extenso, a maturação do giro denteado é mais precoce e, ao nascimento, grande número de células granulares diferenciadas já está presente, ao contrário das outras espécies. O período gestacional é consideravemente maior (média de 9 semanas), e os recém-nascidos apresentam olhos abertos e capacidade de manterem-se em pé e se locomover logo após o nascimento. O encéfalo de neonatos é singularmente maduro e apresenta um crescimento limitado entre o nascimento e a maturidade (ALTMAN; DAS, 1967). Assim, preservando-se as restrições inerentes ao uso de modelos animais, as cobaias apresentam maiores semelhanças aos humanos no tocante ao desenvolvimento do SNC. Por isso, embora existam vários trabalhos em camundongos e ratos, optou-se pelo desenvolvimento de estudos em cobaias, na expectativa de que gerem resultados que possam ser mais adequadamente extrapolados para humanos.

# **1.2 HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

- A zona subventricular (SVZ) de fetos de cobaias possui CTNs capazes de originar neuroesferas (NSFs) quando cultivadas *in vitro*;

- As células das NSFs derivadas das CTNs da SVZ são multipotentes e podem ser induzidas a se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos.

- Neurônios diferenciados *in vitro* a partir das NSFs apresentam características funcionais.

# 2 OBJETIVOS

### **2 OBJETIVOS**

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Cultivar, identificar e caracterizar as áreas neurogênicas no sistema nervoso central de cobaias (*Cavia Porcellus*).

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cultivar células-tronco neurais (CTNs) *in vitro* a partir da região subventricular do encéfalo de fetos de cobaias;

2. Caracterizar os cultivos de CTNs em relação à capacidade proliferativa e identificar as subpopulações celulares;

3. Induzir a diferenciação das culturas de CTNs e investigar indicadores de funcionalidade.

# 3 REVISÃO DE LITERATURA

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### 3.1 O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) se inicia na fase de gástrula, pelo espessamento do ectoderma formando a placa neural e a subsequente formação do tubo neural. A formação do tubo neural não se dá uniformemente por toda a extensão de forma que as aberturas temporárias em cada extremidade do tubo neural são conhecidas como neuróporo anterior e posterior (Figura 1).





Fonte - Figura modificada de Nieuwenhuys et al. (1998).

Legenda: **A.** A placa neural sendo formada a partir do espessamento do ectoderma. **B.** Aproximação das pregas neurais e consequente formação do sulco neural. **C.** Início da formação do tubo neural. **D.** Formação do encéfalo primordial antes do fechamento do neuróporo anterior e posterior

Antes do fechamento do neuróporo anterior, a parte rostral do encéfalo primordial apresenta uma prega orientada transversalmente que delimita a primeira divisão em duas principais regiões: o *archencephalon* e *deuterencephalon*. A partir daí, o encéfalo

primordial passa por nova divisão, dando origem às três vesículas primárias: o prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O prosencéfalo se desenvolve a partir do *archencephalon*, enquanto o mesencéfalo e rombencéfalo se originam a partir do *deuterencephalon* (NIEUWENHUYS et al., 1998). O prosencéfalo mais tarde se tornará o telencéfalo (hemisférios cerebrais e ganglios basais) e diencéfalo (tálamo, hipotálamo e glândula pituitária), enquanto o rombencéfalo se tornará metencéfalo (cerebelo e ponte) e mielencéfalo (medula oblonga) (Figura 2) (LACBAWAN; MUENKE, 2002).



Figura 2 - Desenvolvimento das principais regiões do encéfalo

Fonte - Figura modificada de Nieuwenhuys et al. (1998).

Legenda: A. Estádio de duas vesículas. B. Estádio de três vesículas. C. Estádio de cinco vesículas. VL: ventrículos laterais. III: terceiro ventrículo. VM: ventrículo do mesencéfalo. IV: quarto ventrículo

A placa neural e o recém formado tubo neural são formados por uma camada de células colunares chamada de neuroepitélio (NE). Estas células econtram-se em vários estágios do ciclo mitótico e, conforme vão se dividindo, a camada vai gradualmente se espessando e adquirindo a configuração de epitélio pseudo-estratificado colunar. Numa

certa fase do desenvolvimento, as paredes do tubo neural se dividem em duas zonas: uma zona exterior anuclear e uma zona interior nuclear. A zona exterior ou camada marginal consiste exclusivamente de processos citoplasmáticos das células neuroepiteliais. A zona interior, chamada de matriz, contém as chamadas células-matriz que são as precursoras de todos os elementos neuronais e macrogliais do SNC. Durante um certo período esta camada representa um compartimento puramente proliferativo. A princípio com divisões simétricas das células germinais seguido por divisões assimétricas. Das divisões assimétricas, resultam as células-tronco e os neuroblastos. Estes últimos migram para uma região situada entre a matriz e a camada marginal, chamada de manto cortical (MA) (NIEUWENHUYS et al., 1998).

Outros dois compartimentos proliferativos são descritos no encéfalo em desenvolvimento: a zona ventricular e a camada germinal externa. A camada germinal externa está confinada ao cerebelo, adjacente ao teto do quarto ventrículo. A zona ventricular (VZ), também chamada de camada subependimal, tem sido descrita somente nas paredes laterais e basais do telencéfalo dos mamíferos. Esta camada se desenvolve a partir da junção do MA e matriz dando origem a uma classe especial de neurônios e todos os tipos de elementos da macróglia (NIEUWENHUYS et al., 1998).

Acreditava-se que a zona ventricular (VZ) do encéfalo desaparecesse logo após o nascimento, dando origem a camada ependimária, que é a denominação dada ao epitélio que reveste a parede dos ventrículos. A transformação histológica é gradual, não sendo possível definir em qual etapa do desenvolvimento embrionário o epitélio ventricular se altera. Desta forma, não é possível delimitar temporalmente a transição entre VZ e camada ependimária. Em fases posteriores do desenvolvimento embrionário, uma segunda camada proliferativa, denominada de zona subventricular (SVZ) é formada adjacente à VZ (ALVAREZ-BUYLLA; LOIS, 1995).

Por muitos anos pensava-se que os neurônios e as células gliais eram derivados de grupos celulares distintos, sendo os neurônios originados de progenitores especializados, os neuroblastos, e as células da glia derivadas da glia radial (RG) (KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009), uma classe especializada de células nãoneronais caracterizadas por uma fibra alongada que abrange radialmente toda a parede do neuroaxis desde a superfície do ventrículo até a meninge (NIEUWENHUYS et al.,

1998). Para Kriegstein e Alvarez-Buylla (2009) esta proposta foi amplamente aceita pelas descrições referentes à diferenciação da RG em astrócitos durante o desenvolvimento embrionário tardio. No entanto, estudos recentes mostraram que as células da RG e uma subpopulação de astrócitos, são de fato as células-tronco neurais (CTNs) que dão origem aos neurônios e às células gliais durante o desenvolvimento do encéfalo e inclusive na vida pós-natal. À medida que o encéfalo se desenvolve, o epitélio se espessa e as células neuroepiteliais se alongam e se convertem em células da RG. Estas células, por sua vez, dividem-se assimetricamente nas chamadas células progenitoras de neurônios intermediárias (nIPCs, *neural intermediate progenitor cells*) as quais geram neurônios direta ou indiretamente. Os oligodendrócitos são provenientes de células intermediárias, chamadas de células progenitoras de oligodendrócitos intermediárias (oIPCs, oligodendrocyte intermediate progenitor cells) que também são derivadas das células da RG. À medida que as nIPCS, as oIPCs e as subpopulações de células da RG se movimentam para o MA a fim de se diferenciarem, a espessura do encéfalo aumenta o que leva ao aumento dos prolongamentos das células da RG. Ao final do desenvolvimento embrionário, a maioria das células da RG começam a se desconectar do ventrículo e a se diferenciar em astrócitos, enquanto a produção de oIPCs continua. A subpopulação de células da RG retém o contato com o ventrículo e continua a sua função de CTNs no neonato. Estas células da RG no neonato continuam a gerar neurônios e oligodendrócitos por intermédio das nIPCs e oIPCs: algumas se convertendo em células ependimárias enquanto outras se convertem em astrócitos na SVZ de adultos. Estas, por fim, continuam a gerar neurônios por meio das oIPCs ou nIPCs (Figura 3).



Figura 3 - Células-tronco neurais (CTNs) durante o desenvolvimento embrionário/fetal e no adulto

Fonte - Figura modificada de Kriegstein e Alvarez-Buylla (2009).

Legenda: Células da glia radial continuam gerando neurônios e oligodendrócitos pela produção de células progenitoras intermediárias de neurônios ou oligodendrócitos (nIPCs e oIPCs). Algumas se diferenciam em células ependimais, enquanto outras se diferenciam em astrócitos adultos na zona subventricular (células tipo B) que continuam a funcionar como CTNs. MZ (zona marginal); MA (manto cortical); SVZ (zona subventricular); VZ (zona ventricular); NE (neuroepitélio)

As células da glia representam o grupo mais numeroso de células do cérebro e tem função estrutural, metabólica e de apoio trófico a neurônios, regulando a neurogênese, sobrevivência, proliferação, migração e crescimento neurais (NIEUWENHUYS et al., 1998).

### 3.1.1 Sinapses do Sistema Nervoso Central

A informação é transmitida para o SNC em sua maior parte na forma de potenciais de ação, chamados de "impulsos nervosos" que se propagam por sucessão de neurônios, um após o outro. A região especializada na transmissão do impulso nervoso de um neurônio a outro chama-se Sinapse (HALL, 2011).

Embora se saiba que as sinapses através do cérebro são embainhados pelas células da glia, o possível papel da glia no desenvolvimento e na função das sinapses tem recebido pouca atenção. Estudos demonstram que a medida que a percentagem de células da glia diminui, decresce também a sobrevivência dos neurônios. Isto sugere que uma população pura de neurônios em cultivo tem pouca habilidade de formar sinapses funcionais na ausênia de células da glia (COWAN et al., 1997).

Quase todas as sinapses utilizadas para a transmissão de sinais no SNC são sinapses químicas. Nessas estruturas, o primeiro neurônio secreta por seu terminal a substância química chamada neurotransmissor que, por sua vez, vai atuar em proteínas receptoras presentes na membrana do neurônio subsequente, para promover excitação, inibição ou ainda modificar de outro modo a sensibilidade dessa célula. Mais de 40 substâncias neurotransmissoras importantes foram descobertas nos últimos anos. Algumas das mais conhecidas são: acetilcolina, noraepinefrina, epinefrina, histamina, ádico gama-aminobutirico (GABA), glicina, serotonina e glutamato (HALL, 2011).

A liberação dos neurotransmissores na fenda pré-sináptica provoca alterações imediatas nas características de permeabilidade da mebrana neuronal pós-sináptica, o que leva à excitação ou à inibição do neurônio pós-sináptico, dependendo das caracteristicas do receptor neuronal. A membrana do terminal pré-sináptico tem grande número de canais de cálcio dependentes de voltagem. Quando o potencial de ação despolariza a membrana pré-sináptica, esses canais de cálcio se abrem e permitem a passagem de inúmeros íons de cálcio para o terminal pre-sináptico. A quantidade de substância neurotransmissora que é então liberada na fenda sináptica é diretamente proporcional ao número de íons cálcio que entram. Na membrana do neurônio pós-sináptico os neurotransmissores ligam-se a proteínas receptoras que podem (1) permitir a passagem de tipos específicos de íons, tais como cálcio, potássio, sódio e cloreto ou (2) ativar uma ou mais substâncias localizadas no interior do neurônio pós-sináptico (HALL, 2011).

### 3.2 COBAIAS (CAVIA PORCELLUS)

As cobaias, *guinea pigs*, coelhinhos ou porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*, Linnaeus 1758) são roedores dóceis, conhecidos por muitos como um símbolo representativo dos animais de laboratório. As primeiras utilizações com fins experimentais foram realizadas por Lavoisier, em 1790, em investigações relacionadas ao calor. Cada fêmea gera em média dois filhotes por gestação, mas esse número pode variar de 1 a 8. Os filhotes já nascem cobertos de pêlos, com olhos abertos e a dentição completa, o que lhes confere precocidade e auto-suficiência, uma vez que já podem consumir alimentos sólidos entre 3 a 5 dias de idade (COUTO, 2006).

A maturidade dos sistemas corpóreos ao nascimento tem feito dessa espécie um excelente modelo animal para pesquisas relacionadas com o SNC. As cobaias tem extenso crescimento pré-natal do encéfalo (GUIDI et al., 2005), apresentando ao nascimento um encéfalo muito bem formado (POTTER; BRUECK, 1958). Em estudos comparativos sobre neurogênese pós-natal em cobaias, ratos (ALTMAN; DAS, 1967; GUIDI et al., 2005), camundongos e macaco *Rhesus* (GUIDI et al., 2005), os autores concluíram que as cobaias são a espécie que possui a região do hipocampo mais madura, além de neurogênese mais prolongada nesta área do encéfalo. Além disso, Guidi et al. (2005) afirmam que o padrão de desenvolvimento pré-natal do encéfalo das cobaias tem aspectos mais semelhantes aos humanos comparando-se com a maioria dos roedores.

# 3.3 CÉLULAS-TRONCO NEURAIS E ÁREAS NEUROGÊNICAS

Inicialmente, o tubo neural consiste de um grupo de células proliferativas morfologicamente homogêneas, chamadas de células neuroepiteliais, também

chamadas de CTNs (PANICKER; RAO, 2001). São estas células que originam o neuroepitélio (NE) (GÖTZ; HUTTNER, 2005).

Durante o desenvolvimento, as CTNs originam todos os neurônios do SNC dos mamíferos. Elas também são a fonte dos dois tipos de células da macróglia no SNC: os astrócitos e os oligodendrócitos (GÖTZ; HUTTNER, 2005). Os oligodendrócitos são células formadoras de mielina, que possibilitam a rápida condução do impulso nervoso ao longo dos axônios. Os astrócitos são células em forma de estrela que fornecem importante suporte estrutural e metabólico aos neurônios (DOETSCH, 2003).

As CTNs são definidas por duas características funcionais: (1) capacidade de auto-renovação e geração de progênie idêntica e (2) multipotencialidade, que significa a sua capacidade de gerar células capazes de produzir neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (CONTI et al., 2006).

Durante a embriogênese, as células que compoem o SNC dos vertebrados podem ser produzidas a partir de quase todas as regiões do neuroepitélio. Uma região bem caracterizada é o Giro Denteado (GD) do hipocampo. Estudos revelaram que o sítio primário de multiplicação celular na área do hipocampo é a pequena zona situada abaixo da camada granular, chamada de zona subgranular. A partir desta região, as CTNs migram para o interior da camada granular e se diferenciam em neurônios (ALTMAN; DAS, 1967; LACBAWAN; MUENKE, 2002). Os novos neurônios que são adicionados ao hipocampo durante a vida adulta contribuem para funções cognitivas, incluindo aprendizado e memória (Figura 4) (BONAGUIDI et al., 2008).

Outra região reconhecidamente neurogênica é a SVZ dos ventrículos laterias (GÖTZ; HUTTNER, 2005). Com a geração dos neurônios durante a neurogênese, o neuroepitélio se transforma em um tecido com várias camadas celulares, e a camada que reveste o ventrículo (a camada celular mais apical que contém a maior parte das células progenitoras) passa a ser chamada de VZ (GÖTZ; HUTTNER, 2005). A SVZ, derivada da VZ, é uma fina camada de tecido da parede do ventrículo lateral. Nela se encontram as células progenitoras neurais, capazes de gerar novos neurônios e células da glia (Figura 4) (ALVAREZ-BUYLLA; LOIS, 1995).

Figura 4 - Áreas neurogênicas do encéfalo



Fonte - Figura modificada de Uchida et al. (2000).

Legenda: Figura esquemática de corte sagital de encéfalo de camundongo adulto representando os dois principais sítios de neurogênese: a SVZ que se encontra junto do ventrículo lateral e o DG do hipocampo

Tradicionalmente acreditava-se que a capacidade das camadas germinativas – VZ e SVZ – em gerar neurônios era restrita ao período embrionário. Contudo, no início do século 20, Allen (1912) descobriu células mitóticas na SVZ dos ventrículos laterais de ratos adultos (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIA-VERDUGO, 2002). Em 1960, com o trabalho pioneiro de Joseph Altman, o conceito de que não há formação de novos neurônios no cérebro de animais adultos mudou definitivamente. O pesquisador sugeriu que novas células nervosas eram produzidas em regiões restritas do cérebro adulto (ALVAREZ-BUYLLA et al., 2001).

Nos mamíferos adultos, os novos neurônios originados na SVZ migram rostralmente para o bulbo olfatório onde se tornam interneurônios locais maduros (Figura 5) (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIA-VERDUGO, 2002).
Figura 5 - Rota migratória rostral



Fonte - Figura modificada de Taupin e Gage (2002).

Legenda: Representação esquemática de corte sagital do encéfalo de roedor adulto. As novas células nervosas do bulbo olfatório (OB) são geradas a partir de CTNs da SVZ. Estas células migram para o OB via rota migratória rostral (RMS), onde se diferenciam em interneurônios do OB

Segundo Alvarez-Buylla e Garcia-Verdugo (2002), a SVZ contém pelo menos quatro diferentes tipos celulares, definidos pela sua morfologia, ultraestrutura e marcadores moleculares: neuroblastos (células tipo A), astrócitos (células tipo B), precursores (células tipo C) e células ependimárias (células tipo E) (Figura 6).



Figura 6 - Organização e linhagem celular na zona subventricular (SVZ)

Fonte - Figura modificada de Alvarez-Buylla e García-Verdugo (2002). Legenda: Esquerda: Representação de secção transversal do encéfalo de camudongo adulto indicando a localização da SVZ. A SVZ está localizada na parede do ventrículo lateral (LV) e é constituída por quatro tipos celulares (direita): cadeias de neurônios jovens (células tipo A, vermelho) são circundadas por células tipo B (azul) que possuem características de astrócitos e formam estruturas tubulares. Aglomerados de células tipo C altamente proliferativas são associadas com cadeias de células tipo A. Células ependimais (tipo E) formam uma camada epitelial que separa a SVZ do ventrículo lateral. No topo, à direita, células B, com potencial de auto-renovação, dão origem às células amplificadoras transitórias (C) que, por sua vez, originam os neuroblastos (A)

Os jovens neurônios (A) formam cadeias encobertas por astrócitos (B). Mais esféricos e muito proliferativos, os precursores (C) formam aglomerados próximos às cadeias de células do tipo A. A SVZ é separada da cavidade ventricular por uma camada de células ependimárias (tipo E). As células do tipo C estão presentes em todos os níveis da SVZ, mas em menor quantidade na parte caudal. A alta frequência de divisão destas células e sua associação com as cadeias migratórias de neuroblastos (A) sugerem que estas células sejam os precursores das células do tipo A (GARCIA-VERDUGO et al., 1998).

Para Alvarez-Buylla e García-Verdugo (2002), em condições normais e durante a regeneração, os astrócitos (B) parecem também servir de precursores primários para novos neurônios. Estas células seriam capazes de gerar novas células que crescem como CTNs *in vitro*. As células do tipo B interagem intimamente com as células ependimárias (E) e, ocasionalmente, entram em contato com o lúmen do ventrículo.

García-Verdugo et al. (1998) destacam as seguintes características imunocitoquímicas dos tipos celulares encontrados no SNC: a nestina marca células neuroepitelias no embrião e é sugerida como marcador de CTNs; na SVZ de adultos essa proteína é expressa em múltiplos tipos celulares, incluindo células ependimárias. Os marcadores gliais vimentina e GFAP marcam células ependimárias do tipo B (astrócitos), porém não marcam células do tipo A (neurônios) ou C (precursoras). Anticorpos PSA-NCAM e neurônio-específico Beta-III-tubulina (por exemplo, o Tuj1) marcam somente células do tipo A (neurônios). O padrão de marcação sugere que as células do tipo C sejam as mais imaturas, já que expressam somente a nestina, e nenhum outro marcador de diferenciação.

Seaberg e Kooy (2002), num estudo comparativo entre ratos e camundongos adultos, concluiram que a camada subependimal dos ventrículos laterais contém CTNs com longa capacidade de auto-renovação e multipotencialidade, enquanto que o hipocampo contém progenitores neuronais e gliais com limitada capacidade de auto-renovação durante a vida adulta.

A identificação de áreas neurogênicas, tanto na vida pré-natal quanto em animais adultos pode ser feita por meio da marcação com BrdU (5-bromo-2'- deoxiuridina). Em estudos realizados com cobaias (GUIDI et al., 2005), verificaram a presença de células positivas para o BrdU em todas as faixas examinadas, embora o seu número tenha apresentado um rápido declínio em animais com 30 dias de vida, reduzindo-se a índices muito baixos em animais adultos (>300 dias).

# 3.4 ÁREAS NEUROGÊNICAS NAS DIFERENTES ESPÉCIES

No encéfalo de animais adultos da maioria das espécies mamíferas, incluindo o homem, duas áreas com índices surpreendentes e significativos de neurogênese durante a vida tem sido identificadas. Uma dessas é o hipocampo, onde novos neurônios são formados na zona subgranular. Na outra região, os neurônios são derivados de progenitores residentes na parede dos ventrículos laterais, comumente chamada de zona subependimal ou subventricular (BERNINGER et a., 2006).

#### 3.4.1 Humanos

É consenso que CTNs podem ser extraídas de encéfalo fetal ou geradas a partir de células-tronco embrionárias. Além disso, podem também ser isoladas a partir de diferentes regiões do encéfalo adulto, como do hipocampo e SVZ (BUDDENSIEK et al., 2010), córtex frontal e temporal, hipocampo e parede do ventrículo lateral (FRISÉN et al., 1998; JOHANSSON et al., 1999; ARSENIJEVIC et al., 2001), além de áreas nãoneurogênicas, como a medula espinhal (MANSERGH et al., 2004).

A SVZ e o hipocampo são possivelmente as fontes mais comumentes utilizadas para a extração de células precursoras neurais adultas. Em contrapartida, tecidos fetais tem sido amplamente utilizados como fonte de progenitores neurais multipotentes. Células-tronco de fetos humanos podem ser isoladas a partir de embriões descartados após fertilização *in vitro* ou de conceptos abortados (SHAMBLOTT et al., 1998; THOMSON et al., 1998; VESCOVI et al., 1999).

Buddensiek et al. (2010) utilizaram tecidos da região do hipocampo de humanos adultos para determinar se o fluido cerebroespinhal produzido aumentava a sobrevivência e diferenciação das CTN. Os tecidos foram obtidos a partir de procedimentos cirúrgicos de rotina para tratamento de epilepsia e os autores concluíram que a presença de liquido cerebroespinhal no meio de cultura aumenta os níveis de sobrevivência e estimula a diferenciação glial de CTN *in vitro*.

Fetos humanos de diferentes idades tem sido utilizados para identificação e caracterização de precursores neurais (UCHIDA et al., 2000; PIPER et al., 2001) e a heterogeneidade de sua progênie (SUSLOV et al., 2002). Os estudos envolveram não só o prosencéfalo (região subependimal e hipocampo) como também toda a região do cérebro. Precursores neuronais indiferenciados não co-expressam marcadores gliais, contudo podem ser induzidos a se diferenciarem em neurônios maduros.

Schwartz et al. (2003) defendem a utilização de tecido cerebral humano *pós-mortem*. Os autores acreditam que esta fonte representa um vasto suplemento de células progenitoras neurais que pode reduzir ou eliminar o uso de fontes embrionárias ou fetais. As culturas foram derivadas de tecido cortical retirado de prematuros com 23-25 semanas de gestação que vieram a óbito após 2 semanas. O tecido (córtex fronto-parietal) foi retirado após 3 horas da morte. Em estudos anteriores com diversos tecidos humanos (PALMER et al., 2001) foi demonstrado que as amostras rendem células viáveis com até 36 horas *pós-mortem*. Contudo existem diferenças significativas entre culturas isoladas de fetos comparadas com neonatos e cérebro adulto. No geral, tecidos fetais demonstram uma maior capacidade proliferativa e a morfologia celular pode diferir daquelas vistas em células isoladas de neonatos e adultos.

Dentre as diversas técnicas utilizadas para identificação e caracterização das CTNs, a imunofluorescência é uma das mais utilizadas. Buddensiek et al. (2010) e Piper et al. (2001) utilizaram o BrdU como marcador para avaliação do potencial de autorenovação das células cultivadas. Os marcadores mais comumente utilizados estão listados no quadro 1 e incluem: GFAP, Beta-III-tubulina (PIPER et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003; BUDDENSIEK et al., 2010), MAP2ab (SCHWARTZ et al., 2003; BUDDENSIEK et al., 2010), nestina, Sox2, vimentina, NeuN, (SCHWARTZ et al., 2003), mGalC (PIPER et al., 2001; BUDDENSIEK et al., 2010), O4 (PIPER et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003) também são marcadores utilizados tanto nas CTNs quanto nas células diferenciadas.

Marcador	Tipo Celular	Espécie	Referência
	Células neuroepiteliais	Suíno	Ara et al., 2010.
	embrionárias, células-		Baizabal e Corrubias,
Nestina	tronco neurais	Camundongo	2009; Li et al., 2009.
Nestina	embrionárias, outros		
	células-tronco	Pato	Vokovama et al. 2004
	multipotentes	Raio	1 0k0yama et al., 2004.
	Células-tronco	Comundongo	Johanson et al., 1999;
SOX-2	embrionárias e pós-natal	Camundongo	Bonaguidi et al., 2008.
	Astroglia Ra	Rato	Komikova; Eriksson, 2004.
	Neurônios jovens	Suíno	Ara et al., 2010.
		Primatas	Kornack; Rakik, 2001;
TuJ1 (Beta-III- tubulina)		Camundongo	Bonaguidi et al., 2008; Li
			et al., 2009
		Rato	Johanson et al., 2004;
		Primatas	Kornack; Rakik, 2001;
	Neurônios maduros	Suíno	Ara et al., 2010.
		Primatas	Kornack; Rakik, 2001.
NeuN, MAP-2		Guinea pigs	Guidi et al., 2005.
		Camundongo	Bonaguidi et al., 2008;
			Jiao; Chen, 2008;Li et al.
			2009
		Rato	Johanson et al., 1999.
		Primatas	Kornack; Rakic, 2001.

Quadro 1 - Marcadores de células-tronco neurais (CTNs) e células diferenciadas, (continua)

			• ~ \	
	00	$\sim$		ι.
	1 1 11	11 -	11530	
	<b>UUI</b>	10	lusuu	1
v				
•			,	

Marcador	Tipo Celular	Espécie	Referência
	Astrócitos	Suíno	Ara et al., 2010.
GFAP		Primatas	Kornack; Rakik, 2001.
		Guinea pigs	Guidi et al., 2005.
		Camundongo	Bonaguidi et al., 2008; Li
			et al. 2009
		Primatas	Kornack; Rakik, 2001.
GalC	Oligodendrócitos	Suíno	Ara et al., 2010.
	Precursores e	Suíno	Ara et al., 2010.
O1 e O4	oligodendrócitos maduros, respectivamente	Camundongo	Bonaguidi et al., 2008; Li
			et al., 2009.

#### 3.4.2 Roedores

Baizabal e Covarrubias (2009) ao estudarem as células-tronco isoladas do mesencéfalo de embriões de camundongos com 10,5 dias concluíram que a diferenciação terminal ocorre durante a formação inicial da célula-tronco/progenitor tecido-específico. *In vitro*, os autores concluíram que as células-tronco embrionárias rapidamente adquirem um destino neural, mesmo sob mínimas condições. Em contrapartida, em um estudo com embriões de 4 dias (LI et al., 2009) concluiu-se que a diferenciação das células-tronco em neurônios requer um protocolo diferenciado, pelo enriquecimento do meio de cultivo com derivados ectodérmicos como um primeiro passo na produção de progenitores neurais.

No SNC de camundongos adultos, a semelhança do que acontece em outras espécies de mamíferos, a neurogênese ocorre somente em duas regiões: a SGZ e a SVZ, as quais dão origem aos neurônios do GD do hipocampo e do OB, respectivamente (JIAO; CHEN, 2008).

Segundo Liu et al. (2004) a SVZ é, sem dúvida, a região que mais concentra CTNs. Estas células se localizam dentro de uma discreta região na parte anterior da zona subventricular do encéfalo de neonatos e adultos que é a SVZa. Os progenitores derivados da SVZa tem sido bem caracterizados e se constituem essencialmente de uma população pura de progenitores neuronais, em contraste com a SVZp (parte posterior da zona subventricular) onde são produzidos quase que exclusivamente astrócitos. Os autores, ao estudarem o efeito da BMP4 (proteína óssea morfogenética) sobre as células da SVZa de camundongos neonatos, concluíram que esta proteína estimula a diferenciação em progenitores neuronais no bulbo olfatório, além de induzir o comprometimento de CTNs em astrócitos.

Além da SVZ e SGZ, Jiao e Chen (2008) afirmam que a neurogênese pode ser induzida tanto *in vivo* como *in vitro* por sinais desencadeados por um trauma, ou por rotas específicas, sugerindo que o potencial neurogênico de certas regiões do SNC pode ser determinado por estímulos ambientais locais. Os autores cultivaram células provenientes da substância cinzenta do córtex, cerebelo e medula espinhal de camundongos adultos juntamente com astrócitos provenientes da SGZ e SVZ também de camundongos adultos e concluíram que os astrócitos liberam sinais moleculares que estimulam progenitores neurais adultos, de outras regiões do encéfalo, a gerar novos neurônios *in vitro* e *in vivo*. De acordo com Alvarez-Buylla e García-Verdugo (2002) astrócitos de camundongos provenientes do córtex, cerebelo e medula espinhal se comportam como células-tronco *in vitro* somente quando isolados antes do dia 10 pósnatal.

Tanto nos estudos com embriões quanto com camundongos adultos, os anticorpos contra Beta-III-tubulina, nestina e GFAP são os mais utilizados (SEABERG; KOOY, 2002; JIAO; CHEN, 2008; BAIZABAL; COVARRUBIAS, 2009; LI et al., 2009). Além destes, NeuN (BAIZABAL; COVARRUBIAS, 2009; LI et al., 2009), O4 (SEABERG; KOOY, 2002; JIAO; CHEN, 2008; BAIZABAL; COVARRUBIAS, 2009; LI et al., 2009) e MAP2ab (SEABERG; KOOY, 2002; LIU et al., 2004; JIAO; CHEN, 2008) também são utilizados como marcadores de células cultivadas.

Johanson et al. (1999) inicialmente demonstraram que as células ependimais do encéfalo de ratos adultos se constituem em CTNs verdadeiras. *In vivo*, essas células

migram através da zona subventricular e, eventualmente atingem o bulbo olfatório diferenciando-se em neurônios e apresentando a expressão da Beta-III-tubulina e Map2ab. *In vitro*, essas células são capazes de gerar neuroesferas que, sob estímulo apropriado, originam neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Komikova e Eriksson (2004) também estudaram as células neurais progenitoras da região subventricular do encéfalo de ratos adultos (4 meses de idade). Os autores estudaram a expressão do Sox2, um fator de transcrição sabidamente expresso em células multipotentes do neuroepitélio embrionário. Células positivas para o Sox2 também foram identificadas entre células da astróglia distribuídas pelo parênquima cerebral. A expressão do Sox2 em células da astróglia de cérebros adultos reforça algumas hipóteses da capacidade neurogênica dessas células, defendida por alguns autores. Os autores concluem que a Sox2, juntamente com outros marcadores, pode ser útil para estudar a dinâmica dos progenitores neurais, inclusive no cérebro de adultos.

A nestina (*Nestin*) é uma proteína componente dos filamentos intermediários do citoesqueleto, cuja expressão tem sido considerada um marcador de células-tronco ou progenitoras neurais. Embora originalmente associada a estádios embrionários/fetais do desenvolvimento do sistema nervoso, tem sido demonstrado que a nestina também é expressa no cérebro de animais adultos. Em ratos, a expressão desse marcador foi demonstrada em células germinais de áreas neurogênicas, inclusive em células da micróglia. O significado biológico da expressão de nestina por essas células é desconhecido. *In vitro*, tem sido demonstrado que células da micróglia isoladas do cérebro de ratos neonatos (YOKOYAMA et al., 2004) e de cérebro lesionados de ratos adultos (YOKOYAMA et al., 2006) podem ser induzidas a se transformarem em células "neuron-like" ou "glial-like", mas esse potencial parece se manifestar apenas *in vitro* e não *in vivo*. A função da nestina nesses neurônios pode estar relacionada com a sua sobrevivência e plasticidade.

Os efeitos de grupos químicos utilizados no tratamento de superfícies de cultivo sobre o comportamento e diferenciação de precursores neurais também foram estudados com CTNs de ratos (REN et al., 2009). Esses grupamentos químicos podem influenciar a adesão, migração e potencial de diferenciação das células precursoras e, portanto, devem ser considerados no planejamento experimental. Foi demonstrado que

superfícies tratadas com radicais trióxido de enxofre (–SO3) favorecem a diferenciação de neuroesferas em oligodendrócitos; enquanto que superfícies tratadas com ácido carboxílico (– COOH) favorecem a diferenciação em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos.

Baseado no expressivo desenvolvimento pré-natal do encéfalo, que se assemelha mais aos humanos do que a maioria dos roedores usados em pesquisas, o guinea pig tem sido utilizado em pesquisas (ALTMAN; DAS, 1967; GUIDI et al., 2005) a respeito da neurogenese pos-natal no GD do hipocampo. Utilizando marcadores neuronais (NeuN, Beta-III-tubulina) e gliais (GFAP) além de proliferação celular (BrdU), os autores concluíram que durante o primeiro mês pos-natal, há uma grande proliferação de células até os 20 dias de idade, quando esta taxa tem uma rápida queda.

Altman e Das (1967) compararam ainda a região do hipocampo com o córtex cerebelar e concluiu que enquanto a neurogênese é bem pronunciada no hipocampo, por algum tempo após o nascimento, a neurogênese cerebelar é mínima nestas espécies. O córtex cerebelar nas cobaias é maduro ao nascimento e somente uma pequena porção de sua população de células granulares é formada após o nascimento. A duração da neurogênese cerebelar nas diferentes espécies de mamíferos parece estar correlacionada com o período que é necessário para maturação do sistema locomotor e habilidade relacionadas a ele além das diferenças entre as espécies com relação à complexidade dessas habilidades. Com isso, o término da neurogênese em cobaias logo após o nascimento pode estar relacionado com a limitada capacidade locomotora que esses animais parecem ter que desenvolver ao nascimento.

#### 3.4.3 Outras Espécies

Pesquisas envolvendo macacos adultos (KORNACK; RAKIK, 2001) também foram desenvolvidas. A busca por áreas neurogênicas no SNC desta espécie demonstrou que células em divisão são encontradas na zona subependimal dos ventrículos laterais e geram neuroblastos que sofrem uma migração em cadeia por uma grande distância até

o OB onde se diferenciam em interneurônios. Na caracterização destas células foram utilizados marcadores com BrdU, GFAP, NeuN e Beta-III-tubulina.

O suíno também tem sido utilizado em estudos envolvendo CTNs. Célulastronco/progenitores neurais foram identificadas na região SVZ tanto de leitões recémnascidos (ARA et al., 2010) como de fetos com 40 dias de idade (SKALNIKOVA et al., 2008). Estas células são multipotentes e possuem a capacidade de gerar tanto neurônios como células da glia, o que foi demonstrado através de imunocitoquímica para marcadores Nestina (progenitores neurais indiferenciados), GFAP (astrócitos), Vimentina, 04 (oligodendrócitos imaturos), 01 (células precursoras de oligodendrócitos), MAP-2ab (proteína microtubular), NeuN (marcador neuronal específico). O BrdU, para estimar proliferação celular, foi avaliado tanto in vitro quanto in vivo.

# 3.5 USOS TERAPÊUTICOS DAS CTNS

No que diz respeito às regenerações de lesões no SNC, o reconhecimento pelas CTNs de sinais atrativos (fatores quimiotáticos) provenientes da lesão e a migração dessas células para o local da lesão devem contribuir para o processo de regeneração neuronal no SNC (ARMSTRONG; BARKER, 2001). Trabalhos experimentais sugerem que a possibilidade de melhora funcional em pacientes que sofreram acidente vascular encefálico (AVE) pode ser induzida pelas CTNs originadas na SVZ. Os neuroblastos recém-formados migram para a região lesada, uma região onde a neurogênese não ocorre no cérebro intacto. Após a maturação, uma parcela substancial dos novos neurônios expressa marcadores característicos de neurônios maduros similares aos que morreram (THORED et al., 2006).

Martino e Pluchino (2006) concluem que a terapia com CTNs em desordens do sistema nervoso como doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose múltipla e lesão medular, alcançam sua eficácia terapêutica exclusivamente pelo mecanismo de substituição celular. De fato, as CTNs podem promover o reparo do SNC simplesmente

pela sua habilidade neuroprotetora intrínseca que é exercida principalmente sua deposição no local da lesão.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 21 fetos oriundos de nove fêmeas em final de gestação, oriundas de um criatório particular. Durante o experimento, as cobaias foram alojadas em gaiolas com cama de maravalha, sendo alimentadas com ração comercial para roedores duas vezes ao dia. Frutas e verduras foram fornecidas diariamente como suplementação de vitamina D à dieta. Água ficou à disposição *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de Ética da Universidade de São Paulo.

## 4.2 EUTANÁSIA

Em virtude da variação do período gestacional das cobaias, e pela incerteza da fecundação no momento da cópula assistida, optou-se pelo acompanhamento semanal da gestação por ultrassonografia. Assim, pode-se estimar a data do parto e realizar a eutanásia com aproximadamente 55 dias de gestação. Após obter o peso individual de cada fêmea, a eutanásia foi realizada pela administração da associação de tranqüilizantes e anestésicos. Os animais foram tranqüilizados pela aplicação de azaperone (Janssen Pharmaceutica, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) na dose de 4mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, pela via intramuscular (IM). A indução da anestesia foi obtida após a administração da associação de cloridrato de cetamina (20mg kg<sup>-1</sup>, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e de xilazina (1,5mg kg<sup>-1</sup>, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) sendo induzida até a parada cardiorrespiratória. Os fetos foram removidos assepticamente do útero materno por meio de laparotomia.

## 4.3 IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS NEUROGÊNICAS – MARCAÇÃO POR BrdU

Para a identificação das áreas neurogênicas no encéfalo, cobaias com um dia de vida receberam injeções de BrdU (5-bromo-2'deoxiuridina, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, USA) a cada 12 horas, por 2 dias, pela via intraperitoneal. A dose utilizada foi de 50mg kg<sup>-1</sup>. Os animais foram sacrificados 12 horas após a última injeção.

#### 4.3.1 Marcação por BrdU

O encéfalo das cobaias foi removido, seccionado na linha média e fixado em paraformaldeído (PFA) (Synth, São Paulo, SP, Brasil) a 4 % em PBS (tampão salina fosfato), por 4 horas a 4 °C. Após lavagem em PBS, o tecido foi incubado a 4° C em 30% de sacarose em PBS, *overnight*, seguido de inclusão em *Tissue Tek* - OCT (FK Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil) em um molde e congelado em gelo seco. Secções de 20 µm foram cortadas em criostato, depositadas em lâminas e estocadas a -20 °C.

#### 4.3.2 Coloração anti-BrdU

As secções foram incubadas com anticorpo primário anti-BrdU (rat, 1:100, Abcam, Cambridge, MA) em 0,5 % triton X-100 em tampão TRIS-borato por 30 minutos. Após lavagem em água e PBS, as secções foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de rato, conjugado com Alexa<sup>488</sup>, Abcam). Os núcleos foram visualizados após coloração com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas e montadas com lamínulas e

observadas em microscópio confocal Zeiss LSM510 (Zeiss, Oberkochen, Baden-Wurttemberg, Alemanha).

# 4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO CELULAR

Os encéfalos dos fetos foram retirados de forma asséptica e acondicionados em placas de Petri contendo DMEM alta glicose (4,5 g/l) (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). A dissecação foi realizada sob uma lupa e o material obtido da zona subventricular (SVZ) foi transferido para um tubo de centrifugação contendo 1 ml de DMEM alta glicose (Sigma).

Após a sedimentação, o excesso de meio foi removido e as células incubadas com 1 ml de tripsina *TrypLE*<sup>tm</sup> (GibcoBRL) 0,1 %, EDTA 10 mM, pH 6.3 por 5 minutos a 37 °C para a obtenção de células isoladas. A seguir, a tripsina foi inativada com soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e o material foi homogeneizado e centrifugado a 400 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e foi adicionado meio de cultura suplementado (descrição a seguir). O tecido foi dissociado por passagens sucessivas por ponteiras de 1000 μl, seguido pela passagem por ponteira de 200 μl, até que se obtivesse uma suspensão de células isoladas. A suspensão obtida foi filtrada em filtro de 40 μm (BD, San Jose, CA, EUA), as células foram contadas e a viabilidade celular foi avaliada por coloração com Azul de trypan (Gibco BRL, San Francisco, CA, EUA). As células foram plaqueadas em placa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> previamente tratada com *Poly-Hema* (Poli [2-hidroxietil metacrilato], Sigma) para evitar a adesão das células à placa e promover a formação das neuroesferas (NSFs). As culturas iniciais e os subcultivos foram mantidos em meio suplementado.

Composição do meio de cultura das CTNs:

- DMEM alta glicose (Sigma) 70%
- HAM'S F12 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) 30%
- Penicilina/estreptomicina (GibcoBRL) 1%
- Suplemento B27 (GibcoBRL) 2%

- EGF (Sigma) 20ng/ml
- FGF (R&D, Minneapolis, MN, EUA) 20ng/ml
- Heparina (Sigma) 5g/ml
- L-Glutamina (Sigma) 1%

O meio de cultura foi trocado, em média a cada 4 ou 5 dias, até que se obtivesse a formação de neurosferas (NSFs). Para isso, as células foram centrifugadas a 400 xg por 5 minutos e metade do meio de cultura de cada placa foi trocado, sendo substituído por meio de cultura fresco. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C com controle de umidade (maior que 95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Todos os aspectos de crescimento celular foram acompanhados pela fotodocumentação das placas em utilizando o microscópio Eclipse E600 (Nikon, Melville, NY, EUA). As imagens foram capturadas pela câmera digital Evolution MP Color (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) utilizando-se o programa QcapturePro (QImaging, Surrey, BC, Canada).

# 4.5 DISSOCIAÇÃO DE NSFs

Para a obtenção de células individualizadas a partir das NSFs formadas, optouse por associar o método de dissociação química com a mecânica. Para isso, as NSFs cultivadas nas condições descritas no item 4.4 foram centrifugadas a 400 xg por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir as células foram incubadas com 1 ml de tripsina *TrypLE*<sup>tm</sup> por 5 minutos em estufa a 37 °C com controle de umidade (maior que 95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub>. Utilizou-se uma ponteira de 200 µl para dissociação mecânica até que se obtivesse uma suspensão de células isoladas. A seguir, a tripsina foi inativada com SFB (Cultilab) e o material foi homogeneizado e centrifugado a 400 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspendido.

#### 4.6 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO

A solução de congelamento utilizada consistia de 90 % de SFB (Cultilab) + 10 % de DMSO (dimetilsulfóxido, MP Biomedicals, São Paulo, SP, Brasil). Para o teste utilizou-se células com 15 dias de cultivo. O procedimento foi realizado com NSFs íntegras e dissociadas (protocolo descrito no item 4.5), provenientes de uma mesma garrafa. Inicialmente o conteúdo da garrafa foi dividido em dois tubos falcon com volumes iguais. Os cultivos foram centrifugados a baixa rotação por 10 minutos para a sedimentação celular e congelados em proporção de 1:1 de solução de congelamento. O congelamento foi realizado de forma gradual: primeiramente os frascos de congelamento (aproximadamente 1 hora). Em seguida foram transferidos para o freezer de -80 °C e, após alguns dias, transferidos para botijão de nitrogênio líquido.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR

#### 4.7.1 Atividade de Desidrogenase Mitocondrial (Método Colorimétrico MTT)

A viabilidade celular foi estimada pela mensuração da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial. Quando ativa, esta enzima é capaz de metabolizar o reagente MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-dipheniltetrazolium bromide] (Sigma).

O teste avaliou as células provenientes de NSFs dissociadas (protocolo descrito no item 4.5) de fetos, animais com uma semana de vida, animais com um mês de vida e animais adultos (180 dias de vida). Para a realização do método colorimétrico MTT, as NSFs dissociadas foram plaqueadas em triplicata em placa de 24 poços (Corning Incorporated, New York, NY, EUA). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 270 µl de HAM'S-F12 e 30 µl de solução aquosa de MTT (5 mg/l) por poço, deixando-se incubar durante 3 horas em estufa a 37 °C com controle de umidade (maior que 95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a solução de MTT foi retirada e então foram adicionados 180 µl de DMSO (MP Biomedicals) em cada poço. A placa foi agitada por 15 minutos e o conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning), seguindo-se a leitura da absorbância a 540 nm em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MS, Helsinki, Finlândia).

#### 4.7.2 Viabilidade celular por Azul de Trypan

Este ensaio visa mensurar a quantidade de células vivas num cultivo celular utilizando o corante Azul de Trypan (GibcoBRL). O corante penetra no citoplasma de células mortas corando-as de azul.

Para este teste foram utilizadas NSFs com 15 dias de cultivo. As NSFs foram previamente dissociadas, segundo protocolo descrito no item 4.5. As células foram ressuspendidas em 1 ml de DMEM alta glicose (Sigma). Foram coletados 9 µl desta suspensão e adicionado 1 µl de Azul de Trypan (GibcoBRL). Após cuidadosa homogeneização, colocaram-se as células em câmara de Neubauer para contagem e análise (vivas e mortas) em um microscópio Eclipse E600.

#### 4.7.3 Avaliação da morte celular por Anexina V

Para este teste foram utilizadas NSFs com 15 dias de cultivo que foram dissociadas segundo o protocolo descrito no item 4.5. As células foram ressuspendidas em 1 ml de DMEM alta glicose (Sigma). Desta solução, foram coletados 10 µl para

contagem em câmara de Neubauer. As células foram novamente centrigugadas a 400 xg durante 5 minutos e, em seguida, foram ressuspendidas em tampão FACs Flow. A suspensão foi transferida para tubos de citometria e adicionado o anticorpo Anexina V (Anexina V - FITC kit, ApoScreen) sendo incubado por 15 minutos a 4 °C. A análise de expressão foi realizada em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos, e as aquisições analisadas pelo programa WinMdi.

# 4.8 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)

Foram utilizadas NSFs formadas e dissociadas (de um mesmo cultivo, dividiu-se o conteúdo: metade da garrafa teve as NSFs dissociadas e a outra metade foi plaqueada com NSFs formadas). A dissociação seguiu o protocolo descrito no item 4.5. Esse foi o primeiro experimento para IF, repetido posteriormente com outro cultivo. Posteriormente, optou-se por realizar IF em NSFs íntegras.

As NSFs foram plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina em placa de 24 poços. A placa foi incubada a 37 °C por 7 dias.

Composição do meio de cultura para indução de diferenciação:

- DMEM alta glicose (Sigma) 70%
- HAM'S F12 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) 30%
- Penicilina/estreptomicina (GibcoBRL) 1%
- Suplemento B27 (GibcoBRL) 2%

Ao término deste período, aspirou-se todo o meio dos poços e as células foram fixadas PFA 4 % por 20 minutos a temperatura ambiente. A seguir o PFA foi aspirado e as células foram lavadas 3 vezes com TBS 1x. As células ficaram na geladeira por 48 horas com 500 µl/poço de TBS 1X.

Para IF, aspirou-se todo o TBS 1X e adicionou-se PFA 4 % por 30 min. As células foram lavadas 3 x por 5 minutos cada, com TBS 1X e incubadas com Triton X-100 0,1

% em PBS à temperatura ambiente por 10 minutos. Ao término desta incubação, as células foram novamente lavadas duas vezes com PBS 0,1 M pH 7,4 e bloqueadas com SFB 5 % e Triton X-100 0,1 % por 1 hora a temperatura ambiente. Foram então adicionados os anticorpos primários (Quadro 2) seguido de incubação *overnight* a 4 °C em câmara úmida.

Após este período, as células foram lavadas 2 vezes, 5 minutos cada, com TBS 1X e, em seguida, incubadas com os anticorpos secundários (Quadro 3) por 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 minutos cada, com TBS 1x, as lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Eclipse E600 (Nikon, Melville, NY, EUA). As imagens foram capturadas pela câmera digital Evolution MP Color (Media Cybemetics, Silver Spring, MD, EUA) utilizando-se o programa QcapturePro (QImaging, Surrey, BC, Canada).

Anticorpo	Diluição	Catálogo	Empresa
Anti-Nestin			
(policlonal-coelho)	1:10	N5413	Sigma-Aldrich
Anti-GFAP			
(policlonal-coelho)	1:50	Ab7260	Abcam
Anti-Galactocerebroside			
(mGalC)	5 µg	MAB342	Millipore
(monoclonal-camundongo)			
Anti- β-III Tubulin			
(monoclonal-camundongo)	1:50	Ab7751	Abcam

Quadro 2 - Anticorpos primários utilizados para caracterização/quantificação das células da SVZ de cobaias por meio da técnica de imunofluorescência e citometria de fluxo

Anticorpos	Diluição	Empresa
Anti- IgG de coelho –		
conjugado a TEXAS RED	1:300	Santa Cruz Biotechnology
Anti-IgG de coelho –		
conjugado a FITC	1:200	Sigma-Aldrich
Anti-IgG de camundongo –		
conjugado a FITC	1:200	Santa Cruz Biotechonoly

Quadro 3 - Anticorpos secundários utilizados para caracterização das células da SVZ de cobaias por meio da técnica de imunofluorescência

#### 4.9 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi realizada para verificar a expressão de marcadores de células neurais indiferenciadas, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Para tanto as NSFs obtidas de fetos de cobaias cultivadas por 15 dias foram plaqueadas em placas de petri (100x20mm, Corning - 430167) previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina. O meio utilizado para indução da diferenciação foi o descrito no item 4.8. A placa foi incubada a 37 °C com controle de umidade (maior que 95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub> por 10 dias, com troca do meio de cultivo a cada 3 dias. Ao término deste período, aspirouse todo o meio da placa e adicionou-se 1 ml de tripsina *TrypLE<sup>tm</sup>* por 6 minutos em estufa a 37 °C. As células foram centrifugadas a 400 xg e o sobrenadante descartado. Em seguida as células foram fixadas em 0,5 ml de solução contendo PFA 1% em PBS-BSA 1%, por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram centrifugadas a 400xg, o sobrenadante descartado e o pellet foi lavado com 0,5 ml de PBS e permeabilizado com solução de Triton X-100 0,1% em PBS por 6 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as células foram novamente lavadas com 0,5 ml de PBS. As células foram então incubadas à temperatura ambiente com anticorpo primário (Quadro 2) por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas com PBS e incubadas com

o anticorpo secundário (Quadro 4) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida as células foram novamente fixadas em 0,5 ml de solução contendo PFA 1% em PBS-BSA 1% à temperatura ambiente. Após 15 minutos as células foram novamente lavadas e ressuspendidas em 1 ml de PBS. A leitura e as análises foram realizadas em citômetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystem) empregando o aplicativo Attune Cytometric Sftware V1.2.5, com aquisição de, no mínimo, 5.000 eventos.

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando os seguintes controles: uma amostra contendo células não marcadas, uma amostra contendo o anticorpo secundário Alexa<sup>488</sup> e uma amostra contendo o anticorpo secundário Alexa<sup>647</sup>. Para eliminar uma possível autofluorescência, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas.

Quadro 4 - Anticorpos secundários utilizados para quantificação das células diferenciadas derivadas da SVZ de cobaias por meio da técnica de citometria de fluxo

Anticorpos	Diluição	Empresa
Anti- IgG de coelho –		
conjugado a Alexa <sup>488</sup>	1:300	Invitrogen
Anti- IgG de camundongo -		
conjugado a Alexa <sup>647</sup>	1:300	Invitrogen

# 4.10 MODULAÇÃO DE CÁLCIO (Ca2+) INTRACELULAR

O teste de variação intracelular de cálcio foi utilizado para a verificação da funcionalidade das células neurais. Para isso, NSFs obtidas de fetos de cobaias cultivadas por 15 dias foram plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina em placa de 24 poços. O meio utilizado para indução de diferenciação foi o

descrito no item 4.8. A placa foi incubada a 37 °C com controle de umidade (maior que 95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub> por 10 dias, com a troca de meio sendo realizada a cada 3 dias. Ao término deste período, aspirou-se todo o meio dos poços e adicionou-se o tampão A (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO4, 5,5 mM D-Glicose, 50 mM MOPS, 1 mM CaCl2, pH 7,2) suplementado com 5µM Fluo-3 AM (Molecular Probes, Caslsbad, CA), à temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com o tampão A.

Os neurotransmissores ácido gama-aminobutírico (GABA) (5 nM/) e glutamato (5 mM) foram adicionados ao meio, separadamente. Além disso, a droga *Thapsigargin* (2 nM) (THG) foi utilizada como controle positivo.

Após a adição de cada neurotransmissor bem como após a adição da THG, a fluorescência foi detectada e as imagens coletadas pelo microscópio de fluorescência Carl Zeiss AxioObserver Z1.

# 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística dos resultados foi determinada utilizando-se o método ANOVA e teste de Tukey. Os resultados apresentados são a média ± erro padrão, sendo considerados estatisticamente diferentes se p<0.05. Na comparação da viabilidade de NSFs derivadas de fetos e de animais de diferentes idades, utilizou-se teste estatístico Teste T-não pareado.

5 RESULTADOS

#### **5 RESULTADOS**

# 5.1 IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS NEUROGÊNICAS - MARCAÇÃO POR BrdU

Com o objetivo de identificar áreas com proliferação celular no encéfalo de cobaias neonatos – potencialmente neurogênicas – dois neonatos receberam injeções de BrdU e foram eutanasiados 12 horas após a última injeção. A incorporação de BrdU às células em proliferação foi detectada por IF utilizando-se o anticorpo anti BrdU. Dentre as áreas do encéfalo analisadas, foi observada marcação definida na zona subventricular dos ventrículos laterais (Figura 7A), hipocampo (Figura 7B) e bulbo olfatório (Figura 7C). Assim, determinou-se que a zona subventricular, hipocampo e bulbo olfatório de cobaias neonatos apresentam proliferação celular, se constituindo em áreas potencialmente neurogênicas após o nascimento.





Fonte - Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Neonatos de guinea pig receberam injeções de BrdU e foram eutanasiados 12 horas após última injeção. Seções do encéfalo dos neonatos inoculados foram submetidas à imunomarcação com anticorpo anti-BrdU seguida de coloração com DAPI. A figura mostra a imunorreatividade para BrdU (vermelho) e a coloração dos núcleos com DAPI (azul). Os insertos mostram a localização das respectivas seções no encéfalo. **(A)** Ventrículo lateral; **(B)** Hipocampo; **(C)** Bulbo olfatório. Objetiva 40x. Barra = 20 µm

# 5.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE NEUROESFERAS (NSFs)

As NSFs foram observadas tipicamente entre o final da primeira semana e o início da segunda semana de cultivo (Figura 8A). As NSFs caracterizavam-se por massas celulares, de tamanhos variáveis e superfície irregular que mantinham-se no sobrenadante dos cultivos (Figura 8B). Com o passar dos dias, o número de células formadas e, consequentemente, o diâmetro das NSFs, aumentava gradativamente. Em meio às NSFs, inúmeras células individuais com contornos regulares, refringentes e não-aderentes à superfície do frasco também foram observadas (Figura 8C).



Figura 8 - Neuroesferas derivadas da zona subventricular (SVZ) de fetos de cobaias

Fonte- Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Células da SVZ foram dissociadas enzimaticamente e cultivadas com meio contendo B27, FGF e EGF, em frascos tratados com poly-hema para evitar aderência à superfície. (A) Cultivo com seis dias. Observar o início da formação das NSFs. (B) Cultivo com nove dias. Observar a formação de massas celulares de tamanhos variáveis. (C) Cultivo com quinze dias. Observar diferenças dos diâmetros das NSfs formadas bem como presença de células individuais, refringentes e não aderentes (setas). Barra = 500 µm

Após 15 dias de cultivo as NSFs foram subcultivadas na proporção de 1:2, inicialmente sem dissociação. Após alguns dias, as NSFs subcultivadas proliferaram em número e aumentavam de tamanho nos cultivos resultantes (Figura 9). Tipicamente, alguns cultivos de NSFs foram submetidos a seis repiques sem dissociação, a cada sete dias, mantendo-se viáveis em cultivo por até aproximadamente 60 dias.





#### Fonte - Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Células da SVZ foram cultivadas em meio contendo B27, FGF e EGF, por aproximadamente 15 dias. Estas células foram então subcultivadas na proporção de 1:2, sem dissociação. Após 7 dias de cultivo as NSFs já apresentavam alto grau de proliferação com aumento em número e tamanho. Barra = 500 µm

As NSFs foram também submetidas a repique após dissociação enzimática associada com dissociação mecânica (protocolo descrito no item 4.5). As células dissociadas foram subsequentemente cultivadas (Figura 10A) e observadas quanto a capacidade proliferativa, ou seja, capacidade de originar novas NSFs. Em geral, as células dissociadas conservaram a sua capacidade proliferativa e foram capazes de gerar novas NSFs, com morfologia e tamanho similares às parentais. Essas NSFs secundárias foram observadas já a partir do quarto dia de subcultivo (Figura 10B). Durante os 15 dias em que foram mantidos os cultivos, as NSFs continuaram a aumentar de tamanho e número (Figura 10C). Conclui-se que células dissociadas de

NSFs conservam a sua capacidade proliferativa, e posteriormente, são capazes de formar novas NSFs.



Figura 10 - Subcultivo de neuroesferas (NSFs) derivadas da SVZ de fetos de cobaias, após dissociação enzimática

Fonte- Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Células da SVZ foram cultivadas em meio contendo B27, FGF e EGF, por aproximadamente 15 dias. Os cultivos foram então dissociados enzimática e mecanicamente e então subcultivados. (A) Células dissociadas enzimaticamente, dia 0. (B) Subcultivo de células dissociadas enzimaticamente, com quatro dias. Observar a presença de novas NSFs sendo formadas. (C) Subcultivo de células dissociadas, com 15 dias. Barra = 500 µm

### 5.3 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE NEUROSFERAS

Estudos de caracterização e diferenciação a médio e longo prazo, sem a necessidade da contínua utilização de animais, podem ser favorecidos pela

preservação de NSFs por congelamento. Assim, congelou-se NSFs íntegras e dissociadas e após descongelamento, os cultivos foram mantidos por aproximadamente 15 dias. Durante este período, no cultivo de NSFs dissociadas, observou-se a formação gradativa de novas NSFs que aumentavam também de tamanho (Figuras 11A, B, C, D). No cultivo de NSFs íntegras, também observou-se o aumento do tamanho de algumas NSFs, bem como um acréscimo na quantidade de NSFs. Assim, conclui-se que o método e meio de congelamento permite a preservação das NSFs e a sua capacidade proliferativa em cultivo. Não obstante, investigações adicionais são necessárias para determinar se o processo de congelamento e descongelamento afeta a capacidade e potencial de diferenciação das NSFs.

Figura 11 - Cultivo de células descongeladas derivadas da zona subventricular (SVZ) de fetos de cobaias cultivadas como neurosferas





Legenda: Células da SVZ foram cultivadas em meio contendo B27, FGF e EGF, por aproximadamente 15 dias. Os cultivos foram então congelados e descongelados, utilizando-se protocolos-padrão. (A) Células descongeladas, dia 0, aumento 20x. (B) Células descongeladas, com um dia, aumento 20x. (C) Células descongeladas, com 15 dias, aumento 4x. (D) Células descongeladas, com 15 dias, aumento 10x.

#### 5.4 VIABILIDADE E MORTE DAS NSFs

Para avaliar-se a viabilidade celular utilizou-se o método colorimétrico MTT. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT, resultando na produção de cristais de formazano, de cor violeta, no interior das células. A intensidade da cor é aferida em espectofotômetro, e pode ser correlacionada com a quantidade de células vivas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste T–não pareado.

NSFs dissociadas provenientes de fetos, de animais com uma semana de vida, animais com um mês de vida e animais com 180 dias de vida foram avaliadas. Todas as amostras tinham aproximadamente 15 dias de cultivo. Comparando as idades com o feto, observou-se que houve diferença estatística entre as idades (Figura 12), sendo as células provenientes de fetos mais viáveis do que aquelas derivadas de animais com mais idade.



Figura 12 - Viabilidade das células derivadas da zona subventricular (SVZ) de cobaias

A morte celular por apoptose foi estimada pelo método Anexina V em NSFs dissociadas provenientes de SVZ de fetos. As células estavam com 15 dias de cultivo. De um total de 1,9 milhão de células, apenas aproximadamente 2,3% estavam em processo apoptótico (Figura 13).

A morte celular por necrose também foi avaliada em NSFs dissociadas provenientes de cultivo de 15 dias. Células com membrana plasmática comprometida permitem a entrada do Azul de Trypan (GibcoBRL), enquanto que células viáveis excluem o corante. Ao microscópio, as células mortas apresentam coloração azul, enquanto que as vivas são claras e regringentes. Foram feitas duas contagens por pessoas diferentes. De um total de 1,78 milhão de células, aproximadamente 3,1% encontravam-se mortas (resultados não mostrados).

Fonte- Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Células da SVZ de fetos, cobaias com uma semana, um mês e 180 dias de idade foram cultivadas até a formação de neuroesferas (NSFs). As NSFs foram então submetidas a ensaios de MTT. Análise realizada em espectrofotômetro. As barras indicam as médias de triplicatas ± desvio padrão. \* p< 0,05

54.0% 1.9%



Legenda: Neuroesferas (NSFs) derivadas de células da SVZ de fetos de cobaias, com 15 dias de cultivo, foram submetidas a ensaio de anexina V para verificar ocorrência de apoptose

# 5.5 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NEURAIS

Para os ensaios de diferenciação, as NSFs provenientes de fetos de cobaias foram cultivadas em meio descrito no item 4.8. As NSFs foram plaqueadas sobre superfície previamente tratada com poli-L-lisina e laminina. Nos cultivos induzidos, após dois dias de cultivo, já foi possível observar a aderência das NSFs na superfície do frasco bem como uma quantidade variável de células, com morfologia diferente das originais, se afastando das NSFs (Figura 14A). O cultivo foi mantido por uma semana em estufa a 37 °C com CO<sup>2</sup> a 5% umidificada e, ao final deste período, já não era mais possível a identificação das NSFs. O que se notava era uma grande quantidade de

Fonte- Fonseca, E. T. (2012).

células morfologicamente diferentes das originais (Figura14B). Em contraste, NSFs plaqueadas em superfície tratada com poli-L-lisina e laminia e mantidas em meio com fatores de crescimento, mantiveram a proliferação como neuroesferas, não observando-se diferenciação celular (Figura 14C).

Figura 14 - Ensaios de diferenciação celular de células derivadas da zona subventricular (SVZ) de fetos de cobaias cultivadas como neurosferas (NSFs)



Fonte - Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Após cultivo inicial até a sua formação, as NSFs foram cultivadas em superfície tratada com poli-L-lisina para promover a adesão. Foi utilizado meio suplementado com B27 e sem fatores de crescimento para NSFs. (A) Dois dias de cultivo. Observar o início da formação de células com morfologia diferente ao redor das NSFs. Aumento 10x. (B) Sete dias de cultivo. Observar a quantidade de células com morfologia diferente e a incapacidade de se delimitar o formato das NSFs. Aumento 20x. (C) Células controle. Sete dias de cultivo. Observar a proliferação de células morfologicamente parecidas e a persistência da NSFs em seu formato original. Aumento de 10x

Dentre os marcadores investigados, a nestina, Beta-III-tubulina, mGalC e GFAP foram identificados em NSFs induzidas à diferenciação (Figura 15A, B, C e D).

Na marcação para a nestina, observa-se uma grande quantidade de células positivas nas NSFs como também em células individualizadas.

A marcação para o GFAP caracterizou-se por coloração citoplasmática difusa, de intensidade variável entre as células. Observou-se grande quantidade de células positivas fazendo parte das NSFs.

Células positivas para mGalC e Beta-III-tubulina foram melhor visualizadas dentre as células que se desprenderam das NSFs. Ambas as marcações caracterizaram-se por coloração citoplasmática.

Figura 15 - Imunofluorescência (IF) em células de neuroesferas (NSFs) cultivadas sob condições de diferenciação


Fonte – Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: NSFs cultivadas em meio suplementado com B27 sem fatores de crescimento para NSFs foram submetidas a IF indireta, utilizando-se anticorpos primários específicos para marcadores neurais. Células marcadas com anticorpo anti-nestina conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorpo anti-mGalC conjugado com FITC (verde); Células marcadas com anticorp

#### 5.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Para a quantificação das populações celulares geradas após indução de diferenciação, as NSFs provenientes de fetos de cobaias foram cultivadas em meio suplementado com B27 e sem os fatores de crescimento para NSFs. Após 10 dias de cultivo as análises da caracterização imunofenotípica das células diferenciadas indicaram que da população analisada, cerca de 13,3% eram positivas para o marcador de células neurais indiferenciadas (nestina), cerca de 5,5% eram positivas para o marcador de neurônios (beta-III-tubulina), cerca de 9% eram positivas para o marcador de astrócitos (GFAP) e cerca de 7,8% eram positivas para o marcador de oligodendrócitos (mGalC) (Figura 16).





Fonte - Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: Análise de marcadores para tipos celulares específicos em NSFs induzidas à diferenciação. Em cada figura, as áreas delimitadas nos Dot Plots correspondem à população analisada após exclusão da população celular morta e seu histograma correspondente. Em (A) notar a expressão antigênica de marcadores para células neurais indiferenciadas (nestina); em (B) para células neurais (Beta-III-tubulina); em (C) para astrócitos (GFAP) e em (D) para oligodendrócitos (mGalC)

# 5.7 MODULAÇÃO DE CÁLCIO (Ca<sup>2+</sup>) INTRACELULAR

A variação intracelular de cálcio foi utilizada como indicador de funcionalidade das células neurais diferenciadas. Após diferenciação, os neurotransmissores ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato foram adicionados ao meio, separadamente. A droga *Thapsigargin* (THG) (2 nM) foi adicionada como controle positivo. Imagens foram coletadas continuamente após a adição das drogas. Imagens estáticas representativas obtidas em determinados intervalos após a adição das drogas estão apresentadas nas figuras 17A, 17B e 17C. Em resumo, nenhuma atividade foi detectada sem a adição dos neurotransmissores (Figura 17A), contrastando com marcação da maioria das células após adição do THG (Figura 17D). Estimulação de um número variável de células foi observada após adição de glutamato (Figura 17B) e GABA (Figura 17C). Esses resultados indicam que as células diferenciadas a partir das NSFs apresentam indicadores funcionais de neurônios.





Fonte - Fonseca, E. T. (2012).

Legenda: NSFs induzidas à diferenciação por 7 dias foram incubadas com o marcador de Ca<sup>2+</sup> Fluo 3AM. Durante a filmagem, imagens foram captadas em quatro momentos: antes da adição dos neurotransmissores, durante a adição do neurotransmissor glutamato, durante a adição do neurotransmissor GABA e durante a adição da droga-controle THG. Em (A) e (D) o momento antes da adição do neurotransmissor glutamato; em (B) o momento após adição do glutamato; em (C) e (F) após a adição da THG e em (F) após a adição do GABAA. As setas nas fotos (B) e (E) indicam a fluorescência detectada após adição dos neurotransmissores glutamato e GABA, respectivamente. Notar em (C) e (F) a grande quantidade de células fluorescentes em resposta à adição da THG. Barra = 50 µm

# 6 DISCUSSÃO

#### 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram a presença de células-tronco neurais (CTNs) na SVZ de fetos de cobaias próximos a termo. Essas células, quando dissociadas do tecido e cultivadas in vitro são capazes de originar neuroesferas (NSFs). As células que compõe as NSFs são potentes para gerar NSFs secundárias, com características morfológicas semelhantes às primárias. Essas NSFs podem ser cultivadas por várias passagens, preservando as suas propriedades morfológicas e proliferativas. Também podem ser congeladas e, após descongelamento, retomam a proliferação e divisão em cultivo. A presença de CTNs nas NSFs cultivadas foi demonstrada pelo uso de anticorpos específicos contra marcadores de populações celulares. Células com marcadores para CTNs (nestina) e para os três tipos celulares neurais principais, neurônios (Beta-III-tubulina), astrócitos (GFAP) e oligodendrócitos (mGalC), foram identificadas por imunofluorescência nas NSFs submetidas à diferenciação. Ensaios de proliferação e diferenciação indicam que as NSFs podem se diferenciar nos três principais tipos celulares do sistema nervoso. Além disso, ensaios preliminares de funcionalidade indicam que células neurais diferenciadas das NSFs apresentam indicadores de funcionalidade neuronal. Esses resultados são promissores e podem embasar estudos adicionais visando uma caracterização funcional mais detalhada e, eventualmente, visando viabilizar o uso terapêutico de CNTs.

Desde os estudos pioneiros por Reynold e Weiss (1992), que verificaram que células com propriedades de CTNs podiam ser cultivadas como NSFs a partir do cérebro adulto, o ensaio de formação de NSFs tem sido amplamente utilizado na pesquisa de células-tronco neurais. Células dissociadas do tecido estriado, que inclui a SVZ, quando cultivadas *in vitro* eram capazes de se proliferar como agregados celulares não aderentes à superfície do frasco. A maioria das células dessas NSFs expressava a nestina, uma proteína constituinte dos filamentos intermediários de células-tronco neuroepiteliais. Subsequentemente, após dissociação e cultivo em superfície aderente, as células eram capazes de se diferenciar em neurônios e células da glia. Esses ensaios foram pioneiros na demonstração de células-tronco

multipotentes no cérebro de mamíferos adultos e foram precursores na utilização do ensaio de formação de NSFs na pesquisa de CTNs e neurogênese em mamíferos (PASTRANA et al., 2011). Desde esses estudos iniciais, o ensaio tem sido aperfeiçoado de modo a acomodar as novas descobertas e permitir a investigação de outros aspectos da neurogênese. Não obstante a sua inegável utilidade e ampla utilização, o método apresenta restrições, sobretudo devido à variabilidade introduzida por diferentes protocolos utilizados. Essa variabilidade metodológica tem, eventualmente, poduzido resultados diferentes e, muitas vezes conflitantes, entre diferentes estudos. Essa variabilidade metodológicos que ocorrem *in vivo*. Devido a isso, previamente ao desenvovimento do presente estudo, vários protocolos foram revisados e, após a sua análise, foram selecionados aqueles que aparentemente mais se adequavam aos propósitos e objetivos deste trabalho.

# 6.1 IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS NEUROGÊNICAS

A marcação por BrdU *in vivo* (HASHIMOTO et al., 2008) ou *in vitro* (PIPER et al., 2001) tem sido utilizada há muito tempo para o mapeamento de células em proliferação, em humanos e animais (PIPER et al., 2001; BUDDENSIEK et al., 2010). O BrdU, como análogo de nucleotídeo, é incorporado nas cadeias nascentes de DNA, e a sua incorporação indica a atividade mitótica, indicador de proliferação celular (TAUPIN, 2007). Embora a atividade de reparo de DNA (que também utiliza e incorpora nucleotídeos) esteja ativa em células diferenciadas e em repouso, como os neurônios, a incorporação ativa do BrdU é um bom indicador de atividade mitótica.

Os estudos pioneiros da neurogênese em cobaias utilizaram timidina marcada com tritium (3<sup>H</sup>) como indicador de síntese de DNA, marcando células que estavam iniciando atividade mitótica (ALTMAN; DAS, 1967). Naquele estudo, proliferação celular indicativa de neurogênese foi identificada no hipocampo de cobaias na vida pós-natal, indicando que a neurogênese prossegue na vida pós-natal nessa espécie, mesmo que

os neonatos possuam o encéfalo com dimensões e desenvolvimento próximos aos de animais maduros. Embora esse método de marcação também seja adequado para identificar células em proliferação, a utilização de isótopo radioativo como marcador e a necessidade de autoradiografia para revelar a reação dificultava o procedimento. Posteriormente, a marcação com BrdU substituiu com vantagens esse método.

Anteriormente, acreditava-se que uma região restrita da SVZ, a SVZa, era a responsável pela geração de precursores neurais (KORNACK; RAKIC, 2001) e que regiões mais caudais eram as responsáveis pela geração de células da glia (GARCIA-VERDUGO et al., 1998). No presente estudo, células positivas para o BrdU – e potencialmente em divisão - foram identificadas distribuídas pela SVZ de cobaias recém nascidos. Embora o n examinado tenha sido pequeno, esse achado foi bastante consistente. Com base nesses achados, aliando-se ao fato de que estudos anteriores tem demonstrado que progenitores neurais podem estar presentes em várias áreas da SVZ (JIAO; CHEN, 2008), optou-se pela coleta e análise de toda a SVZ. Independentemente desses achados preliminares, e que serviram de orientação para o restante do trabalho, um mapeamento mais fino das áreas de incorporação de BrdU no encéfalo de animais com diferentes idades pode permitir a identificação e relativa contribuição para a neurogênese pós-natal das diversas áreas potencialmente neurogênicas do encéfalo de cobaias. A marcação com BrdU pode viabilizar o estudo da evolução qualitativa e quantitativa de áreas neurogênicas ao longo da vida pós-natal, por exemplo. Da mesma forma, pode permitir a investigação de fatores e estímulos que desencadeiem e/ou alterem a atividade neurogênica em determinadas áreas, como traumatismos crânio-encefálicos e isquemia cerebral, por exemplo.

## 6.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE NEUROESFERAS

A SVZ dos ventrículos laterais de fetos de cobaias em final de gestação foi de fácil localização. Após a necrópsia e remoção do encéfalo da caixa craniana, essa área era facilmente identificada com o auxílio de uma lupa e excisada do restante do encéfalo. Durante a excisão, tomou-se o cuidado de evitar a excisão concomitante de tecidos adjacentes.

Os fragmentos excisados eram digeridos com tripsina associado à dissociação mecânica, resultando em uma suspensão celular que era, então, colocada em cultivo. Em seguida, as células eram cultivadas em frascos revestidos com poly-hema, em meio sem soro contendo os fatores de crescimento EGF e FGF. Tipicamente após 7 a 10 dias, as neurosferas (NSFs) já puderam ser visualizadas no sobrenadante dos cultivos. Gargcía-Verdugo et al. (1998) deram o nome de "cluster" a este aglomerado de células provenientes da SVZ que possuem a capacidade de gerar neurônios, astrócitos e oligodendrócitos.

Em estudo com camundongos adultos, Reynolds e Weiss (1992) concluiram que a presença do EGF no meio de cultivo é imprescindível para a divisão celular, embora Alvarez-Buylla e García-Verdugo (2002) acreditem que a utilização somente do FGF, estimule a proliferação das células da SVZ *in vitro*. Em estudo comparativo de células-tronco embrionárias de camundongos e ratos, Smith et al. (2003) demonstraram que progenitores neurais embrionários cultivados em meio livre de soro e suplementado com FGF apresentam um padrão similar de proliferação, com uma taxa constante (ou regular) de divisão celular até 4-5 semanas, seguida de redução da proliferação. No presente estudo, não foi tentado o cultivo de NSFs com apenas um dos fatores de crescimento, não se podendo inferir, portanto, acerca das exigências das células de cobaias para a proliferação e geração de NSFs. Em geral, as NSFs foram mantidas por até 2 - 3 semanas.

Em diferentes experimentos com fetos de camundongos, as NSFs eram dissociadas mecânica (KULESHOVA et al., 2009) ou enzimaticamente (MILOSEVIC et al., 2005) antes de serem replaqueadas em meio de cultivo fresco. No presente estudo, observou-se que a utilização somente da pipeta de 200 µl era eficaz na dissociação das NSFs provenientes de fetos ou de animais com uma semana de vida. Nas NSFs provenientes de animais com 30 e 180 dias de idade, verificou-se maior dificuldade na individualização das células utilizando somente a dissociação mecânica. Com isso, passou-se a associar a tripsina ao método de dissociação. Desta forma, as células a serem dissociadas passavam por tratamento com tripsina seguido de dissociação

mecânica. Após a individualização, plaqueamento e cultivo, as NSFs foram submetidas a vários repiques, com ou sem dissociação mecânica/enzimática, sempre em meio contendo EGF e FGF. Após alguns dias, as NFSs subcultivadas proliferavam e aumentavam de tamanho. Não foram observados sinais de senescência durante os 57 dias de cultivo, uma vez que não identificaram-se diferenças nos padrões de proliferação ou crescimento celular. A senescência em cultivo de longa duração ainda é controversa. Alguns estudos observaram um dramático decréscimo na proliferação do cultivo de progenitores neurais (SVENDSEN et al., 1997) enquanto outros mantiveram os cultivos por períodos de até 140 dias (SMITH et al., 2003). Estes resultados sugerem que a senescência parece não ser evento biológico consistente nessas células, mas sim pode resultar de falhas em providenciar um ambiente propício para a sobrevivência e contínua proliferação (SMITH et al., 2003).

#### 6.3 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Para beneficiar-se dos resultados da pesquisa e futura aplicação terapêutica, é essencial que as NSFs mantenham a sua multipotencialidade após criopreservação.

Na literatura, vários protocolos e meios de criopreservação são descritos (MILOSEVIC et al., 2005; KULESHOVA et al., 2009; MA et al., 2010). O meio utilizado para congelamento das NSFs consistia de 90% SFB (soro fetal bovino) + 10% de DMSO. O DMSO, com ou sem soro fetal, tem sido comumente utilizado como crioprotetor (KULESHOVA et al., 2009). As NSFs foram congeladas íntegras ou após dissociação e foram mantidas no nitrogênio líquido por 25 dias. Após o descongelamento, observou-se que a capacidade proliferativa das NSFs congeladas dissociadas não foi afetada pela criopreservação. Nesse protocolo de congelamento, já à partir do 4º dia pós-descongelamento novas NSFs foram visualizadas. Entretanto, as NSFs íntegras descongeladas não apresentaram o mesmo resultado, apresentando baixa viabilidade e proliferação lenta/ausente após o descongelamento. Isso pode ser devido à dificuldade de penetração do crioprotetor DMSO no interior das massas

celulares que compõem as NSFs, sobretudo aquelas maiores (MA et al., 2010). Testes de multipotencialidade ainda não foram realizados a partir de NSFs congeladas e descongeladas, porém acredita-se que a capacidade de originar as células da glia e neurônios não seja afetada, uma vez que estudos anteriores comprovaram que essa capacidade não é afetada pela criopreservação (MILOSEVIC et al., 2005). Por outro lado, a experiência adquirida recomenda o congelamento de células individualizadas, e não NSFs íntegras.

#### 6.4 MARCADORES CELULARES

As CTNs são consideradas multipotentes, pois são capazes de originar os principais tipos celulares do tecido nervoso, ou seja, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (JANDIAL et al., 2007). Os neurônios se constituem nas unidades celulares fundamentais do sistema nervoso. São células altamente polarizadas que, durante sua maturação, originam subpopulações celulares distintas que possuem diferentes funções (ZIGMOND et al., 1999). Os oligodendrócitos são células produtoras de mielina, que possibilita a rápida condução do impulso nervoso ao longo dos axônios. Os astrócitos, por sua vez, são células em forma de estrela, que fornecem importante suporte estrutural e metabólico aos neurônios (DOETSCH, 2003).

Diversas moléculas tem sido utilizadas como marcadores celulares (células progenitoras e células diferenciadas) de linhagens e de estádios de diferenciação celular na neurogênese, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*. Em geral, a Beta-III-tubulina (marcador neuronal), nestina (células indiferenciadas), GFAP (astrócitos) e mGalC (oligodendrócitos) são os marcadores mais utilizados em estudos em ratos e em camundongos (SEABERG; KOOY, 2002; JIAO; CHEN, 2008; BAIZABAL; COVARRUBIAS, 2009; LI et al., 2009). Além destes, a NeuN (neurônios) (BAIZABAL; COVARRUBIAS, 2009; LI et al., 2009), O4 (oligodendrócitos maduros) (SEABERG; KOOY, 2002; JIAO; CHEN, 2008; BAIZABAL;

MAP2ab (neurônios) (SEABERG; KOOY, 2002; LIU et al., 2004; JIAO; CHEN, 2008) também são utilizados como marcadores de células cultivadas *in vitro*.

A falta de anticorpos específicos para os marcadores de células de cobaias representou – e representa - um dos principais entraves na identificação das subpopulações celulares envolvidas na neurogênese nessa espécie. Assim, no processo de escolha dos anticorpos utilizados, pela semelhança filogenética entre espécies, deu-se prioridade a anticorpos produzidos contra proteínas de roedores (ratos, coelhos, camundongos); e de preferência, que houvesse uma certa previsão de reatividade com outras espécies, em especial cobaias. Como segundo critério de escolha, preferiram-se anticorpos policionais, pelo espectro mais amplo de reconhecimento e, neste caso, pela maior possibilidade de reconhecer proteínas semelhantes, não necessariamente idênticas. A falta de controles positivos para atestar-se da correta execução da técnica e reatividade dos anticorpos utilizados se constituiu em outra dificuldade na padronização e execução da técnica de IF.

Dentre os marcadores investigados, a nestina, Beta-III-tubulina, mGalC e GFAP foram identificados em NSFs induzidas à diferenciação. Na marcação para a nestina observou-se uma grande quantidade de células positivas nas NSFs como também em células individualizadas. A nestina é uma proteína do filamento intermediário que foi inicialmente identificada em estádios primários do desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico, embora mais tarde tenha sido identificada em células progenitoras de outros tecidos não-neurais (TAKAMORI et al., 2009). No encéfalo de mamíferos adultos, esta proteína tem sido detectada em CTNs da SVZ e DG (DOETSCH et al., 1997), sendo portanto, utilizada como marcador de células imaturas do SNC. Embora as NSFs tenham sido induzidas a diferenciação, ficou evidente que restaram muitas células com características de CTNs, não só no centro das NSFs como também individualizadas. Já Schwartz et al. (2003) encontraram maior quantidade de células positivas para a nestina na margem externa das NSFs, comparando com células positivas para GFAP, que ficaram mais no centro. No presente trabalho não foi realizada dupla marcação, de forma que não se pode inferir se há diferença na localização de células positivas para nestina ou GFAP.

Análise por citometria de fluxo revelou que o percentual de células positivas para a nestina decresce gradativamente em cultivo sob condições de diferenciação (MCLAREN et al., 2001), reduzindo de aproximadamente 30% das células indiferenciadas para 16% do total de células diferenciadas (MARTIN et al., 2009). No presente trabalho foi analizada a expressão de marcadores por citometria de fluxo apenas após a diferenciação, não tendo sido possível acompanhar alterações de expressão no decorrer da diferenciação. Após a diferenciação, cerca de 13,3% das células eram positivas para o marcador de células neurais indiferenciadas (nestina).

A tubulina é a principal constituinte dos microtúbulos, sendo que a expressão da classe III (Beta-III) é primariamente restrita ao sistema nervoso central e periférico. A descoberta de que neurosferas do GD de roedores adultos são unipotentes, dando origem somente a células da glia foi um achado inesperado (SEABERG; KOOY, 2002), uma vez que a presença de células que dão origem a novos neurônios no GD de adultos de diversas espécies (ALTMAN; DAS, 1967; PALMER et al., 2001) tem sido bem documentada, inclusive em cobaias (GUIDI et al., 2005). Piper et al. (2001) concluiram que o encéfalo de fetos humanos possui progenitores neurais que, quando cultivados in vitro, são capazes de gerar neurônios maduros no intervalo de apenas duas semanas. Os resultados do presente trabalho indicam que, além do GD, a SVZ de cobaias também pode ser uma área produtora de novos neurônios in vitro. No estudo desenvolvido por MCLaren et al., (2001), os autores concluiram que o decréscimo no percentual de células positivas para nestina, em células induzidas à diferenciação, se deve a gradativa substituição por células positivas para Beta-III-tubulina. O percentual de células positivas para Beta-III-tubulina aumenta de aproximadamente 25% em células indiferenciadas para mais de 70% das células diferenciadas (MARTIN et al., 2009). No presente trabalho, após 10 dias de diferenciação, a citometria de fluxo resultou cerca de 5,5% de células positivas para o marcador de neurônios (Beta-IIItubulina). A diferença pode estar relacionada ao protocolo de diferenciação, uma vez que os autores utilizaram FGF no meio de diferenciação, o que resultou numa melhor migração celular a partir das neuroesferas.

GFAP é também um componente dos filamentos intermediários que está presente em astrócitos. A marcação para o GFAP caracterizou-se por coloração citoplasmática difusa, de intensidade variável entre as células. Embora não fossem quantificadas, a imunofluorescência revelou um grande número de células positivas para o GFAP nas NSFs. A análise por citometria de fluxo revelou que após diferenciação, cerca de 9% da população celular era positiva para o marcador de astrócitos. Ara et al. (2010) encontraram cerca de 30% de células GFAP positivas em células induzidas à diferenciação. Já Martin et al. (2009) observaram o marcador de astrócitos GFAP expresso em aproximadamente 20% das células indiferenciadas, aumentando para cerca de 35% das células diferenciadas.

O mGalC é o principal lipídio na formação da mielina, sendo, portanto, muito utilizado como marcador de oligondendrócitos. A utilização da laminina e associação com a poli-L-lisina favoreceu um substrato eficiente para adesão e diferenciação das NSFs, com quantidade variável de células mGalC positivas migrando para fora das NSFs, embora estudos comprovem que o substrato utilizado para induzir a diferenciação pode influenciar no comportamento das neuroesferas, gerando maior ou menor quantidade de oligondrócitos nas células que migraram das neuroesferas comparado com as que permaneceram (REN et al., 2009). Embora este padrão não tenha sido identificado no presente trabalho, sabe-se que a utilização do FGF no meio durante os dois primeiros dias de plaqueamento para diferenciação permite uma melhor migração das células para fora das NSFs (MARTIN et al., 2009). Células positivas para mGalC foram melhor visualizadas dentre as células que se desprenderam das NSFs do que nas NSFs íntegras. Cerca de 7,8% das células induzidas à diferenciação eram positivas para o marcador de oligodendrócitos (mGalC), resultado bastante semelhante ao relatado por Martin et al. (2009) que encontraram cerca de 8% da população total analizada sendo positiva para este marcador. A positividade para o mGalC indica a multipotencialidade das NSFs provenientes da SVZ dos cobaias, confirmando esta região como sendo produtora de CTNs, diferentemente do GD de ratos que abrigam progenitores gliais específicos com limitada capacidade de auto-renovação (SEABERG; KOOY, 2002).

Embora inicialmente considerava-se que as NSFs eram formadas por uma população homogênea de células multipotentes positivas para a nestina - marcador de CTNs - atualmente é aceito que NSFs individuais são compostas por uma mescla de

verdadeiras CTNs, células precursoras e células diferenciadas (MACLAREN et al., 2001; PASTRANA et al., 2011). Como várias subpopulações de células da SVZ podem dar origem as NSFs, e a expressão gênica se altera dinamicamente ao longo do processo de diferenciação (PASTRANA et al., 2011), células em diferentes estádios de diferenciação e, assim, com diferentes marcadores, podem ser identificadas nas NSFs (MCLAREN et al., 2001; MARTIN et al., 2009).

É importante salientar que, embora as condições de diferenciação utilizadas no presente estudo seja semelhante às usadas por diversos autores (MCLAREN et al., 2001; MARTIN et al., 2009; ARA et al., 2010), deve-se considerar que o padrão de proliferação e diferenciação de CTNs pode apresentar peculiaridades espécie-específicas (SMITH et al., 2003).

# 6.5 MODULAÇÃO DE CÁLCIO (Ca2+) INTRACELULAR

Grande parte dos eventos celulares, fisiológicos ou patológicos, é acompanhada por alterações iônicas (TAKAHASHI et al., 1999). O cálcio (Ca<sup>2+</sup>) é o íon mais abundante nos vertebrados e o mais versátil sinalizador intracelular que pode regular várias funções celulares diferentes. A diferença das concentrações do íon livre existentes no meio extracelular – em torno de mM – e intracelular – em torno de nM – produzem um gradiente eletroquímico. Alterações de permeabilidade de membrana, induzidas por estímuos fisiológicos, podem induzir mudanças na concentrações citossólica de cálcio (BERRIDGE et al., 2003). O íon em altas concentrações citossólicas pode prejudicar a função ou mesmo causar a morte celular, apesar de ser fundamental na sua sinalização (GARCIA, 1999).

Os indicadores de Ca<sup>2+</sup> mais utilizados são as sondas fluorescentes, pois em geral, a sua emissão de luz é bastante evidente para uma dada mudança na concentração de cálcio. Dentre os diferentes indicadores de fluorescência de Ca<sup>2+</sup> está o Fluo 3 AM. Este tem sido o indicador de Ca<sup>2+</sup> mais adequado para microscopia de fluorescência, microscopia confocal e citometria de fluxo. Quando excitado por meio de

laser de argônio, gera um comprimento de onda de radiação bastante visível. O Fura 2 AM é um indicador de Ca<sup>2+</sup> por meio da excitação ultravioleta. Irradiação ultravioleta é mais citotóxica quando comparada com radiação a laser. Além disso, alguns constituintes intracelulares emitem fluorescência intrínsica quando excitadas com radiação ultravioleta, o que pode interferir com a avaliação exata da concentração de Ca<sup>2+</sup> (TAKAHASHI et al., 1999).

No presente estudo, foi realizado um ensaio de modulação/influxo de Ca<sup>2+</sup> intracelular em células diferenciadas a partir das NSFs de fetos de cobaias, para investigar a funcionalidade relacionada à fisiologia neuronal. Os neurotransmissores GABA e glutamato foram adicionados ao meio, bem como a droga *Thapsigargin* (THG) como controle positivo. A THG é uma droga inibidora da SERCA e promove o aumento na concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> por meio da liberação deste íon do retículo endoplasmático (BAGNARESI et al., 2009). A resposta celular se traduziu em aumento da fluorescência após a adição de cada droga.

Piper et al. (2001) ao caracterizarem precursores neurais a partir de tecido fetal humano, utilizaram o Fura 2 AM para mensuração do Ca<sup>2+</sup> intracelular. Em células diferenciadas (14 dias) 3-5% das células positivas para Beta-III-tubulina expressaram imunorreatividade para os neurotransmissores GABA ( $4\% \pm 2\%$ ), glicina ( $6\% \pm 3\%$ ) e glutamato (12% ± 4%). Esta marcação não foi evidenciada em todas as passagens celulares, indicando que uma população neuronal heterogênea havia sido gerada. No presente estudo não tentou-se correlacionar a resposta aos diferentes estímulos com os marcadores celulares e, embora não tenham sido quantificados, os resultados demonstraram claramente um aumento da fluorescência de algumas células em resposta à adição dos neurotransmissores GABA e glutamato. A resposta à adição do GABA já era esperada, uma vez que os novos neurônios originados na SVZ migram rostralmente para o bulbo olfatório onde se tornam interneurônios locais maduros (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIA-VERDUGO, 2002). E já tem sido bem documentado a presença do GABA e dopamina em uma quantidade significativa de interneurônios do BO de roedores (KOSAKA; KOSAKA, 2005). A resposta positiva ao glutamato pode ser explicada pelo fato do glutamato ser o neurotransmissor excitatório predominante no SNC de mamíferos (COWAN et al., 1997). Quando adicionada a droga THG, observouse um aumento de fluorescência generalizado das células em cultivo. Estes resultados demonstram a presença de indicadores funcionais de neurônios em uma proporção das células diferenciadas, suportando a hipótese de que células da SVZ de fetos de cobaias apresentam multipotencialidade, sendo capazes de originar células neurais funcionais *in vitro*, desde que cultivadas e induzidas por estímulos adequados.



### 7 CONCLUSÕES

- Células da SVZ de fetos cobaias cultivadas sob condições adequadas *in vitro* são capazes de originar neuroesferas (NSFs) com capacidade proliferativa;

- As células componentes das NSFs apresentam marcadores de células tronco neurais, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, em diferentes níveis;

- Células das NSFs podem ser induzidas a diferenciação, originando células com características morfológicas específicas e com propriedades funcionais compatíveis com neurônios.

- A capacidade de células da SVZ de cobaias originarem células neuronais é promissora para embasar estudos futuros que possam, eventualmente, viabilizar o uso terapêutico de células tronco em doenças do sistema nervoso.



# REFERÊNCIAS

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Postnatal neurogenesis in guinea pig. **Nature**, v. 214, p.1098-1101, 1967.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 629-634, 2002.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; TRAMONTIN, A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. **Nature Reviews**, v. 2, p. 287-293, 2001.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; LOIS, C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. **Stem Cells**, v. 13, p. 263-272, 1995.

ARA, J.; FEKETE, S.; ZHU, A.; FRANK, M. Characterization of neural stem/progenitor cells expressing VEGF and its receptors in the subventricular zone of newborn piglet brain. **Neurochemestry Research**, v. 35, n. 9, p. 1455-1470,2010.

ARMSTRONG, R. J.; BARKER, R. A. Neurodegeneration: a failure of neurodegeneration? **Lancet**, v. 358, n. 9288, p. 1174-1176, 2001.

ARSENIJEVIC, Y.; VILLEMURE, J-G.; BRUNET J-F.; BLOCH, J. J.; DÉGLON, N.; KOSTIC, C.; ZURN, A.; AEBISCHER, P. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the human brain. **Experimental Neurology**, v. 170, n. 1, p. 48-62, 2001.

BAGNARESI, P.; ALVES, E.; SILVA, H. B.; EPIPHANIO, S.; MOTA, M. M.; GARCIA, C. R. S. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelli asynchronous* infections are not affected by melatonin. International Journal of General Medicine, v. 2, p. 47-55, 2009.

BAIZABAL, J. M.; COVARRUBIAS, L. The Embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. **Developmental Biology**, v. 325. p. 49-59. 2009.

BERNINGER, B.; HACK, M. A.; GÖTZ, M. Neural Stem Cells: On Where They Hide, in Wich Disguise, and HowWe May Lure Them Out. In: WOBUS, A. M.; BOHELER, K. L. **Stem Cells,** Berlin: Springer, 2006. 414 p.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Clacium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. **Molecular Cell Biology,** v. 4, p. 517-529, 2003.

BONAGUIDI, M. A.; PENG, C-Y.; McGUIRE, T.; FALCIGLIA, G.; GOBESKE, K. T.; CZEISLER, C.; KESSLER, J. A. Nogging expands neural stem cells in the adult hippocampus. **The Journal of Neuroscience.** v. 28. n. 37, p. 9194-9204, 2008.

BUDDENSIEK, J.; DRESSEL, A.; KOWALSKI, M.; RUNGE, U.; SHROEDER, H.; HERMANN, A.; KIRSCH, M.; STORCH, A.; SABOLEK, M. Cerebroespinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor ell but inhibits proliferation and neuronal differentiation. **BMC Neuroscience**, v. 11, n. 48, p. 1471-2202, 2010.

CONTI, L.; REITANO, E.; CATTANEO, E. Neural stem cell system: diversities and properties after transplantation animal models of diseases. **Brain Pathology**, v. 16, p. 143-154, 2006.

COSKUN, V.; WU, H.; BIANCHI, B.; TSAO, S.; KIM, K.; ZHAO, J.; BIACONTTI, J. C.; HUTNICK, L.; JR, K. C.; FAN, G.; VELLIS, J. de; SUN, Y. E. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. **PNAS**, v. 105, n. 3, p. 1026-1031, 2008.

COUTO, S. E. R. Criação e Manejo de Cobaias. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. de. **Animais de laboratório:** criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. 387 p.

COWAN, W. M.; JESSELL, T. M.; ZIPURSKY, S. L. **Molecular and cellular approaches to neural development**. New York: Oxford university press, 1997. 563 p.

DERTINGER, S. K.; JIANG, X.; LI, Z.; MURTHY, V. N.; WHITESIDES, G. M. Gradients of substrate buond laminin orient axonal specification of neurons. **PNAS**, v. 99, n. 20, p. 12542-12547, 2002.

DOETSCH, F. The glial identity of neural stem cells. **Nature Neuroscience,** v. 6, n. 11, p. 1127-1134, 2003.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **The Journal of Neuroscience,** v. 17, n. 13, p. 5046-5061, 1997. FRISÉN, J.; JOHANSSON, C. B.; LOTHIAN, C.; LENDAHL, U. Central nervous system stem cells in the embryo and adult. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 935-945, 1998.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science,** v. 287, n. 5457, p. 1433–1438, 2000.

GARCIA, C. R. Calcium homeostasis and signaling in the bloo-stage malaria parasite. **Parasitology Today**, v. 15, n. 12, p. 488-491, 1999.

GARCIA-VERDUGO, J. M.; DOETSCH, F.; WICHTERLE, H.; LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. **Jornal Neurobiology**, v. 36, p. 234-248, 1998.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. **Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 777-788, 2005.

GUIDI, S.; CIANTI, E.; SEVERI, S.; CONTESTABILE, A.; BARTESAGHI, R. Postnatal neurogenesis in the dentate gyrys of the guinea pig. **Hippocampus**, v. 15, p. 285-301, 2005.

HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151 p.

HASHIMOTO, E.; NAKAKURA-OHSHIMA, K.; KENMOTSU, S.; SUZUKI, H.; NAKASONE, N.; SAITO, C.; HARADA, H.; OHSHIMA, H. The relationship between the cusp pattern and plural stem cell compartments in guinea pig cheek teeth by chasing BrdU-labeling. **Archives of Histology and Cytology**, v. 71, n. 5, p. 317-332, 2008.

JANDIAL, R.; SINGEC, I.; DUENAS, V. J.; HO, A. L.; LEVY, M. L.; SNYDER, E. Y. Central nervous system repair and stem cells. **International Congress Series**, v. 1302, p. 154-163, 2007.

JIAO, J.; CHEN, D. F. Induction of neurogenesis in nonconvetional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. **Stem Cells,** v. 26, p. 1221-1230, 2008.

JOHANSSON, C. B.; MOMMA, S.; CLARKE, D. L.; RISLING, M.; LENDAHL, U.; FRISEN, J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell**, v. 96, p. 25-34, 1999.

KOMITOVA, M.; ERIKSSON, P. S. Sox-2 is expressed bu neural progenitors ad astroglia in the adult rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 369, p. 24-27, 2004.

KORNACK, D. R.; RAKIC, P. The Generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. **PNAS**, v. 98, n. 8, p. 4752-4757, 2001.

KOSAKA, K.; KOSAKA, T. Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. **Anatomical Science International,** v. 80, p. 80-90, 2005.

KRIEGSTEIN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 149-184, 2009.

KULESHOVA, L. L.; TAN, F. C. K.; MAGALHÃES, R.; GOUK, S. S.; LEE, K. H.; DAWE, G. S. Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification. **Cell Transplantation**, v. 18, p. 135-144, 2009.

LACBAWAN, F. L.; MUENKE, M. central nervous system embryogenesis and its failures. **Pediatric and Developmental Pathology,** v. 5, p. 425-447, 2002.

LI, H.; LIU, H.; CORRALES, C. E.; RISNER, J. R.; FORRESTER, J.; HOLT, J. R.; HELLER, S.; EDGE, A. S. B. Differentiation of neurons from neural precursors generated in floating spheres from embryonic stem cells. **BMC Neuroscience**, v. 10, n.122, p.1471-2202, 2009.

LIU, S.Y.; ZHANG, Z.Y.; SONG, Y. C.; QIU, K. J.; ZHANG, K. C.; AN, N.; ZHOU, Z.; CAI, W. Q.; YANG, H. SVZa neural stem cells differentiate into distinct lineages in response to BMP4. **Experimental Neurology**, v. 190, p. 109-121, 2004.

MA, X-H.; SHI, Y.; HOU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, L.; FAN, W-X.; GE D.; LIU, T-Q.; CUI, Z-F. Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. **Cryobiology**, v. 60, p. 184-191, 2010.

MANGANAS, L.N.; MALETIC-SAVATIC, M. Stem cell therapy for central nervous system demyelinating disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports,** v. 5, p. 225-231, 2005.

MANSERGH, F. C.; WRIDE, M. A.; RANCOURT, D. E. Neurons, stem cells and potential therapies. In. SELL, S. **Stem Cells Handbook**, New Jersey: Human Press, 2004. p. 526.

MARTIN, I.; ANDRES, A. R.; VÉDRINE, S.; TABAGH, R.; MICHELLE, C.; JOURDAN, M-L.; HEUZE-VOURC'H, N.; CORCIA, P.; DUITTOZ, A.; VOURC'H, P. Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. **Brain Research**, v. 1284, p. 22-30, 2009.

MARTINO, G.; PLUCHINO, S. The therapeutic potential of neural stem cells. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 7, n. 5, p. 395-406, 2006.

McLAREN, F. H.; SVENDSEN, C. N.; VAN DER MEIDE, P.; JOLY, E. Analysis of neural stem cells by flow cytometry: Cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 112, p. 35-46, 2001.

MILOSEVIC, J.; STORCH, A.; SCHWARZ, J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. **Stem Cells,** v. 23, p. 681-688, 2005.

NIEUWENHUYS, R.; TEN DONKELAAR, H. J.; NICHOLSON, C. **The Central Nervous System of Vertebrates**. v. 1, Berlin: Springer, 1998. v. 1, 757 p.

PALMER, T. D.; SCHWARTZ, P. H.; TAUPIN, P.; KASPAR, B.; STEIN, S. A.; GAGE, F. H. Cell culture: Progenitor cells from human brain after death. **Nature**, v. 411, p. 42-43, 2001.

PANICKER, M. M.; RAO, M. Stem cell and neurogenesis. In: MARSHAK, D. R.; GARDNER, R. L.; GOTTLIEB, D. **Stem Cell Biology**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 399-438.

PASTRANA, E.; SILVA-VARGAS, V.; DOETSCH. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 8, p. 486-498, 2011.

PIPER, D. R.; MUJTABA, T.; KEYONG, H.; ROY, N. S.; GOLDMAN, S. A.; RAO, M. S.; LUCERO, M. T. Identification and characterization of neuronal precursors and their progeny from human fetal tissue. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, p. 356-368, 2001.

POTTER, G. E.; BRUECK. W. L. Nervous system of guinea pig (cavia porcellus). **Bios**, v. 19, n. 4, p. 185-196, 1958.

REN, Y-J.; ZHANG, H.; HUANG, H.; WANG, X-M.; ZHOU, Z-Y.; CUI, F-Z.; AN, Y-H. In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups. **Biomaterials,** v. 30, p. 1036-1044, 2009.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. **Science**, v. 255, p. 1707-1710, 1992.

SCHWARTZ, P. H.; BRYANT, P. J.; FUJA, T. J.; SU, H.; O'DOWD, D. K.; KLASSEN, H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. **Journal of Nueroscience Research**, v. 74, p. 838-851, 2003.

SEABERG, R. M.; van der KOOY, D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contaisn neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1784-1793, 2002.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **PNAS**, v. 95, p. 13726-13731, 1998.

SKALNIKOVA, H.; VODICKA, P.; PELECH, S.; MOTLIK, J.; GADHER, S. J.; KOVAROVA, H. Protein signaling pathways in differentiation of neural stem cells. **Proteomics,** v. 8, p. 4547-4559, 2008.

SMITH, R.; BAGGA, V.; FRICKER-GATES, R. A. Embryonic neural progenitor cells: the effects of species, region, and culture conditions on long-term proliferation and neuronal differentiation. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 12, p. 713-725, 2003.

SUSLOV, O. N.; KUKEKOV, V. G.; IGNATOVA, T. N.; STEINDLER, D. A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. **PNAS**, v. 99, n. 22, p. 14506-14511, 2002.

SVENDSEN, C. N.; SKEPPER, J.; ROSSER, A. E.; TER BORG, M. G.; TYRES, P.; RYKEN, T. Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. **Brain Res Dev Brain Res,** v. 99, n. 2, p. 253-258, 1997.

TAKAHASHI, A.; CAMACHO, P.; LECHLEITER, J. D.; HERMAN, B. Measurement of intracellular calcium. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1089-1125, 1999.

TAKAMORI, Y.; MORI, T.; WAKABAYASHI, T.; NAGASAKA, Y.; MATSUZAKI, T.; YAMADA, H. Nestin-positive microglia in adult rat cerebral córtex. **Brain Research**, v. 1270, p. 10-18, 2009.

TAUPIN, P. BrdU immunohistochemestry for studying adult neurogenesis: Paradigms, piftalls, limitations, and validation. **Brain Research Reviews**, v. 53, p. 198-214, 2007.

TAUPIN, P.; GAGE, F.H. Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells of Central Nervous System in Mammals. **Journal of Neuroscience Research,** v. 69, p. 745-749, 2002.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, AM. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

THORED, P.; ARVIDSSON, A.; CACCI, E.; AHLENIUS, H.; KALLUR, T.; DARSALIA, V.; EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Persistent production of neuros from adult brain stem cells during recovery after stroke. **Stem Cells,** v. 24, n. 3, p. 739-747, 2006.

UCHIDA, N.; BUCK, D. W.; HE, D.; REITSMA, M. J.; MASEK, M.; PHAN, T. V.; TSUKAMOTO, A. S.; AGE, F. H.; WEISSMAN, I. L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. **PNAS**, v. 97, n. 26, p. 14720-14725, 2000.

VESCOVI, A. L.; PARATI, E. A.; GRITTI, A.; POULIN, P.; FERRARIO, M.; WANKE, E.; FRÖLICHSTHAL-SCHOELLER, P.; COVA, L.; ARCELLANA-PANLILIO, M.; COLOMBO, A.; GALLI, R. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human cns and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. **Experimental Neurology**, v. 156, n. 1, p. 71-83, 1999.

YOKOYAMA, A.; SAKAMOTO, A.; KAMEDA, K.; IMAI, Y.; TANAKA, J. NG2 proteoglycan-expressing microglia as multipotent neural progenitors in normal and pathologic brains. **Glia**, v. 53, n. 7, p. 754-768, 2006.

YOKOYAMA, A.; YANG, L.; ITOH, S.; MORI, K.; TANAKA, J. Mircroglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocyes. **Glia**, v. 45, n. 1, p. 96-104, 2004.

ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L.; SQUIRE, L. R. **Fundamental Neuroscience**, California: Academic Press, 1999. 1600 p.