
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**DETERMINAÇÃO DA ATUAÇÃO DOS RTKs NA NEUROINDUÇÃO E
NEUROGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DE TECIDO DE
CORDÃO UMBILICAL HUMANO**

RACHEL DIAS MOLINA

**PORTO ALEGRE
2015**

RACHEL DIAS MOLINA

**DETERMINAÇÃO DA ATUAÇÃO DOS RTKs NA NEUROINDUÇÃO E
NEUROGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DE TECIDO DE CORDÃO
UMBILICAL HUMANO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul– PUCRS.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

**Porto Alegre
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M722 Molina, Rachel Dias

Determinação da atuação dos RTKs na neuroindução e neurogênese de células-tronco adultas de tecido de cordão umbilical humano / Rachel Dias Molina – 2015.

104 f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, Porto Alegre, RS, 2015.

Linha de Pesquisa: Aspectos Biológicos do Envelhecimento.

Orientação: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado.

1. Células-tronco. 2. Cordão Umbilical Humano. 3. Tecido de Cordão Umbilical. 4. Neurodiferenciação. 5. Neurogênese. 6. Receptores Tirosina Quinase. I. Título.

CDU 618.38-018.5:57.086.83(043.3)

Ficha elaborada pela bibliotecária Estela Moro Gallon – CRB 10/1350

RESUMO

Introdução: As alterações celulares e fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento tem efeitos pronunciados nas doenças neurodegenerativas. Os fatores que produzem neurodegeneração o fazem através de diferentes processos, que culminam em uma via comum de cascata de sinalização. As células-tronco se comunicam por mecanismos de sinalização celular, que faz parte de um complexo sistema que governa e coordena as atividades e funções celulares. Compreender os mecanismos e as formas de comunicação intercelular e a sua relação na ativação das cascatas de sinalização, desde o receptor de superfície até o núcleo celular, durante a neurogênese, permitirá responder algumas questões pertinentes aos mecanismos de ação das células-tronco no reparo do sistema nervoso central. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo determinar quais os RTKs que estão sendo ativados durante a neurogênese de células-tronco adultas de tecido de cordão umbilical humano. **Metodologia:** Células-tronco adultas foram obtidas de tecido de cordão umbilical humano (n=3) e submetidas a neurodiferenciação em meios indutores específicos. O kit Human Phospho-RTK Array foi utilizado para avaliação da fosforilação dos RTKs e a expressão determinada por PCR em tempo real. **Resultados:** As células-tronco mesenquimais obtidas do tecido do cordão umbilical foram confirmadas através da indução de diferenciação em células adipócitas e osteócitas. A neurodiferenciação foi confirmada através da expressão de genes que são expressos nas células durante a neurogênese e em células neurais, como também a técnica de imunocitoquímica que mostrou marcações nucleares (DAPI) e prolongamentos celulares (Fluoropan). Durante os processos de neuroindução e neurodiferenciação os níveis de fosforilação dos RTKs foram variáveis, sem um padrão definido. O receptor Ryk não apresentou alterações significativas nos seus níveis de fosforilação entre as três amostras estudadas e nas diferentes etapas de diferenciação, isto é, células-tronco mesenquimais, células neuroinduzidas e células neurodiferenciadas. **Conclusões:** Os receptores tirosina quinases estão sendo ativamente fosforilados durante a neuroindução e neurogênese, com padrões variáveis entre as diferentes etapas e entre diferentes amostras, refletindo a variabilidade das células-tronco adultas humanas.

Palavras-chave: Células-tronco; tecido de cordão umbilical humano; neurodiferenciação; neurogênese, receptores tirosina quinase.

ABSTRACT

Introduction: The cellular and physiological changes that accompany the aging process has pronounced effects in neurodegenerative diseases. Factors that produce neurodegeneration do so through different processes that culminate in a common signaling pathway cascade. Stem cells communicate via cellular signaling mechanisms, which is part of a complex system which governs and coordinates activities and cell functions. Understanding the mechanisms and forms of intercellular communication and their relationship in the activation of signaling cascades from the surface receptor to the cell nucleus during neurogenesis, will answer some pertinent questions to the mechanisms of action of stem cells in repair central nervous system. **Objective:** This study aimed to determine which RTKs being activated during neurogenesis of adult stem cells from human umbilical cord tissue. **Methods:** Adult stem cells were obtained from human umbilical cord tissue (n = 3) and subjected to specific inducers in neurodifferentiation means. The kit Human Phospho-RTK Array was used for evaluating the phosphorylation of the RTK and the expression determined by real-time PCR. **Results:** The mesenchymal stem cells obtained from umbilical cord tissue were confirmed by differentiation induction in adipocytes and osteocytes cells. The neurodifferentiation was confirmed by expression of genes that are expressed during neurogenesis in cells and neural cells, as well as immunocytochemistry technique markings which showed nuclear (DAPI) and cell processes (Fluoropan). During the neuroinduction processes and neurodifferentiation the phosphorylation levels of RTKs were variable, with no clear pattern. The Ryk receptor showed no significant changes in their levels of phosphorylation of the three samples studied and the different stages of differentiation, ie, mesenchymal, neuroinductions and neurodifferentiates cells. **Conclusions:** The tyrosine kinases are actively being phosphorylated during neuroinduction and neurogenesis, with varying standards between the different stages and between different samples, reflecting the variability of human adult stem cells.

Keywords: Stem cells; Human umbilical cord tissue; neurodifferentiation; neurogenesis, tyrosine kinase receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial de diferenciação das células-tronco.	18
Figura 2. Diagrama esquemático mostrando a potencialidade das células desde a fecundação até a vida adulta nos diferentes tecidos.	20
Figura 3. Estruturas e tipos celulares presentes no cordão umbilical humano.	23
Figura 4. Organização dos domínios dos RTKs.	27
Figura 5. Rede de sinalização neuronal.	29
Figura 6. Vias de sinalização do receptor de tirosina quinase (RTK) envolvidas na sobrevivência neuronal e crescimento dos neuritos e sua inibição por meio de inibidores de retroalimentação negativos.	30
Figura 7. Reguladores transcricionais influenciados pela sinalização dos receptores de tirosina quinases (RTK).	31
Figura 8. Marcadores dos diferentes estágios da neurodiferenciação da célula.	33
Figura 9. Placa utilizada no PCR em Tempo Real.	49
Figura 10. Membrana de nitrocelulose para determinação da fosforilação dos RTKs.	50
Figura 11. Imagens da cultura de tecido de cordão umbilical humano.	53
Figura 12. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais submetidas a diferenciação osteogênica.	54
Figura 13. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais submetidas a diferenciação adipogênica.	55
Figura 14. Fotomicrografia da imunofluorescência das células-tronco mesenquimais neurodiferenciadas da amostra 1.	56
Figura 15. Fotomicrografia da imunofluorescência de células-tronco mesenquimais neurodiferenciadas da amostra 2.	56
Figura 16. Fotomicrografia da imunofluorescência de células-tronco mesenquimais neurodiferenciadas da amostra 3.	57

Figura 17. Gráfico de coluna representando a expressão do gene NeuroD6 nas diferentes etapas estudadas	58
Figura 18. Gráfico de coluna representando a expressão do gene GFAP nas diferentes etapas estudadas.	58
Figura 19. Gráfico de coluna representando a expressão do gene SOX2 nos diferentes tempos estudados.	59
Figura 20. Gráfico de coluna representando a expressão dos genes ASCL1 e NFL nas diferentes etapas estudadas.	60
Figura 21. Gráfico de coluna representando a expressão dos genes STX1A e MAP1 nas diferentes etapas estudadas.	60
Figura 22. Fotografia da marcação da fosforilação em uma membrana.	62
Figura 23. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas da amostra 1 nas diferentes etapas do estudo.....	63
Figura 24. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas da amostra 2 nas diferentes etapas do estudo.....	63
Figura 25. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas da amostra 3 nas diferentes etapas do estudo.....	64
Figura 26. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas na etapa mesenquimal nas amostras 1 e 3...	65
Figura 27. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas na etapa de neuroindução nas amostras estudadas.	66
Figura 28. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas na etapa de neurodiferenciação nas amostras estudadas.	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR em tempo real e gene alvo. 48
- Tabela 2.** Resumo da expressão relativa* dos genes marcadores de neurogênese nas culturas neuroinduzidas e neurodiferenciadas..... 61
- Tabela 3.** Mediana e intervalo interquartil dos dados do ΔC_t para a expressão dos marcadores de neurogênese. 61
- Tabela 4.** Receptores com níveis de fosforilação distintos entre as amostras com os respectivos níveis de significância em cada etapa analisada. 67
-

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: <i>Brain derived neurotropic factor</i>)
Bhlh	(do inglês: <i>Basic helix-loop-helix</i>)
DMEM	Meiode Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>)
DPBS	Solução de fosfato tamponado com salina de Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
EDTA	(do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês: <i>Epidermal growth factor</i>)
ES	Células-tronco embrionárias (do inglês: <i>Embryonic stem cells</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (do inglês: <i>Fibroblast growth factor</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCSF	(do inglês: <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>)
GFAP	Proteína ácida das fibras gliais (do inglês: <i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
HSL	Hospital São Lucas
IPS	Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês: <i>Induced pluripotent stem cell</i>)
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês: <i>Intenational Society for Cellular Therapy</i>)
MSCs	Células-tronco mesenquimal (do inglês: <i>mesenchymal stem cells</i>)
NSCs	Células tronco precursoras neurais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformoldeído
RTK's	Receptores Tirosina Quinases (do inglês: <i>Receptor Tyrosine Kinases</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 ENVELHECIMENTO: ASPECTOS DEMOGRÁFICO.....	14
2.2 ENVELHECIMENTO CELULAR.....	15
2.3 ENVELHECIMENTO E O SISTEMA NERVOSO	15
2.4 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	17
2.5 CÉLULAS-TRONCO: CARACTERÍSTICAS, POTENCIALIDADE, PLASTICIDADE E ORIGEM	17
2.5.1 Características.....	17
2.5.2 Potencialidade	19
2.5.3 Origem.....	20
2.6 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS.....	21
2.6.1 Células-tronco hematopoiéticas.....	21
2.6.2 Células-tronco mesenquimais.....	21
2.7 MEDICINA REGENERATIVA.....	22
2.8 CORDÃO UMBILICAL HUMANO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS.....	23
2.9 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO IN VITRO	24
2.10 NEUROGÊNESE E SEUS REGULADORES.....	25
2.11 RECEPTORES TIROSINA QUINASES (RTKs).....	26
2.12 MARCADORES DA NEURODIFERENCIAÇÃO	32
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39

5 METODOLOGIA	41
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	41
5.2 AMOSTRAS	41
5.3 CÁLCULO DO NÚMERO DE AMOSTRAS	42
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	42
5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCOMESESENQUIMAS DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	43
5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS CONFORME A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR	44
5.7 NEURODIFERENCIAÇÃO.....	45
5.8 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS PROGENITORAS E NEURAS POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	45
5.9 EXTRAÇÃO DO RNA.....	46
5.10 TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA OBTENÇÃO DO cDNA.....	47
5.11 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA NEURODIFERENCIAÇÃO E NEUROGÊNESE.....	48
5.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES TIROSINA QUINASES (RTKs)	50
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5.13.1 Análise estatística dos dados de fosforilação dos Rtk's	51
5.13.2 Análise estatística dos dados da PCR em tempo real	51
6 RESULTADOS.....	53
6.1 OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS A PARTIR DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO	53
6.2 DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA DE CÉLULAS DO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	54
6.3 AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO POR MEIO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA	55
6.4 PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA NEURODIFERENCIAÇÃO E NEUROGÊNESE.....	57

6.5 ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES RTKs NAS DIFERENTES AMOSTRAS E ETAPAS ANALISADAS.....	62
7 DISCUSSÃO	69
8 CONCLUSÕES	79
9 PERSPECTIVAS.....	81
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	94
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA.....	94
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	95
ANEXO 3 - TABELA COM VALORES DE “p”	97



Introdução



1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento tem efeitos pronunciados nas doenças neurodegenerativas através das alterações celulares e fisiológicas (SHAH; MOORADIAN, 1997). Cerca de 400 milhões de pessoas no mundo sofrem de doenças do sistema nervoso central as quais podem estar relacionadas com o envelhecimento tais como demência pré-senil, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (PENG et al., 2013). Os fatores que produzem neurodegeneração o fazem através de diferentes processos, que culminam em uma via comum de cascata de sinalização. Vários estudos têm avaliado o potencial das células-tronco mesenquimais (MSCs) para a terapia celular sendo que elas podem ser obtidas a partir de vários tipos de tecidos. Considerando que o cordão umbilical pode ser coletado de uma forma não-invasiva, e que este tecido é descartado após o parto do recém-nascido, ele poderia ser uma promissora fonte de células, não só para a terapia celular, mas também para estudar a ontogenia das doenças humanas. Os receptores tirosina-quinases (RTKs) são moléculas de superfície que possuem uma porção extracelular composta por vários domínios, envolvidos na interação com a ligação do polipeptídeo de uma porção transmembranar e uma região citoplasmática que contém um domínio tirosina-quinase rodeado por sequências reguladoras (HUBBARD, 2002). Através dos RTKs, vários estímulos são emitidos para que ocorra o desenvolvimento e as funções do sistema nervoso, além de manter os níveis de proteína necessária para a sobrevivência, o crescimento axonal e a coordenação de alterações na transcrição do gene, síntese e degradação de proteínas (HAUSSOT et al., 2009). Para contribuir para o conhecimento das propriedades do tecido de cordão umbilical, foi investigado o seu potencial de neurogênese, bem como algumas características moleculares ativadas durante este processo, tais como a fosforilação do receptor tirosina quinase e a expressão de genes marcadores moleculares.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO: ASPECTOS DEMOGRÁFICO

A população brasileira vem envelhecendo de forma rápida desde o início da década de 60, quando a queda das taxas de fecundidade começou a alterar a estrutura etária, estreitando progressivamente a base da pirâmide populacional (ARAÚJO et al., 2015).

Atualmente, no Brasil, os idosos representam 13% da população geral. O censo de 2012 informou que, dos 193.976.530 milhões de brasileiros, 26 milhões têm 60 anos ou mais, sendo que estimativas para os próximos 20 anos indicam que a população idosa poderá exceder 30 milhões de brasileiros ao final deste período, chegando a representar quase 16% da população total (SAÚDE, 2012).

O Rio Grande do Sul (RS) foi um dos primeiros Estados a experimentar o aumento da longevidade e envelhecimento da sua população. Somente nos últimos dez anos, o índice de pessoas acima de 60 anos no RS cresceu 47%, enquanto o da população total apenas 15%. O contingente de idosos está vivendo em média 75,5 anos, totalizando 1,4 milhões de pessoas, representando 13,65% da população total, segundo CENSO do IBGE 2010. Na capital do estado do RS, Porto Alegre tem uma população total de 1.416.714 milhões sendo que 213.003 mil são idosos conforme censo de 2012 realizado pelo IBGE (SAÚDE, 2012).

Existe uma preocupação voltada para o envelhecimento saudável em detrimento do envelhecimento associado a estados patológicos. O envelhecimento é um processo irreversível acompanhado pelo declínio das funções fisiológicas da maior parte dos órgãos, como a redução do fluxo renal, do débito cardíaco, da tolerância à glicose, da capacidade vital dos pulmões, da massa corpórea e da imunidade celular (VITORELI; PESSINI; SILVA, 2005). Portanto, é um processo crônico-degenerativo tempo-dependente de natureza

estocástica e com alguns determinantes genéticos por meio do qual os indivíduos aos poucos vão perdendo a capacidade de responder rápido e adequadamente as demandas ambientais (ARKING, 2006).

2.2 ENVELHECIMENTO CELULAR

O processo de envelhecimento é extremamente complexo e multifatorial e, pela sua natureza multidisciplinar, o estudo das bases moleculares desse fenômeno tem gerado um grande número de teorias e uma vasta literatura. Entre elas, destacam-se as teorias “estocásticas”, baseadas no acúmulo aleatório de moléculas com alterações estruturais e/ou funcionais, e as teorias sistêmicas, relacionadas com mecanismos programados no genoma de cada organismo (ARKING, 2006).

Dentre as teorias estocásticas, podemos incluir a dos danos oxidativos/radicais livres, proteínas alteradas, mutações somáticas, dano e reparo do DNA, desdiferenciação, acúmulo de metabólitos, alterações pós-tradução e erro catastrófico na síntese de proteínas. Com relação às teorias sistêmicas podemos mencionar as teorias metabólicas, teorias genéticas, teoria neuroendócrina e teorias imunológicas (ARKING, 2006).

2.3 ENVELHECIMENTO E O SISTEMA NERVOSO

Alterações celulares e fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento parecem ter efeitos pronunciados sobre doenças neurodegenerativas (SHAH; MOORADIAN, 1997). O envelhecimento fisiológico compreende uma série de alterações nas funções orgânicas e mentais devidas exclusivamente aos efeitos da idade avançada sobre o organismo, fazendo com que ele perca a capacidade de manter o equilíbrio homeostático, levando ao declínio gradual das funções fisiológicas (STRAUB et al., 2001).

Durante o processo de envelhecimento ocorrem diversas alterações macro e microscópicas no encéfalo que incluem a dimensão do órgão, alterações dos

giros e sulcos, no volume dos ventrículos, no tamanho e número dos neurônios. A extensão da ramificação dendrítica, o número de sinapses, o acúmulo de pigmento de lipofuscina nos neurônios e células gliais, e o aparecimento de modificações microscópicas características, isto é, as placas senis, os envelamentos ou emaranhados neurofibrilares, a degeneração grânulo-vacuolar, os corpos de Hirano e a angiopatia amilóide cerebral são aumentadas no cérebro “envelhecido” (SCAHILL et al., 2003).

O tecido neural é composto basicamente por dois tipos celulares, que são os neurônios e as células gliais ou da neuroglia, sendo o neurônio a unidade funcional fundamental, com a função básica de receber, processar e enviar informações (DEMIR et al., 2009).

Entre as alterações microscópicas, ocorre a perda de um grande número de neurônios por dia, principalmente no córtex cerebral, podendo levar a deterioração mental significativa. As fibras neurais perdem mielina, reduzindo, assim, a velocidade de condução do estímulo, além do declínio da capacidade de gerar neurônios na zona subventricular. Há uma diminuição dendrítica, da massa e do número de células nervosas causando destruição das vias associativas (SCAHILL et al., 2003)(BIZON; GALLAGHER, 2005).

O envelhecimento pode ser acompanhado de alterações mentais superponíveis às de uma demência incipiente, levando aos problemas de diagnóstico diferencial, como por exemplo, a doença de Alzheimer (DAMASCENO, 1999).

Existe uma proposição de que os diversos fatores que produzem neurodegeneração o fazem através de diferentes processos, que culminam em uma via comum de cascata de sinalização que resulta na morte celular. Essas perdas celulares no sistema nervoso central (SNC) podem se manifestar como disfunções comportamentais. Portanto, o estudo dos mecanismos responsáveis pela neurodegeneração e a identificação precoce de alterações moleculares, tem sido cada vez mais importante para a compreensão das bases biológicas relacionadas com as alterações comportamentais normalmente associadas com o

envelhecimento e/ou com as diversas neuropatologias (TROULINAKI; TAVERNARAKIS, 2005).

2.4 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Cerca de 400 milhões de pessoas no mundo sofrem de doenças do SNC que podem envolver o sistema neurovascular, as quais podem estar relacionadas com o envelhecimento tais como demência pré-senil, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença cerebral isquêmica. As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pelo excesso de morte neuronal em determinadas regiões do cérebro, resultando em atrofia. Esta atrofia focal regional e específica é uma característica macroscópica e da neuroimagem observada nas doenças neurodegenerativas (PENG et al., 2013).

O aparecimento das doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, tal como a doença de Alzheimer se tornará ainda mais frequente com o aumento da média de vida da população (SMITH, 1999). É comum a noção equivocada de que todas as pessoas de idade avançada tornam-se senis, e muitas vezes o estado de confusão é atribuído ao “envelhecimento” quando a causa pode ser alguma outra doença. Embora ocorram alterações no sistema neural, não se pode assumir que a senilidade é uma consequência normal do processo de envelhecimento (CHAIMOWICZ, 1997).

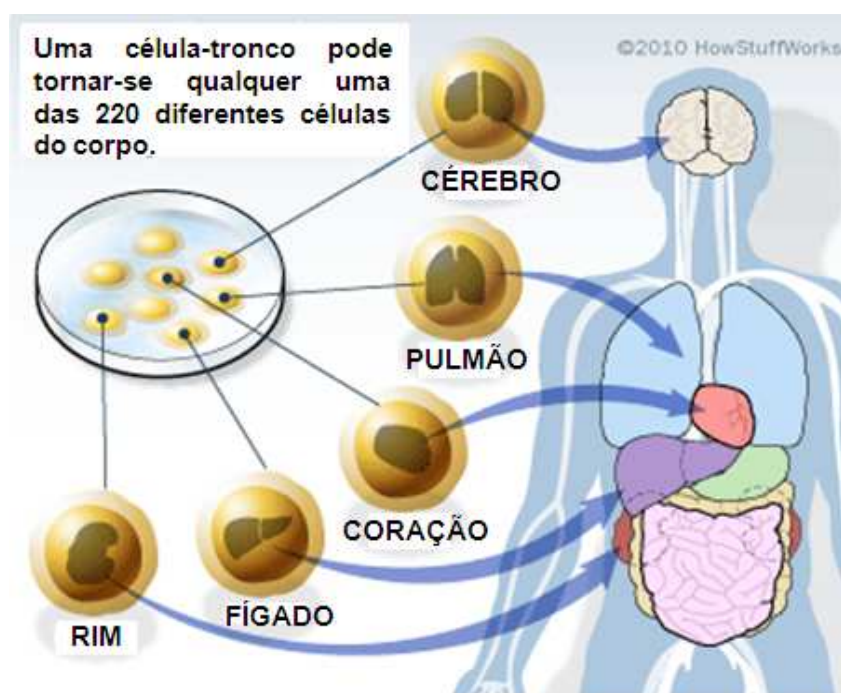
2.5 CÉLULAS-TRONCO: CARACTERÍSTICAS, POTENCIALIDADE, PLASTICIDADE E ORIGEM

2.5.1 Características

As células-tronco, por definição, são aquelas capazes de auto-renovação ilimitada ou prolongada mantendo-se indiferenciadas, e de diferenciar em células especializadas de um determinado tecido (Figura 1) (MORRISON; SHAH; ANDERSON, 1997). As células-tronco são células não especializadas, isto é, não

tem comprometimento morfológico e funcional com nenhum tipo celular (HUI et al., 2011) e são essenciais, não somente para estruturar a formação dos órgãos desde a fase embrionária até o indivíduo adulto, mas também pelo seu papel vital na regeneração e reparo dos tecidos (BLAU; BRAZELTON; WEIMANN, 2001).

Figura 1. Potencial de diferenciação das células-tronco.



Fonte: Adaptado de HowStuffWorks 2010.

A auto-renovação é a maneira pelo qual as células-tronco produzem cópias idênticas de si mesmas, por meio de sucessivas mitoses, o que indica que o organismo é capaz de manter um “depósito” permanente deste tipo celular (ROCHA et al., 2012).

A regeneração tecidual ocorre quando as células-tronco, residentes nos diferentes tecidos do organismo, recebem sinais específicos para se dividirem e substituir as células perdidas no caso de lesão tecidual (KODE et al., 2009). Eles desempenham um papel fundamental na formação dos tecidos, regeneração e homeostasia, fornecendo novos elementos para aumentar a massa tecidual

durante o desenvolvimento/crescimento e substituindo as células perdidas no processo de envelhecimento e nas lesões (PISCAGLIA, 2008).

Elas são divididas em dois tipos conforme a sua origem, potencialidade e sua capacidade de diferenciação: células-tronco embrionárias (ES) e células-tronco adultas (FERNÁNDEZ VALLONE et al., 2013). Com relação à plasticidade, ou seja, o seu potencial de diferenciação em tecidos variados, elas podem ser classificadas em três diferentes tipos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Essa grande plasticidade destaca a importância das mesmas em estudos que buscam a cura de doenças.

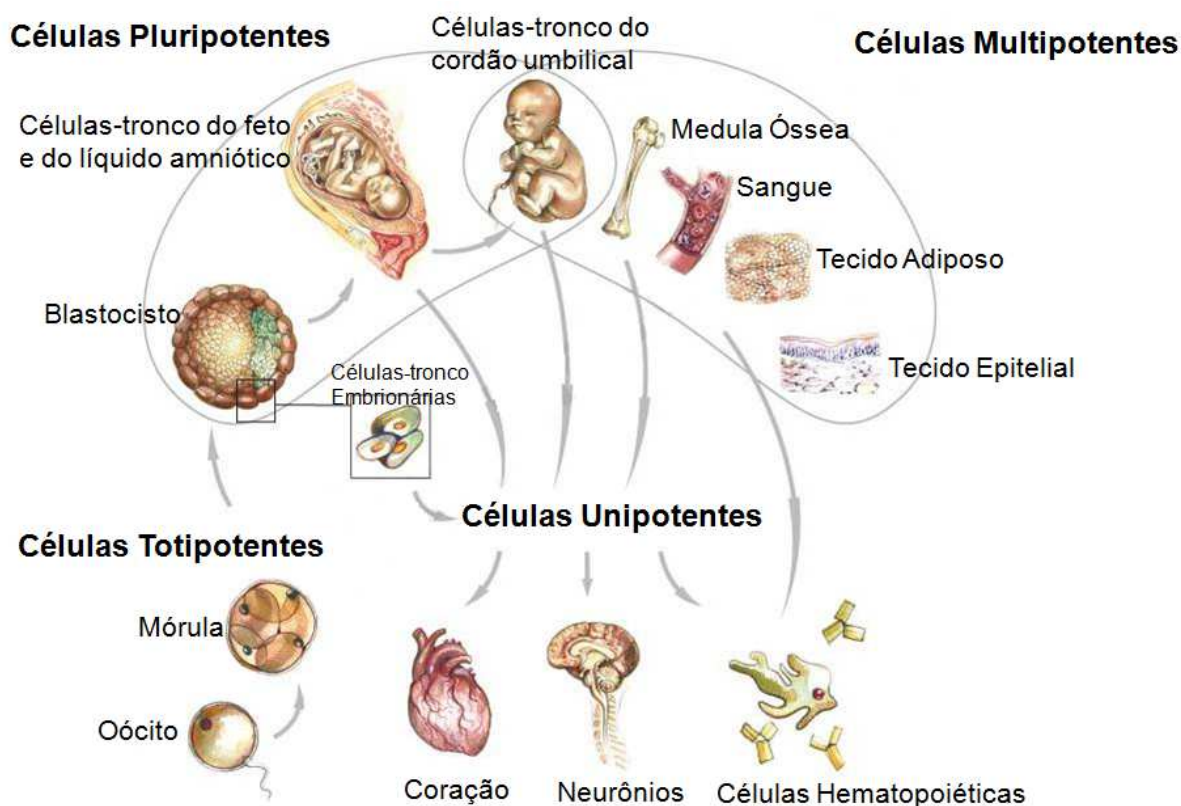
2.5.2 Potencialidade

As células-tronco totipotentes podem dar origem a qualquer tipo celular do corpo inclusive, um indivíduo completo. Correspondem às células do embrião desde o zigoto até a fase de blastocistos, isto é, entre o quinto e sétimo dia após a fecundação. Eles possuem o potencial para originar as células dos folhetos extra-embrionários, que formarão a placenta e os demais anexos responsáveis pelo suporte ao embrião (Figura 2) (RIVEROS et al., 2007).

As células-tronco pluripotentes podem dar origem a qualquer tipo de célula fetal ou adulta, mas não podem desenvolver um organismo fetal ou adulto. Elas estão presentes nos diferentes tecidos do indivíduo adulto (RIVEROS et al., 2007).

As células-tronco multipotentes são células que têm a capacidade de gerar um número limitado de células especializadas, são mais diferenciadas e também estão presentes no indivíduo adulto. São elas as responsáveis pela constante renovação celular e regeneração dos tecidos durante toda a vida do indivíduo (RIVEROS et al., 2007).

Figura 2. Diagrama esquemático mostrando a potencialidade das células desde a fecundação até a vida adulta nos diferentes tecidos.



Fonte: Adaptado de <http://delatandoalaciencia2.blogspot.com.br/p/definicion-y-tipos.html>

2.5.3 Origem

Como mencionado anteriormente, as células-tronco são classificadas em dois grupos com relação a sua potencialidade: ES e células-tronco adultas.

As células-tronco adultas são aquelas mais indiferenciadas presentes no organismo, após a fase de blastocisto até o final da vida do indivíduo. Elas são uma excelente fonte alternativa de células para enfoque terapêutico devido à sua capacidade de gerar novos tipos celulares, tanto *in vivo* como *in vitro* (KOLF; CHO; TUAN, 2007). Elas podem ser obtidas de diversos tecidos como a medula óssea, pele, músculo, ossos, tecido adiposo, sangue e tecido de cordão umbilical, entre outros. As células-tronco adultas, além das poucas barreiras éticas, são

relativamente simples de serem obtidas e com riscos bastante reduzidos. Depois de isoladas, podem ser mantidas e expandidas, em meio e condições de cultivo adequado, podendo quando desejável, se diferenciar em tipos celulares específicos (WANG et al., 2004b).

2.6 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

2.6.1 Células-tronco hematopoiéticas

As primeiras células-tronco reportadas em humanos foram as hematopoiéticas, que são ditas como células multipotentes, e dão origem a vários tipos de células do sangue, tanto da linhagem mielóide quanto da linhagem linfóide (GALLACHER et al., 2000). Estas são as células responsáveis pela rejeição de medula óssea nos casos de leucemia. O primeiro transplante dessas células ocorreu em 1968 e desde então sendo usado no tratamento de doenças hematológicas.

2.6.2 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSCs) estão recebendo atenção especial nos últimos anos devido a sua importância na regeneração de diversos órgãos e tecidos. Elas estão presentes na medula óssea, no sangue e tecido de cordão umbilical, cérebro, músculos, entre outros. As MSCs receberam essa denominação, pois derivam do folheto embrionário intermediário, a mesoderme, responsável pela formação, entre outros, dos tecidos ósseos, cartilaginoso, adiposo e muscular (KODE et al., 2009).

As MSCs são células multipotentes não hematopoiéticas com propriedade de auto-renovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e não mesenquimais (KODE et al., 2009). Seu potencial para o reparo tecidual e outras aplicações experimentais é decorrente de sua capacidade de diferenciação em muitos tecidos, propriedades imunossupressoras e facilidade de obtenção e

cultivo. É uma importante fonte para a engenharia tecidual, tratamento de doenças degenerativas e estudo de novos fármacos (JANZ; ROMAO; BYDLOWSKI, 2009). As MSCs já foram induzidas *in vitro* a se diferenciarem em osso (AMABLE et al., 2013), cartilagem (NIRMAL; NAIR, 2013), gordura (HU et al., 2013), pele, fígado (PETERSEN et al., 1999), neurônios e glia (SANCHEZ-RAMOS et al., 2000), entre outros. Elas podem ser usadas para o transplante autólogo para o reparo de diversas lesões, contornando as complicações da rejeição e resposta imune, que podem ser associadas às terapias alogênicas (GIORDANO; GALDERISI; MARINO, 2007).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês: *International Society for Cellular Therapy*=ISCT), para se definir uma célula como sendo MSCs é necessário que ela possua a propriedade de aderência ao plástico sob condições padrões de cultura, a capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos e adipócitos e devem expressar os marcadores de superfície CD73, CD90e CD105; e não expressar os marcadores de superfície CD45, CD34, CD11b ou CD14, CD19 ouCD79 e HLA (DOMINICI et al., 2006).

2.7 MEDICINA REGENERATIVA

Os recentes avanços no conhecimento da biologia das células-tronco têm contribuído para a sua aplicação no tratamento de diversas alterações teciduais conhecida como Medicina Regenerativa (BAJADA et al., 2010).

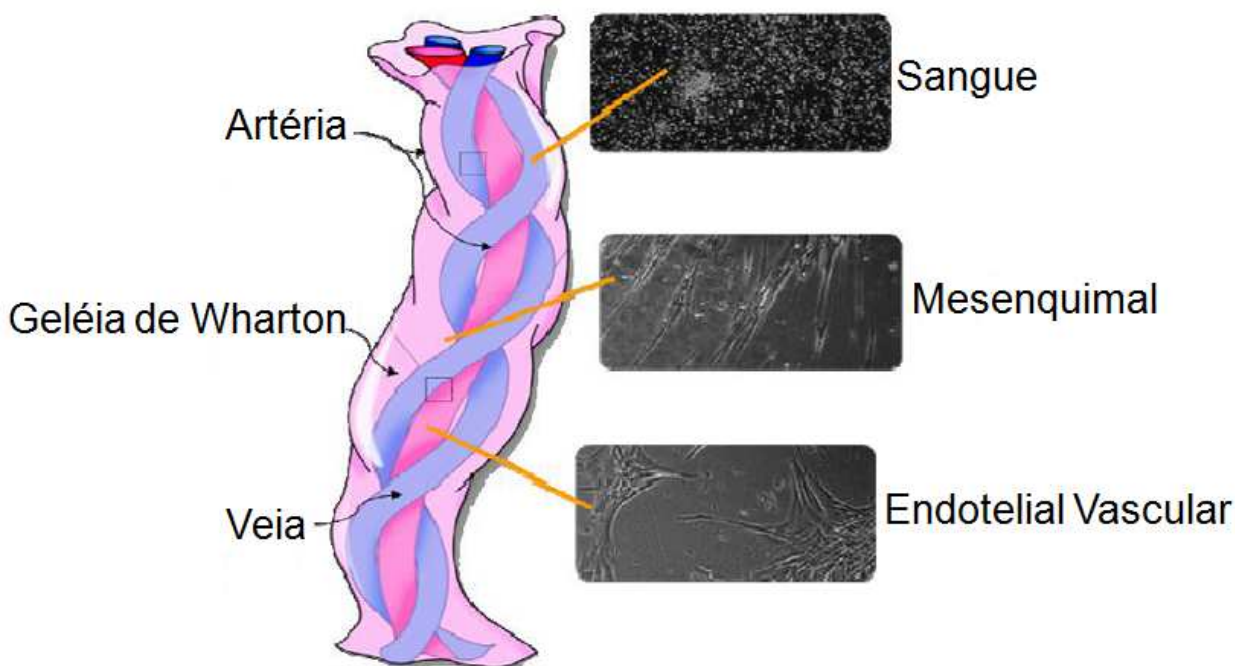
As MSCs tem se mostrado promissoras para o tratamento de várias doenças degenerativas por sua grande plasticidade que as tornam capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (BARRY; MURPHY, 2004).

A terapia com as células-tronco adultas, em sua maioria, tem sido realizada por meio de transplante autólogo ou alogênico na forma de infusão sistêmica ou no local da lesão (BARRY; MURPHY, 2004). Do ponto de vista terapêutico, os diferentes tipos e a origem das células-tronco apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas para a eficiência de sua aplicação na regeneração de tecidos ou para a engenharia de tecidos (TROUNSON, 2009).

2.8 CORDÃO UMBILICAL HUMANO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

O cordão umbilical humano tem origem a partir do pedúnculo embrionário, que se liga a vesícula vitelínica e amniótica, e permite a ligação entre o embrião e a placenta, sendo responsável, entre outras coisas, pela nutrição e respiração fetal. Possui, em média, 50 cm de comprimento e é formado por uma veia e duas artérias. A passagem de oxigênio com substâncias nutritivas da placenta para o feto ocorre através da veia e, a passagem de gás carbônico com substâncias não aproveitadas pelo feto ocorre através das artérias. As artérias e a veia são envoltas por um material gelatinoso de composição conjuntiva denominada de geléia de Wharton (Figura 3) (SPURWAY; LOGAN; PAK, 2012).

Figura 3. Estruturas e tipos celulares presentes no cordão umbilical humano.



Fonte: Adaptado de Grossi et al., 2009.

O cordão umbilical é uma excelente fonte alternativa de células-tronco, pelo fato de ser de fácil obtenção. Como este tecido é descartado após o parto, não oferece risco para a mãe e/ou para o bebê, e vem sendo cada vez mais utilizado, principalmente nos estudos experimentais *in vitro*. É possível obter um grande

número de células-tronco, as quais representam os principais tipos celulares: as células-tronco hematopoiéticas e as MSCs (FORRAZ; MCGUCKIN, 2011).

As MSCs estão presentes em vários órgãos fetais e circulam no sangue de fetos simultaneamente com as precursoras hematopoiéticas. Este fato fortalece a ideia de que durante a gestação e conseqüentemente nos recém-nascidos, o tecido de cordão umbilical é rico em MSCs, e a parede do cordão possui quantidades significativas de células progenitoras (CAMPAGNOLI et al., 2001). Muitos pesquisadores têm isolado e estabelecido MSCs de tecido de cordão umbilical com sucesso e, de acordo com (TONDREAU et al., 2005), discrepâncias nas quantidades de MSCs obtidas do tecido e/ou do sangue do cordão umbilical são decorrentes das diferentes metodologias empregadas para a obtenção e cultura destas células.

Estudos experimentais, ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos têm comprovado o potencial terapêutico dessas células. Na última década, um número considerável de estudos comprovou que o sangue de cordão umbilical possui células-tronco hematopoiéticas e uma pequena quantidade de MSCs (GOODWIN et al., 2001). Porém, no tecido do cordão umbilical, a geléia de Wharton constitui uma fonte importante de MSCs (SECCO et al., 2008). O tecido de cordão umbilical apresenta diversas vantagens sobre as outras fontes das células-tronco utilizadas terapeuticamente. Entre elas, o fato da coleta de células não ser um procedimento invasivo para a gestante e para o bebê e não acarretando em riscos para ambos.

2.9 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO IN VITRO

Até pouco tempo, acreditava-se que uma célula adulta diferenciada não pudesse alterar seu fenótipo, mas atualmente sabe-se que essa mudança é possível. Vários fatores como métodos de isolamento, material de superfície da cultura, meio de cultura, densidade de inóculo, tratamento com hormônio e fatores de crescimento, afetam a diferenciação das células.

O processo de diferenciação consiste no cultivo de células-tronco indiferenciadas, em meios de cultura pré-estabelecidos com fatores que irão influenciar essa diferenciação. As células-tronco então adquirem características celulares e morfológicas de uma célula diferenciada (KOSOVSKY, 2013). A linhagem mesodérmica que origina as células de tecido adiposo, ósseo, cartilaginoso e muscular já foi diferenciada em cultura. Estudos também já demonstraram a capacidade de diferenciação endodérmica das células-tronco em células pancreáticas (LUMELSKY et al., 2001) e pulmonares (VAN VRANKEN et al., 2005). Além disso, numerosos estudos têm demonstrado a capacidade de diferenciação ectodérmica neuronal das células-tronco. Células neuronais diferenciadas já foram obtidas de diversos tipos de células-tronco como as embrionárias, de medula óssea e pesquisas mais recentes realizaram a diferenciação neuronal, inclusive de células-tronco pluripotentes induzidas (IPS), isto é, células desdiferenciadas a partir de células diferenciadas, as quais poderão contribuir para os avanços de pesquisas no campo de terapia celular e gênese de muitas doenças humanas (ABRANCHES et al., 2009)(DIMOS et al., 2008).

Resumindo, atualmente é possível diferenciar ES e/ou células-tronco adultas de diferentes fontes, em todos os tipos celulares presentes no indivíduo, por meio do cultivo em meios definidos contendo os nutrientes e fatores específicos conforme o objetivo desejado.

2.10 NEUROGÊNESE E SEUS REGULADORES

O desenvolvimento do SNC é um processo que inclui a expressão de genes pró-neurais e o subsequente comprometimento e migração de seus precursores, bem como a formação de sinapses funcionais (DEMIR et al., 2009).

A descoberta da neurogênese pós-natal, quebrou um dogma presente até então na neurociência, de que os neurônios presentes no cérebro adulto dos mamíferos não teriam capacidade proliferativa. Anos depois, duas regiões “neurogênicas” foram descobertas em roedores adultos e primatas (SONG et al., 2012).

A neurogênese é um processo essencialmente regulado por genes pró-neurais, alguns já identificados, que respondem a uma gama de moléculas sinalizadoras. É consenso entre os pesquisadores, que a produção de distintas subpopulações neuronais, a partir das células-tronco neurais e suas progenitoras, requer reguladores temporais e que o desenvolvimento neuronal bem sucedido está diretamente relacionado com a precisão e o momento da entrada e saída destas células no ciclo celular (DEMIR et al., 2009). Atualmente, já está bem definido que o hipocampo é uma região cerebral onde ocorre neurogênese também na fase adulta (AMREIN; ISLER; LIPP, 2011).

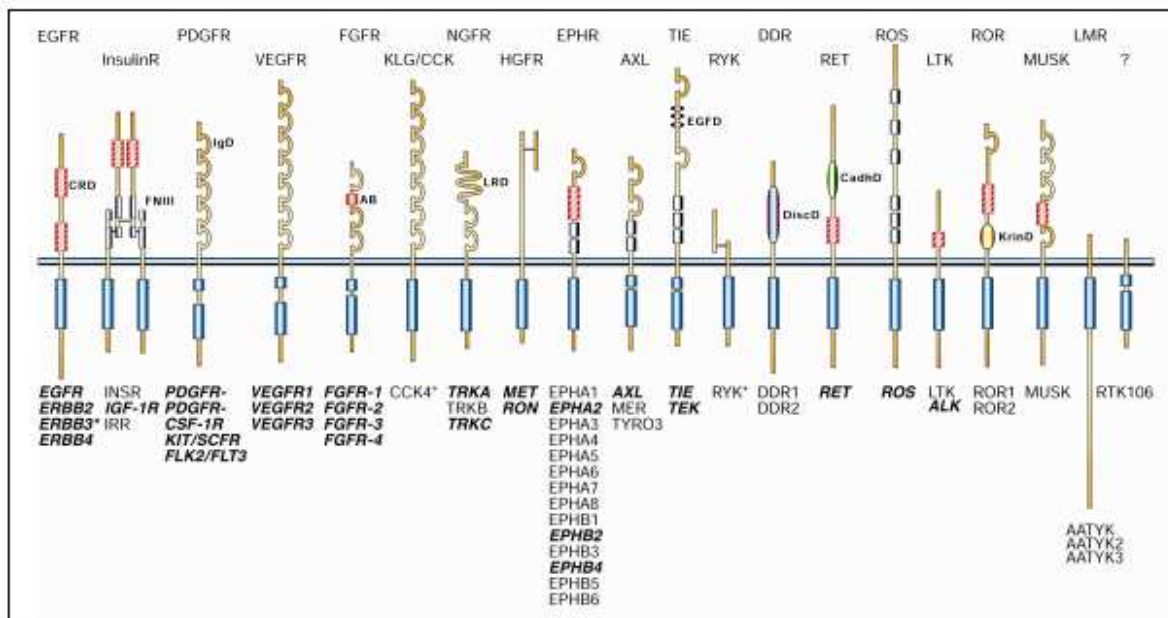
Muitos fatores de transcrição neuronais atuam em conjunto com proteínas reguladoras do ciclo celular e esses mecanismos, reguladores transcricionais e epigenéticos, são regulados por meio das vias de transdução de sinais (DEMIR et al., 2009).

2.11 RECEPTORES TIROSINA QUINASES (RTKs)

A identificação dos receptores que são ativados, das moléculas que se ligam a esses receptores e das vias de sinalização que possam atuar durante a diferenciação das células-tronco adultas poderá auxiliar na elucidação de, pelo menos, parte dos mecanismos envolvidos na diferenciação de células-tronco adultas em diversas linhagens celulares e os erros existentes no processamento da informação celular são responsáveis por diversas doenças (TUAN; BOLAND; TULI, 2003).

Os RTKs são moléculas de superfície que possuem uma porção extracelular composta por múltiplos domínios, envolvida na interação com ligantes polipeptídicos, uma porção transmembrânica e uma região citoplasmática que contém um domínio tirosina-quinase cercado por sequências regulatórias (Figura 4) (HUBBARD; TILL, 2000).

Figura 4. Organização dos domínios dos RTKs. O protótipo do receptor de cada família está indicado acima do esquema do receptor e os membros de cada família estão listados abaixo. A parte superior refere-se à porção extracelular e a inferior à porção citoplasmática dos receptores (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001).



A função e o desenvolvimento do sistema nervoso dependem de vários estímulos derivados de fatores tróficos, solúveis e de membrana, muitos dos quais atuam por meio dos RTKs. Apesar de haver mais de 50 RTKs no genoma humano, alguns desses receptores são comuns às vias de sinalização ativadas nas respostas celulares a múltiplos estímulos externos, principalmente as vias da MAPK, da quinase PI-3, da JAK-STAT e da PLC (NEWBERN et al., 2011).

Durante a ativação da cascata da MAPK por estímulos tróficos, as ERK1/2 e ERK5 são as principais quinases ativadas, as quais medeiam a proliferação, crescimento e/ou sobrevivência neural em contextos específicos. Essa função fundamental foi elegantemente demonstrada *in vivo* durante o desenvolvimento neuronal e de células gliais (NISHIMOTO; NISHIDA, 2006).

As neurotrofinas e outros fatores de crescimento são expressos em quantidades limitadas tanto no SNC quanto periférico, controlando o número de prolongamentos axonais necessários para uma densidade adequada de dendritos e conexões neurais. Essas proteínas se ligam aos receptores das quinases

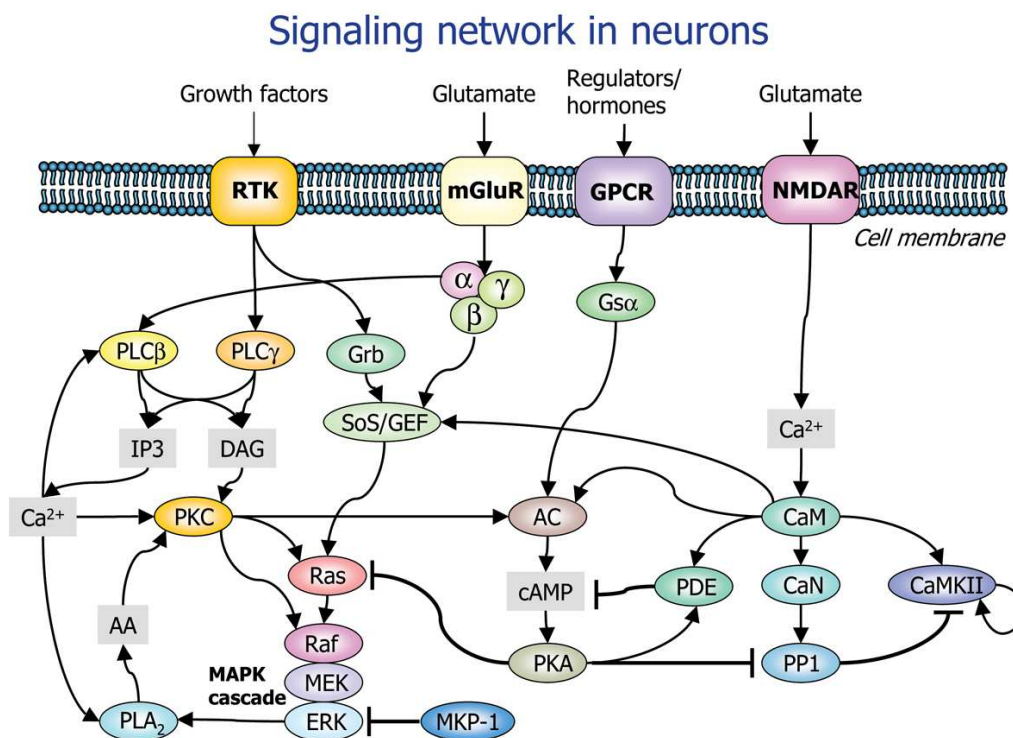
relacionadas com a tropomiosina que, subsequentemente, emitem sinais para o citoplasma e núcleo.

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), juntamente com outros fatores que possuem atividade neurotrófica, formam uma família de RTKs associados com uma grande variedade de respostas intra-neuronais necessárias para a sobrevivência, diferenciação, regeneração e plasticidade (HAUSOTT et al., 2009).

Os RTKs neuronais mais relevantes, principalmente os receptores Trks, FGF e EGF, tem a capacidade de influenciar as vias de sinalização neuronais intrínsecas e sua expressão gênica moldando a morfologia neuronal e determinando seu fenótipo neuroquímico.

Além de seu papel convencional no controle do desenvolvimento, as vias de sinalização das células neuronais (Figura 5) também estão envolvidas na plasticidade sináptica, isto é, na variabilidade e intensidade dos sinais. A intensidade das sinapses é coordenada por modificações, inserções ou remoções de receptores e pelo remodelamento do citoesqueleto de actina das vizinhanças.

Figura 5. Rede de sinalização neuronal. Diagrama esquemático dos módulos das vias de sinalização das células neuronais. Abreviações: RTK: receptor tirosina quinase; mGluR: receptor metabotrópico de glutamato; GPCR: receptor ligado a proteína-G; NMDAR: receptor de *N*-metil D-aspartato; Gq: proteína G tipo q; Gs α : proteína-G tipo s; PLC β : fosfolipase C- β ; PLC γ : fosfolipase C- γ ; IP3: trifosfato de inositol; DAG: diacilglicerol; Sos/GEF: *Son of Sevenless*/fator de troca de nucleotídeos guanina; Ca²⁺: cálcio; PKC: proteína quinase C; AC: adenil ciclase; PDE: fosfodiesterase; CaM: calmodulina; CaMKII: quinase II dependente de cálcio; cAMP: adenosina monofosfato cíclica; CaN: calcineurina; AA: ácido araquidônico; PLA₂: fosfolipase A₂; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; MKP-1: fosfatase da MAP-quinase tipo I; PKA: proteína quinase A; PP1: proteína fosfatase tipo 1 (KLIPP; LIEBERMEISTER, 2006).

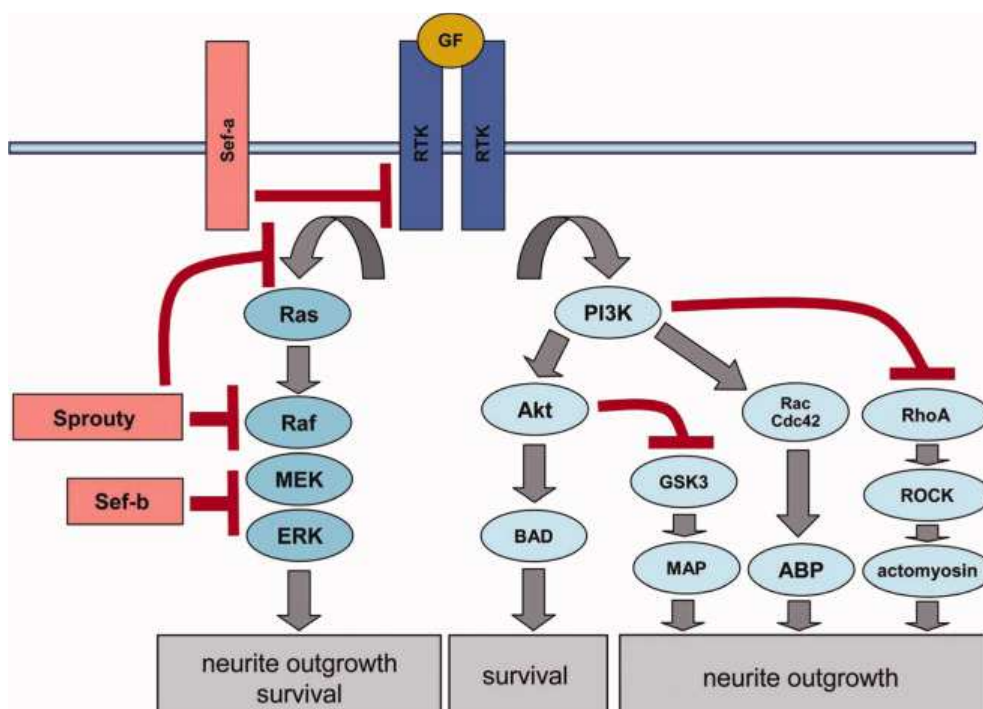


A plasticidade sináptica é conferida por dois principais tipos de transmissão de sinais: (1) as cascatas que levam a fosforilação das proteínas sinápticas e (2) alterações nas concentrações dos segundos mensageiros, que regulam a transcrição gênica e interferem nas cascatas que alteram as proteínas, incluído os íons Ca⁺ e os receptores NMDAR. Os sinais mediados pelas sinapses, baseados nas alterações do potencial de membrana, não são os únicos que atuam nos neurônios. Alguns tipos de sinais envolvem vias bioquímicas independentes de voltagem e estas interações são consequências das propriedades baseadas, não somente nas propriedades das proteínas individuais, mas também em suas conexões, dupla estabilidade e oscilações. Graças a esta interdependência, o envolvimento das vias bioquímicas no processamento da informação aumenta a

capacidade computacional e integradora dos neurônios (KLIPP; LIEBERMEISTER, 2006).

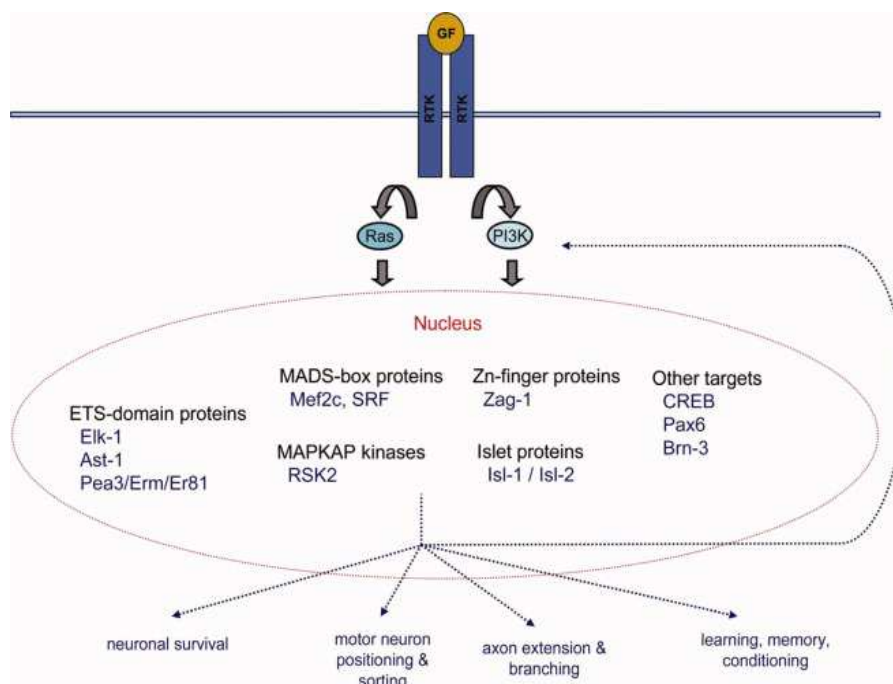
A ligação do ligante induz ativação e auto fosforilação que resulta no recrutamento de moléculas adaptadoras aos resíduos de tirosina quinase presentes no domínio intracelular dos RTKs. Como apresentado na Figura 6, as proteínas adaptadoras desencadeiam a ativação de várias vias de sinalização intracelular, cuja principal cascata, ativada pelos RTKs, envolve a via da Ras/Raf/MEK/ERK, a PI3K/Akt e a da fosfolipase C.

Figura 6. Vias de sinalização do receptor de tirosina quinase (RTK) envolvidas na sobrevivência neuronal e crescimento dos neuritos e sua inibição por meio de inibidores de retroalimentação negativos. Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt representam as duas principais vias para a sobrevivência e crescimento dos neuritos induzida pelos RTKs. A indução do ERK por meio das Ras/Raf/MEK promove a sobrevivência e crescimento dos neuritos pelos controladores de transcrição. A via de sobrevivência da PI3K inclui a Akt que fosforila a BAD e impede sua inibição por proteínas apoptóticas. (HAUSOTT et al., 2009)



A principal função da sinalização por meio dos RTKs é manter os níveis de proteínas necessários para a sobrevivência, crescimento axonal e coordenar as alterações na transcrição gênica, síntese e degradação de proteínas. É provável que a plasticidade do sistema nervoso não exija, necessariamente, uma série distinta de programas transcripcionais, mas que utilize os mecanismos existentes de sobrevivência, extensão do axônio e outros para se adaptar as alterações das condições ambientais. Na Figura 7 estão descritos alguns dos principais reguladores de transcrição influenciados pela sinalização dos RTKs. Distintos reguladores transcripcionais atuam em conjunto para modular a diferenciação, migração, posicionamento do corpo celular, crescimento axonal e sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento, bem como, para o neurônio adulto, relacionado com as funções cognitivas como aprendizado, memória, adição, depressão e ansiedade.

Figura 7. Reguladores transcripcionais influenciados pela sinalização dos receptores de tirosina quinases (RTK). A sinalização por meio dos RTKs atua principalmente por meio da transdução de sinal da Ras/Raf/MAPK ou pela via de sinalização PI3K criando uma variedade de respostas celulares desde a sobrevivência neuronal até o posicionamento do neurônio motor, desde a extensão do axônio até o aprendizado e memória (HAUSOTT et al., 2009)



Embora cada subtipo neuronal possua uma função ímpar, eles compartilham eventos comuns durante o desenvolvimento embrionário e em sua plasticidade. Grupos similares de reguladores transcricionais e de outras proteínas atuam como efetores da sinalização por meio dos RTKs em quase todos os tipos de neurônios, produzindo uma ampla gama de respostas e habilidades cognitivas superiores.

Assim, a importância da elucidação das vias de transdução de sinais e das alterações transcricionais induzidas pela ativação dos RTKs fica evidente, pois poderá levar a identificação de novos moduladores endógenos ou farmacológicos que, no futuro, poderão ser aplicados, principalmente, para o tratamento de lesões isquêmicas, traumáticas ou doenças neurodegenerativas.

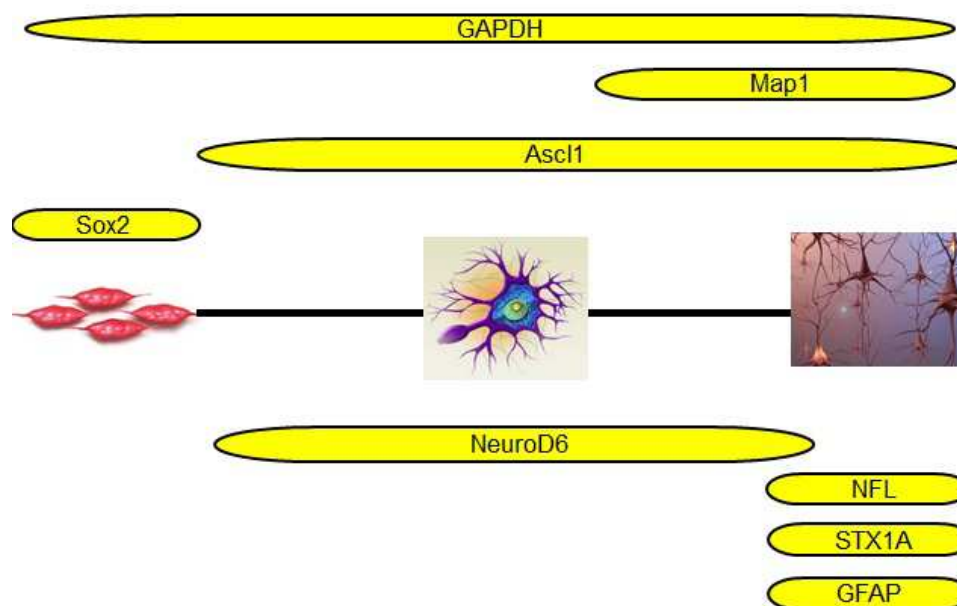
2.12 MARCADORES DA NEURODIFERENCIAÇÃO

Um marcador ideal deve ser específico para um tipo de célula em condições normais e/ou durante a neurodiferenciação. Um marcador da linhagem neuronal é uma molécula endógena que é expressa nas células durante a neurogênese e nas células diferenciadas como os neurônios. Ele permite a detecção e identificação de células por meio de diferentes técnicas e pode ser tanto DNA, mRNA, RNA ou proteína presente na célula de interesse. São ferramentas valiosas para examinar a função das células em condições normais, bem como durante a neurodiferenciação. Os marcadores podem detectar neurônios em diferentes estágios de desenvolvimento nuclear, citoplasmático, entre outros (REDWINE; EVANS, 2002). Durante a neurogênese e neurodiferenciação, vários marcadores são induzidos de forma ordenada e sequencial. A Figura 8 mostra os padrões de expressão temporal de marcadores durante a neurogênese e neurodiferenciação.

Achaete-scute 1 é uma proteína que, em humanos é codificada pelo gene *Ascl1*. Este gene codifica um membro da família Bhlh (*basic helix-loop-helix*) de fatores de transcrição, que é uma classe de moléculas essenciais na neurogênese e gliogênese. O fator de transcrição neural *Ascl1* está presente na zona ventricular, em algumas células mitoticamente ativas, em regiões distintas

do eixo rostrocaudal e dorsoventral do tubo neural. Possui como função induzir a diferenciação neuronal, regulação neural e é um marcador específico de subconjuntos de neurônios em diversas regiões do sistema nervoso (BATTISTE et al., 2007).

Figura 8. Marcadores dos diferentes estágios da neurodiferenciação da célula.



Fonte: Adaptado de Daniel Marinowic.

A proteína ácida fibrilar da glia (GFAP) é a principal proteína do filamento intermediário de astrócitos maduros, importantes durante a regeneração e plasticidade sináptica, e é também um importante componente do citoesqueleto dos astrócitos durante o desenvolvimento. A GFAP é expressa no SNC e está envolvida em muitos processos importantes, incluindo a comunicação da célula e ação da barreira hemato-encefálica. Atua nas interações dos astrócitos para neurônios, bem como a comunicação célula-célula (MIDDELDORP; HOL, 2011).

Os genes Sox codificam proteínas que se ligam ao DNA, desempenhando um papel fundamental em praticamente todos os estágios do desenvolvimento dos mamíferos. Já foram identificados mais de vinte genes pertencentes a esta família, sendo o seu protótipo o gene Sry (sex-determining region Y). O Sox 2 é um fator de transcrição essencial para a manutenção da auto-renovação das

células-tronco neuronais e é intensamente expresso desde a fase neuroectodérmica até as precursoras neurais. É encontrado nas células precursoras neurais que persistem como células-tronco neurais nos nichos neurogênicos do cérebro adulto. Na maioria das células precursoras neurais torna-se regulado negativamente no final do ciclo celular logo antes da diferenciação e, a partir daí, não é mais expresso nos neurônios imaturos (WEGNER, 2011).

As sintaxina são proteínas essenciais para muitos eventos celulares que requerem fusão de membrana, incluindo a exocitose, neurotransmissão, tráfico intracelular e proliferação celular. São proteínas específicas do sistema nervoso associadas com o ancoramento de vesículas sinápticas na membrana pré-sináptica. O Stx 1A é um membro da superfamília das sintaxinas, fundamental na regulação dos canais iônicos e exocitose nas vesículas sinápticas, portanto, são fatores essenciais para a neurotransmissão (ULLOA et al., 2015).

Os microtúbulos representam um dos sistemas de fibras do citoesqueleto eucariótico, essenciais para inúmeras funções celulares como: motilidade, transporte, forma, polaridade e mitose. As proteínas associadas aos microtúbulos (*microtubule-associated proteins*=MAPs) representam um complexo grupo de proteínas que se ligam, de maneira reversível, às subunidades de tubulina que formam os microtúbulos, regulando sua estabilidade. A manutenção da morfologia neuronal bem como o crescimento e plasticidade dos neuritos tem sido atribuída a presença da MAP 1 que se dissocia dos microtúbulos formando complexos agregados com feixes intermediários de filamentos. Esta proteína está presente no desenvolvimento do citoesqueleto e função do sistema nervoso (NEVE et al., 1986)(MANDELKOW; MANDELKOW, 1995).

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima glicolítica que catalisa especificamente a conversão reversível de gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) em 1,3-difosfoglicerato. Embora sua expressão varie em diferentes linhagens celulares, ainda é considerado um gene normalizador, isto é, um gene constitutivo que não sofre alteração com o tratamento do experimento, e tem sido amplamente usado como controle interno na avaliação da expressão de proteínas, mRNA e DNA (ZHANG et al., 2015).

O gene Neuro D6 é um membro da subfamília NeuroD (neurogenic differentiation), Neuro D2 (NDFR) e Nex-1 (MATH-2) de fatores de transcrição bHLH. Possuem características de fatores de diferenciação, estão relacionados com a sinaptogênese e neuritogênese pós-mitóticos até a maturidade neuronal (UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2005)(UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2004).

Os neurofilamentos são proteínas exclusivamente expressas nos neurônios e um dos principais componentes do citoesqueleto neuronal. As três subunidades neurofilamentosas são NFL, NFM e NFH (*Neurofilament light, medium and heavy*). Os neurofilamentos são os principais filamentos intermediários presentes na maioria dos neurônios terminalmente diferenciados, ao passo que o α -internexina é mais abundantemente no sistema nervoso em desenvolvimento e no cerebelo do adulto. O NFL é o mais abundante das três proteínas do neurofilamento e tem como função a montagem correta de neurofilamentos e manutenção do calibre axonal (AL-CHALABI; MILLER, 2003).

Justificativa

3 JUSTIFICATIVA

As células-tronco vêm se tornando alvo crescente de estudo envolvendo diversos tipos de patologias, pelo seu poder de regeneração e diferenciação em diversos tipos de tecidos do organismo. As células-tronco, como todas as outras, também se comunicam por mecanismos de sinalização celular, que faz parte de um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as atividades e funções celulares. A habilidade que as células possuem em perceber e responder corretamente ao seu ambiente forma a base do desenvolvimento, reparo e homeostasia dos tecidos. Erros existentes no processamento da informação celular são responsáveis por diversas doenças.

As doenças neurológicas, além de serem responsáveis por uma grande parcela das doenças crônicas e debilitantes, tem sido alvo da terapia celular que explora o potencial de diferenciação das células-tronco adultas. O processo de neurogênese e neurodiferenciação tem sido intensivamente investigado e a melhor compreensão dos processos moleculares que coordenam o direcionamento das células indiferenciadas para tipos celulares específicos permitirá, no futuro, o melhor manejo das doenças neuronais.

Na última década houve um progresso significativo a respeito dos eventos celulares e moleculares induzidos pela ativação dos diferentes tipos de receptores, celulares, como a ativação e reciclagem dos RTKs, a ligação e alterações nas moléculas de sinalização e a regulação dos eventos nucleares que levam a alterações na expressão gênica durante a diferenciação de células-tronco e/ou células precursoras neurais durante a neurogênese. Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido a respeito dos mecanismos de comunicação intracelular e a sua relação com ativação das cascatas de sinalização, desde o receptor de superfície até o núcleo celular, durante a neurodiferenciação e a neurogênese. Os mecanismos de ação das células-tronco em reparos do sistema nervoso central.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar quais os RTKs que estão sendo ativados durante a neurogênese de células-tronco adultas de tecido de cordão umbilical humano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar células-tronco mesenquimais adultas a partir de tecido de cordão umbilical humano;
 - Neurodiferenciar as células-tronco mesenquimais adultas obtidas do tecido de cordão umbilical;
 - Quantificar a expressão dos genes de neuroindução e neurodiferenciação;
 - Avaliar os níveis de ativação dos RTKs durante o processo de neuroindução e neurodiferenciação.
-
-

Metodologia

5 METODOLOGIA

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo está em conformidade com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012).

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pela Comissão Científica do Instituto de Geriatria e Gerontologia, pelo Comitê de Ética em Pesquisas da PUCRS (CEP) e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o número: 1.108.833.

Este projeto foi uma continuidade e complementação do projeto “Neurodiferenciação de Células-Tronco de Cordão Umbilical Humano” (Of. CEP 11/05504) já aprovado pela Comissão Científica da Faculdade de Medicina e pelo Comitê de Ética em Pesquisas da PUCRS, para o qual foi submetida uma ementa, a qual foi avaliada e aprovada conforme mencionado acima.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas.

5.2 AMOSTRAS

A coleta do tecido do cordão umbilical foi realizada pela enfermeira que se encontrava de plantão no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas (HSL), após a concordância da gestante pela cedência da placenta e do cordão umbilical. As amostras foram numeradas consecutivamente e o nome da paciente não foi mais utilizado, visando preservar o sigilo.

5.3 CÁLCULO DO NÚMERO DE AMOSTRAS

Como o presente estudo utilizou metodologia com avaliação *in vitro*, fez-se necessário o cálculo visando a obtenção de um número suficiente de células, a partir do conhecimento prévio de sua capacidade de replicação, para possibilitar os experimentos e todas análises necessárias em cada etapa. Para detecção da diferença dos fatores analisados entre os grupos e considerando um nível de confiança de 95%, foram necessários seis ambientes (poços) de cultura celular para cada um dos parâmetros analisados. Para esse cálculo amostral, foi utilizado o programa WinPepi v11.43.

Com base no conhecimento prévio da capacidade de replicação das MSCs, a partir de um segmento de cordão umbilical é possível obter células necessárias para desenvolver todos os experimentos do estudo. Considerando a diversidade genética da população, embora estejamos trabalhando com células supostamente mais indiferenciadas, isto é, sem importantes variações genéticas, neste estudo foi utilizado células de três diferentes cordões de parturientes saudáveis.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para compor o grupo de participantes, foram incluídas na pesquisa mulheres, maiores de 18 anos, admitidas para o parto no Centro Obstétrico do HSL e que concordaram participar da pesquisa por meio da cedência do cordão umbilical após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Não foram empregados critérios de exclusão específicos.

5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

O tecido de cordão umbilical humano foi obtido de três parturientes. Um segmento do cordão umbilical foi colocado em um recipiente estéril e transportado para o Centro de Terapia Celular para posterior obtenção das células.

O tecido do cordão umbilical foi lavado com DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) para a retirada do excesso de sangue. As artérias e veias foram isoladas, cortadas em pedaços pequenos e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina e 20 ng/mL de FGF em placas de cultura de seis poços com ranhuras no fundo para melhor fixação e proliferação. Essas culturas foram mantidas em estufa à 37°C, com 5% de CO₂ por 10 dias. Após este período, os fragmentos de cordão foram retirados, restando apenas às MSCs aderidas na placa.

Quando as culturas atingiram a densidade de 10⁷ células, o meio foi retirado, as células foram lavadas com DPBS e dissociadas com tripsina/EDTA. Após a dissociação, a tripsina foi inativada com igual volume de DMEM e as células foram centrifugadas. Neste estudo esta etapa corresponde às MSCs. Esse procedimento de tripsinização, isto é, de retirar as células de um recipiente por métodos enzimáticos e transferi-las para outro com o objetivo de aumentar a quantidade de células fornecendo novos nutrientes, é definido como subcultivo ou passagem. Uma alíquota (1/6) das células foi transferida para garrafas de cultura de 25 cm² e cultivada e o restante foi congelado para posterior análise.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CONFORME A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR

Uma alíquota das células foi submetida a caracterização conforme preconizado pela ISCT (*International Society for Cell Therapy*) que considera MSCs somente aquelas capazes de adesão à superfície de cultura, que possuem capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica e que apresentem um determinado perfil de marcadores de superfície celular, isto é, 95% da população celular deve expressar os antígenos CD105, CD73 e CD90 e, no máximo, 2% expressar os antígenos de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II.

A determinação do perfil de marcadores de superfície celular foi realizada por meio da técnica de Citometria de Fluxo no FACScalibur (B&Dickinsons Inc.) com anticorpos específicos para cada marcador.

A diferenciação adipogênica foi induzida pelo cultivo das células obtidas do tecido de cordão umbilical em meio DMEM suplementado com 10^8 mol/L de dexametasona e 5 µg/mL de insulina, por quatro semanas.

Para confirmação da diferenciação adipogênica, os meios de cultura foram retirados e a cultura foi lavada com DPBS. As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período o PFA foi retirado, as células foram lavadas com DPBS e coradas com a solução *Oil Red O* por 5 minutos (PHINNEY et al., 1999).

A diferenciação osteogênica foi induzida pelo cultivo das células obtidas do tecido do cordão umbilical em meio DMEM suplementado com 10^8 mol/L de dexametasona, 5µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e 10^8 mmol/L de β-glicerolfosfato durante quatro semanas. Para a detecção dos depósitos de cálcio, as culturas foram lavadas com DPBS e coradas por cinco minutos a temperatura ambiente com *Alizarin Red Sem* pH 4,2 (PHINNEY et al., 1999).

5.7 NEURODIFERENCIAÇÃO

O método de neurodiferenciação utilizado foi adaptado a partir daquele descrito por Song et al.,(2008). Após a quinta passagem, as MSCs foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 0,001% de β -mercaptoetanol, 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 100 μ g/mL de gentamicina por um período de três dias a 37°C com 5% de CO₂. Neste estudo, as células nesta etapa de diferenciação foram consideradas neuroinduzidas, ou simplesmente induzidas. O término desse período, as células foram dissociadas e cultivadas em um meio distinto, isto é, DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 100 μ g/mL de gentamicina por um período de três dias a 37°C com 5% de CO₂. Após tripsinização, as células foram cultivadas em N5 (Neurobasal Medium) suplementado com 20ng/mL de BDNF (*Brain Derived Neurotropic Factor*), 20 ng/mL de GCSF (*Ganulocyte Colony Stimulating Factor*), 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 100 μ g/mL de gentamicina por um período de sete dias a 37°C com 5% de CO₂, estabelecendo a fase final do experimento, isto é, células neurodiferenciadas.

5.8 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS PROGENITORAS E NEURAIS POR IMUNOCITOQUÍMICA

Com o objetivo de confirmar a neurodiferenciação, a maioria dos estudos avaliam, além das alterações na morfologia das células, a expressão de alguns marcadores neurais por meio de microscopia óptica ou eletrônica por imunocitoquímica.

Para isso, após a finalização do protocolo de neurodiferenciação, o meio de cultura foi aspirado e as células foram fixadas com PFA 4% por trinta minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas com DPBS e foi adicionado 1 mL por poço do tampão de bloqueio (Albumina Bovina Fração IV) e incubado por 60 minutos a temperatura ambiente. A seguir, as células foram incubadas com o

anticorpo Fluoropan Neuronal Marker (Millipore, MA USA) conjugado com Isotiocinato de Fluoresceína (FITC) diluído no tampão de bloqueio (1:100). Esse anticorpo é composto de um conjunto de anticorpos formado por anti-núcleo neuronal (NeuN), anti-citoesqueleto neuronal (NF-H), anti-microtúbulo neuronal (MAP 2) e anti-microtúbulo neuronal (β -tubulina III) para caracterização do corpo celular, núcleo, dendritos e axônios neurais. As células foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. A seguir, foi adicionado o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a 0,01% para marcação nuclear e, após cinco minutos, as células foram lavadas duas vezes com tampão DPBS.

As células foram analisadas utilizando microscópio confocal Zeiss LSM-5 *exciter*. Para análise quantitativa, foram selecionados cinco campos visuais em cada lâmina aleatoriamente utilizando lentes objetivas de 20X.

5.9 EXTRAÇÃO DO RNA

O RNA foi extraído das culturas nas três etapas estudadas, isto é, células mesenquimais, neuroinduzidas e neurodiferenciadas. Após a retirada do meio de cultura e lavagem com DPBS, o RNA total foi isolado por meio do método que usa isotiocinato de guanidina (Brazol, Labtrade, São Paulo). As células foram lavadas com 1 mL de DPBS, centrifugadas a 18.000 g por cinco minutos, o sobrenadante descartado seguido da adição de 800 μ L de Brazol. As células foram incubadas por cinco minutos a temperatura ambiente para destruição das membranas celulares e nucleares e liberação dos ácidos nucleicos. Após o período de incubação, foi adicionado 160 μ L de clorofórmio gelado, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 18.000 g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 400 μ L de álcool isopropílico gelado. Após incubação -20°C por 18 horas, as células foram novamente centrifugadas a 18.000 g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi aspirado e os tubos permaneceram à temperatura ambiente por, aproximadamente, 30 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 20 μ L de H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC)

contendo 1 μL de inibidor de RNase. Para evitar uma possível contaminação com DNA, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxirribonuclease I, a qual cliva o DNA de fita simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. As amostras foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a enzima foi inativada pela adição de 1 μL de EDTA a 25 mM e incubadas por 15 minutos à 65°C. Nesta etapa, temos o conteúdo de RNA total das células.

5.10 TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA OBTENÇÃO DO cDNA

A solução de RNA total foi submetida a uma reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se 0,5 μL da enzima Superscript III, 0,2 μL de oligo-dT, 4,5 μL de DTT (0,1M), 4,1 μL de dNTPS (100 mM), 4,5 μL de MgCl_2 (50 mM) e 9 μL de tampão da enzima (5x), para um volume final de 45 μL . Todos os reagentes empregados nesta etapa foram adquiridos da Life Technologies (Termo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA USA).

As reações foram incubadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, Termo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA USA) e submetidas ao seguinte programa: 10 minutos à 25°C, 45 minutos à 42°C, e 3 minutos à 99°C. Após o término da transcrição reversa foi adicionado 2 μL de inibidor de Ribonuclease H a cada tubo e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso.

O cDNA foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro e no Qubit® (Life Technologies).

5.11 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA NEURODIFERENCIAÇÃO E NEUROGÊNESE

A técnica utilizada para a quantificação da expressão dos genes foi a PCR em tempo real em termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, Termo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA USA). Os genes alvos investigados foram: SOX2, GFAP, GAPDH, MAP1, NFL, ASCL1, STX1A e NEURO D6, com os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 1. Esta análise foi realizada com cDNA das três amostras de tecido de cordão umbilical nas três etapas: células mesenquimais, células neuroinduzidas e células neurodiferenciais. Cada amostra foi analisada em duplicata. A amplificação foi feita com 20 ng de cDNA usando SYBR Green Master Mix (Life Technologies) em um volume final de reação de 25 µL. A organização das amostras nas placas está representada no diagrama da Figura 9.

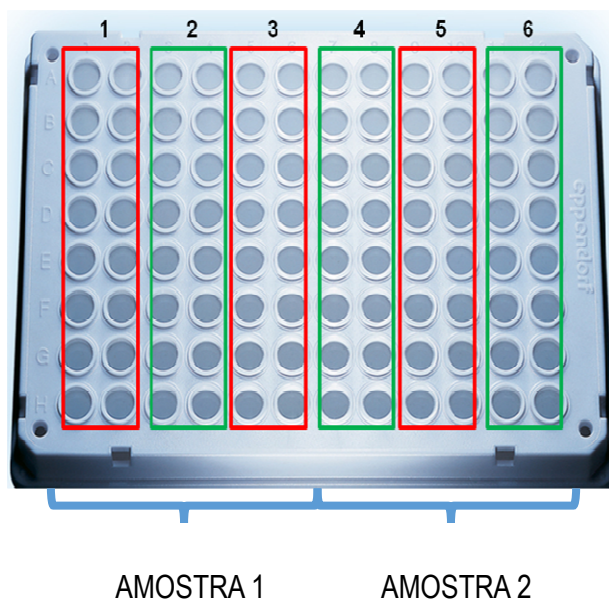
Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR em tempo real e gene alvo.

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
SOX2	AGTCTCCAAGCGACGAAAAA	GGAAAGTTGGGATCGAACAA
GFAP	GTGGTACCGCTCCAAGTTTGCAG	AATGGTGATCCGGTTCTCCTC
GAPDH	TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT	CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MAP1	ACTGCAGGACCAGGA ACTAC	CAGTGTCACCTGCATGTTGC
NFL	TGAACACAGACGCTATGCGCTCAG	CACCTTTATGTGAGTGGACACAGAG
ASCL1	AAGCAAGTCAAGCGACAGCG	AGTCGTTGGAGTAGTTGGGG
STX1A	ATCGCAGAGAACGTGGAGGAG	AGCGTGGAGTGCTGTGTCTTC
NEURO D6	CTGAGAATCGGCAAGAGACC	CTGCACAGTAATGCATGCCG

As condições da PCR foram: 94 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 60 °C por 35 segundos. No estágio final, 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e

95 °C por 15 segundos para determinar a curva de dissociação do produto amplificado.

Figura 9. Placa utilizada no PCR em Tempo Real.



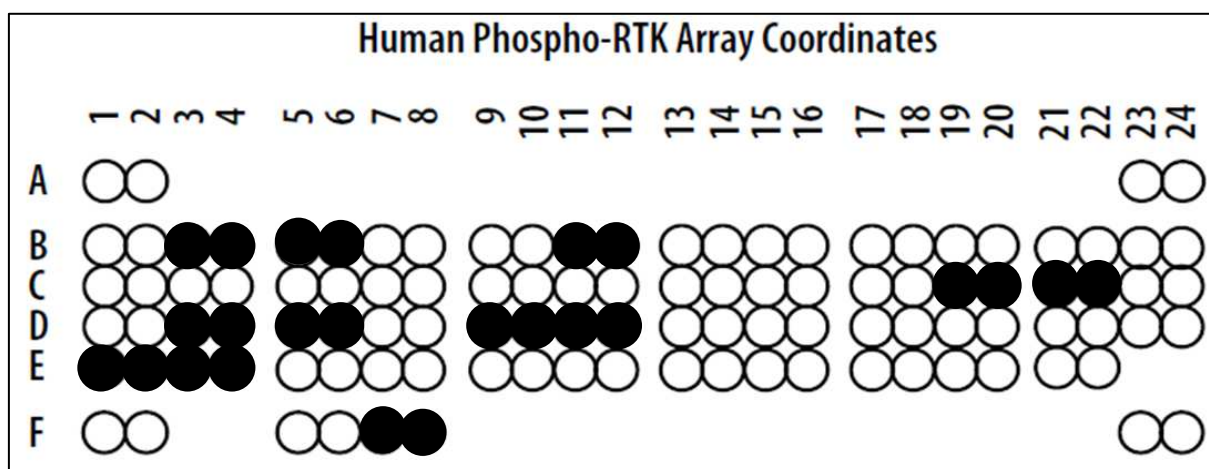
1 e 4: Células mesenquimais; 2 e 5: células neuroinduzidas; 3 e 6: células neurodiferenciadas.

A expressão do GAPDH foi selecionada como referência por se tratar de um gene constitutivo. Para a mensuração, o valor do ciclo limiar, (Ct), foi determinado pelo StepOne™ Software, específico para o termociclador utilizado. O Ct é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar. Foi utilizado método de quantificação relativa utilizando gene de referência e análise por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES TIROSINA QUINASES (RTKs)

Para determinar os RTKs que estão sendo fosforilados, isto é, ativados durante a neurodiferenciação e neurogênese, foi utilizado o kit Human Phospho-RTK Array (R&D Systems). Este kit permite a detecção, em duplicatas, da fosforilação de 49 receptores em membranas de nitrocelulose contendo anticorpos de captura (Figura 10). Cada ponto é referente a uma proteína incluindo quatro controles positivos e cinco controles negativos, em duplicata. Os controles positivos são RTKs fosforiladas, que são reconhecidas pelo anti-RTK. Neste estudo, foram analisadas as proteínas: Erb B2, Erb B3, FGF R2, RYK, ROR 1, ROR 2, Trk A, Trk B, VEGFR 1, VEGFR 2, Eph A6 e Eph A7.

Figura 10. Membrana de nitrocelulose para determinação da fosforilação dos RTKs.



Os lisados celulares foram preparados conforme orientações do fabricante. Resumindo, as células foram lavadas com PBS, lisadas por 30 minutos com tampão de lise contendo os inibidores de proteases (10 µg/mL de Aprotinin, 10 µg/mL de Leupeptin e 10 µg/mL de Pepstatin) para uma densidade de 1×10^7 células/mL. Os lisados foram centrifugados a 14.000 g por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. A quantificação de proteína foi avaliada utilizando um espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. Um total de 500 µL de amostra foi usado para cada membrana.

Para evitar a ligação inespecífica das proteínas, as membranas foram bloqueados com 2 mL de Tampão Array durante 1 h à temperatura ambiente em plataforma orbital. Subsequentemente, os lisados celulares foram colocados sobre as membranas e incubadas por 18 horas à 4°C com agitação. As membranas foram então lavadas por 10 minutos com tampão de lavagem. O anticorpo de detecção Anti-Phospho-Tyrosine-HRP foi acrescentado às membranas seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente com agitação. Após as lavagens, foi adicionado um reagente à base de luminol. As membranas foram secas e digitalizadas usando o scanner Chemi Doc MP de microarray. Após a obtenção das imagens, o número de pixels de cada marcação foi analisado com o software Imagem J.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.13.1 Análise estatística dos dados de fosforilação dos Rtk

Os valores obtidos com o Image J foram transferidos para uma planilha do Excel onde foram calculadas as médias das duplicatas. As médias foram comparadas entre as amostras. Os valores foram analisados por teste *t* de Student (Software GraphPad Prism 5).

5.13.2 Análise estatística dos dados da PCR em tempo real

As medianas e o intervalo interquartil (25%-75%) dos valores do ΔC_t correspondentes aos níveis de expressão gênica foram obtidos após teste de Kruskal-Wallis com o software SPSS v. 13.0.

Em todas as análises os dados foram considerados significativos quando p foi $\leq 0,05$.

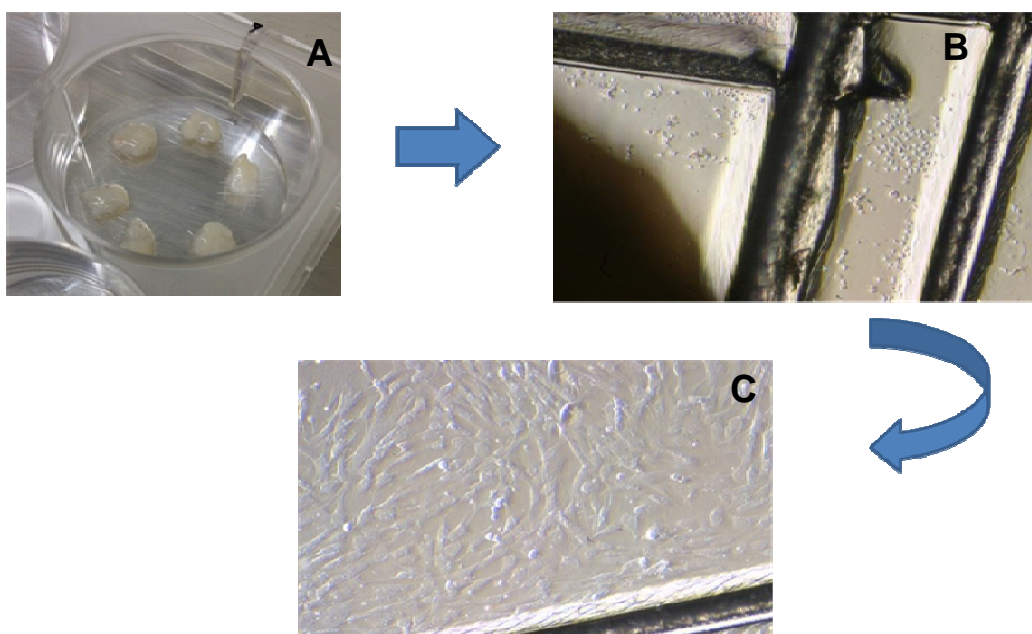
Resultados

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

As células-tronco mesenquimais (MSCs) foram obtidas após o cultivo de fragmentos de tecido de cordão umbilical humano em placas de cultura de seis poços (Figura 11). Na Figura 11A observa-se os fragmentos de tecido de cordão umbilical colocados sobre ranhuras (Figura 11B) que facilitaram a aderência dos fragmentos nos primeiros dias de cultura. Após alguns dias em cultura (5 a 10 dias), o tecido foi retirado, e as MSCs encontravam-se aderidas ao substrato (Figura 11C). Observa-se as células mesenquimais aderidas e cobrindo quase a totalidade da superfície de cultura.

Figura 11. Imagens da cultura de tecido de cordão umbilical humano. **A:** fotografia de tecido de cordão umbilical fragmentado e colocado em cima de ranhuras em um poço de uma placa de cultura. **B:** Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais do tecido se aderindo a placa de cultura (200 X). **C:** Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais aderidas a placa após retirada do tecido (200 X).



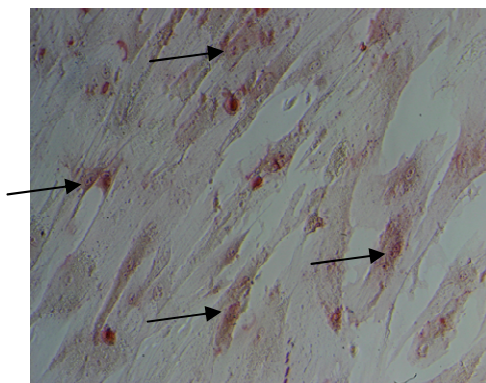
6.2 DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA DE CÉLULAS DO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

As células do tecido do cordão umbilical após cultivo por quatro semanas em meios específicos para diferenciação mesodérmica (osteogênica e adipogênica) foram caracterizadas por métodos de coloração específicos para células ósseas e de gordura.

O processo de diferenciação das MSCs para a linhagem óssea foi comprovado com por meio do corante Vermelho de Alizarina que permite a identificação dos depósitos de cálcio (Figura 12, setas). Encontram-se regiões avermelhadas nas células diferenciadas, isto é, depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz mineralizada, semelhante a do tecido ósseo.

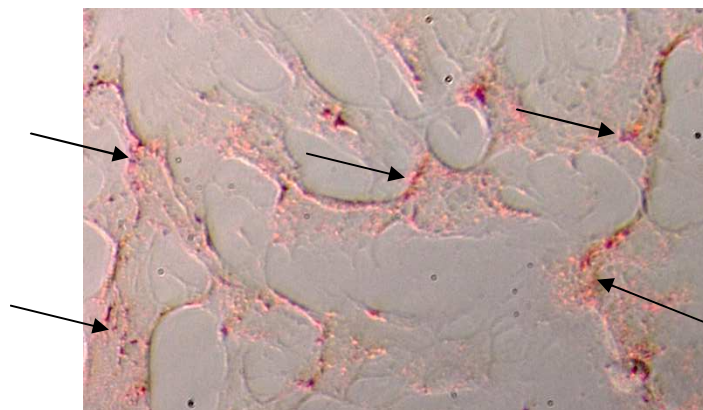
Outra característica marcante é a mudança de morfologia das células osteodiferenciadas, que alteram o seu formato para células mais largas, alongadas e alinhadas, recobrimdo toda placa de cultura e em alguns lugares formando aglomerados celulares.

Figura 12. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais submetidas a diferenciação osteogênica. Setas: depósitos de cálcio em vermelho (400 X).



A indução adipogênica foi demonstrada após três semanas de cultivo quando foi possível identificar uma grande quantidade de vesículas lipídicas intracelulares coradas com Oil Red O (Figura 13, setas), que evidencia as gotículas lipídicas.

Figura 13. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais submetidas a diferenciação adipogênica. Setas: depósitos lipídicos (400 X).



6.3 AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO POR MEIO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA

A avaliação da neurodiferenciação foi realizada nas culturas de células derivadas dos três cordões umbilicais (Figuras 14, 15 e 16). Após o período de treze dias em cultura, anticorpos específicos para proteínas neurais foram utilizados. As imagens identificadas com “FLUOROPAN” mostram, em verde, as estruturas neuronais coradas com o conjunto de anticorpos específicos para as proteínas MAP-2, NEUN, NF-H e β III Tubulina (Fluoropan), em (DAPI) o núcleo celular e a “SOBREPOSIÇÃO” das imagens (merge).

As imagens mostram que as MSCs de tecido de cordão umbilical humano se neurodiferenciaram com marcações distribuídas ao longo das células, indicando a positividade do conjunto de diferentes anticorpos utilizados no estudo.

Figura 14. Fotomicrografia da imunofluorescência das células-tronco mesenquimais neurodiferenciadas da amostra 1.

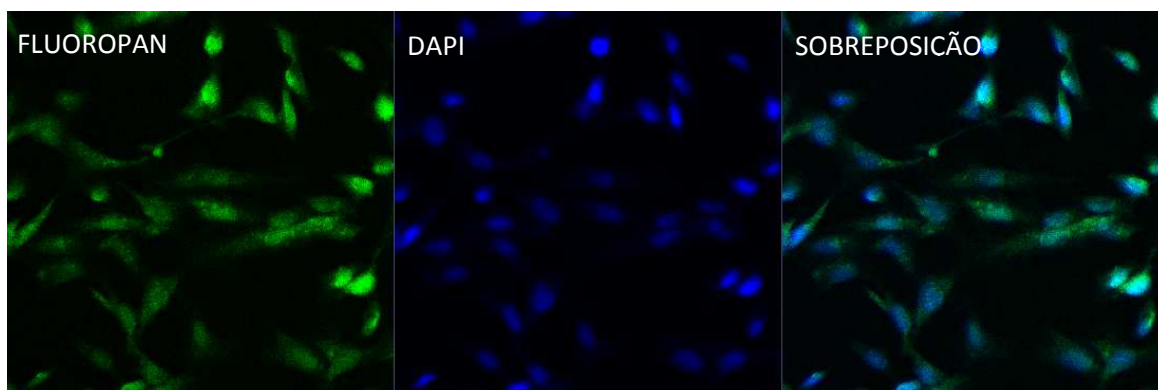


Figura 15. Fotomicrografia da imunofluorescência de células-tronco mesenquimais neurodiferenciadas da amostra 2.

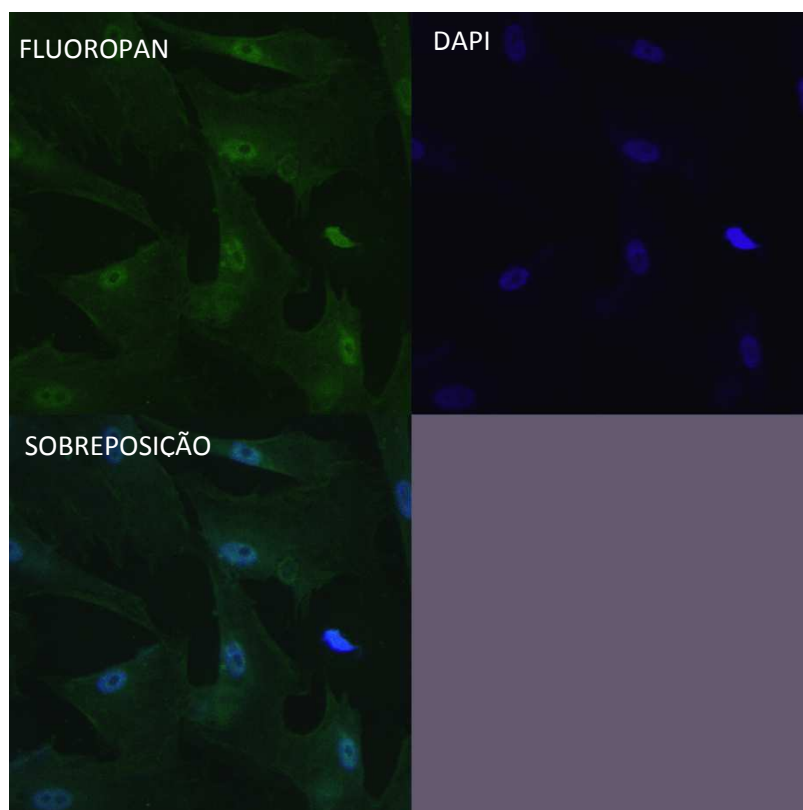
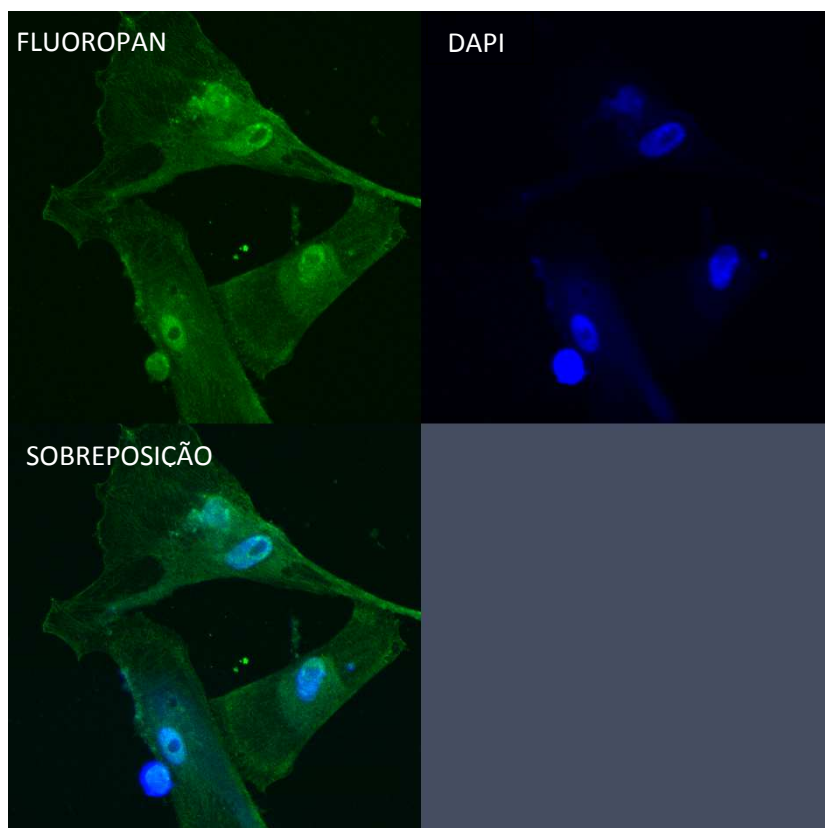


Figura 16. Fotomicrografia da imunofluorescência de células-tronco mesenquimais neurodiferenciadas da amostra 3.

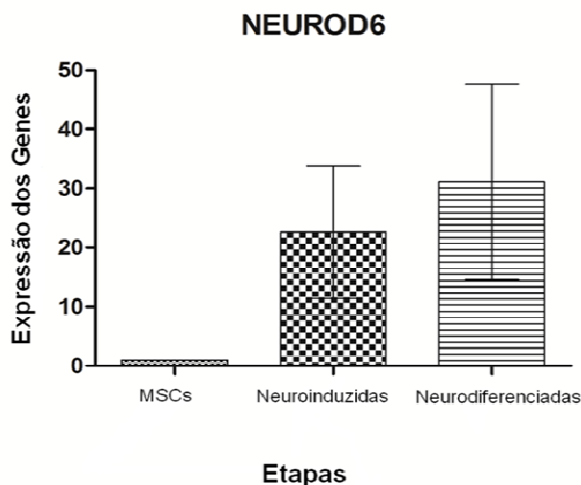


6.4 PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA NEURODIFERENCIAÇÃO E NEUROGÊNESE

A análise da expressão dos genes nas diferentes amostras estudadas mostra que houve uma variação na expressão de alguns genes alvos nas diferentes etapas estudadas (Figura 8). Em todas as amostras, a expressão dos genes estudados estava aumentada nas culturas neuroinduzidas e neurodiferenciadas.

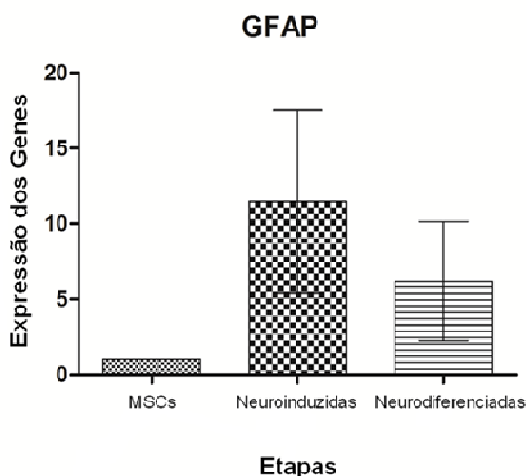
O gene Neuro D6 (Figura 17) apresentou um aumento na expressão de 22,62 X nas células neuroinduzidas e 31,10 X nas células neurodiferenciadas em relação as MSCs.

Figura 17. Gráfico de coluna representando a expressão do gene NeuroD6 nas diferentes etapas estudadas.



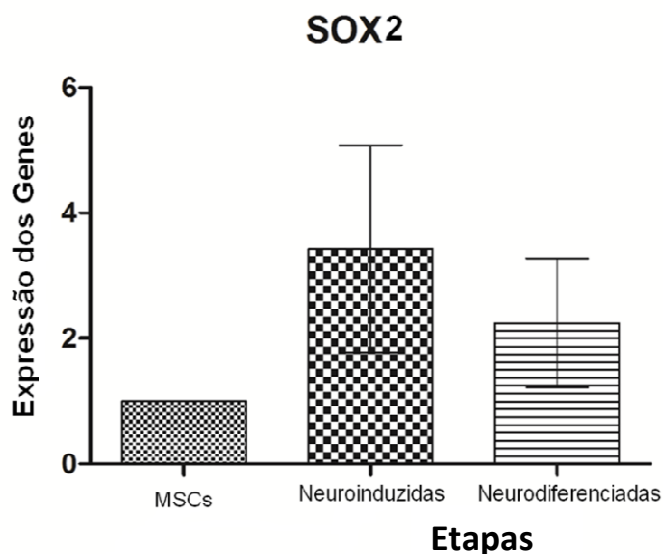
O gene GFAP (Figura 18) apresentou um aumento na expressão de 11,45 X nas células neuroinduzidas e 6,20 X nas células neurodiferenciadas em relação as MSCs.

Figura 18. Gráfico de coluna representando a expressão do gene GFAP nas diferentes etapas estudadas.



O gene Sox 2 (Figura 19) apresentou um aumento na expressão de 3,42 X nas células neuroinduzidas e 2,24 X nas células neurodiferenciadas em relação as MSCs.

Figura 19. Gráfico de coluna representando a expressão do gene SOX2 nos diferentes tempos estudados.



A expressão de alguns genes foi semelhante quando as etapas de neurogênese e neurodiferenciação foram comparadas entre si.

Os genes ASCL1 (neuroinduzidas= 14,72X) (neurodiferenciadas= 14,75 X) e NFL (neuroinduzidas= 19,22 X e neurodiferenciadas=18,91X) (Figura 20) não apresentaram diferenças significativas em suas expressões, assim como os genes STX1 (neuroinduzidas= 307,54 X e neurodiferenciadas=301,84X) e MAP1 (neuroinduzidas=31,61 X e neurodiferenciadas=32,31 X) (Figura 21). Entretanto, novamente, tiveram suas expressões aumentadas quando comparado com as culturas na etapa MSCs.

Resultados

Figura 20. Gráfico de coluna representando a expressão dos genes ASCL1 e NFL nas diferentes etapas estudadas.

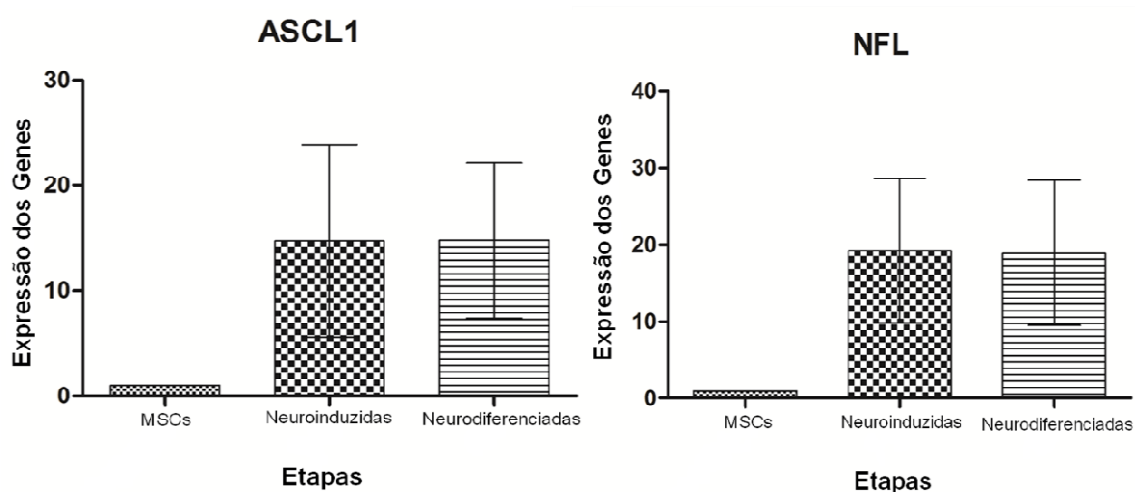
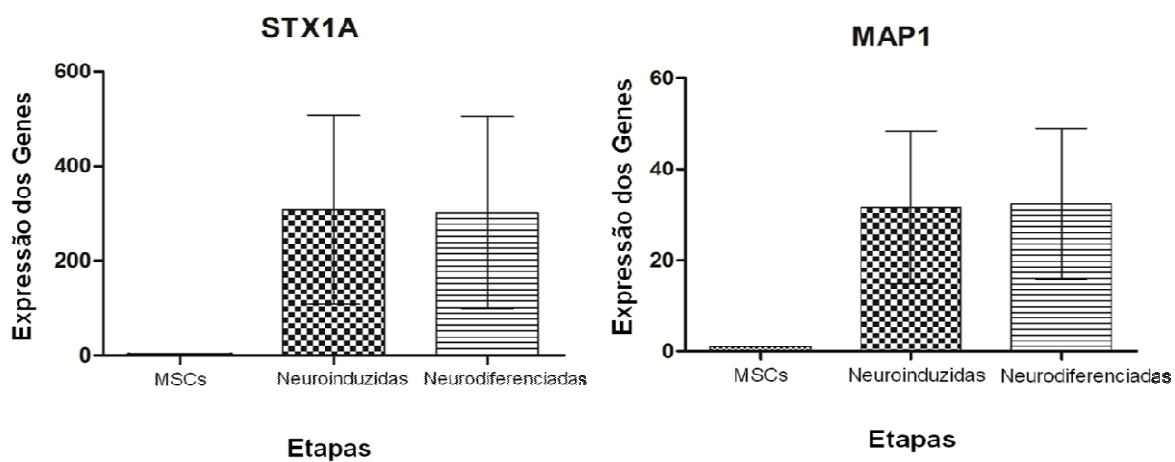


Figura 21. Gráfico de coluna representando a expressão dos genes STX1A e MAP1 nas diferentes etapas estudadas.



Na Tabela 2 está apresentado um resumo da expressão relativa dos genes marcadores de neurogênese nas etapas de indução e diferenciação com relação a expressão nas culturas de células mesenquimais.

Tabela 2. Resumo da expressão relativa* dos genes marcadores de neurogênese nas culturas neuroinduzidas e neurodiferenciadas.

Gene	Neuroinduzidas	Neurodiferenciadas
STX 1A	307,54	301,84
MAP1	31,61	32,31
NEURO D6	22,62	31,10
SOX 2	3,42	2,24
GFAP	11,45	6,20
ASCL 1	14,72	14,75
NFL	19,22	18,91

*dados representam a expressão nas etapas com relação as culturas mesenquimais.

Para análise dos dados dos valores do ΔCt correspondentes aos níveis de expressão gênica foi aplicado o teste do qui-quadrado. Entretanto, como não foi obtido significância, na Tabela 3 estão apresentados os dados descritivos das medianas e intervalos interquartil.

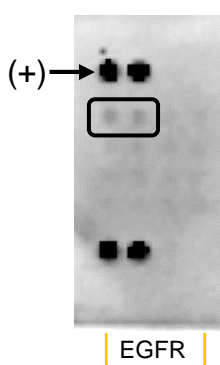
Tabela 3. Mediana e intervalo interquartil dos dados do ΔCt para a expressão dos marcadores de neurogênese.

Gene	Mesenquimal	Neuroinduzidas	Neurodiferenciadas
STX 1A	1,15 (0,71-4,68)	-5,73 (-7,23-4,88)	-5,58 (-7,25-2,03)
MAP1	0,29 (0,15-2,15)	-4,36 (-4,97-3,12)	-4,54 (-4,91-4,64)
NEURO D6	-4,07 [-4,20- (-1,38)]	-8,27 [-8,33-(-0,82)]	-8,43 (-9,03-1,51)
SOX 2	4,20 (2,04-6,14)	2,04 (1,60-6,11)	2,43 (2,40-6,55)
GFAP	3,17 (2,86-4,06)	-0,13 (-1,09-3,31)	1,24 (-0,42-4,43)
ASCL 1	2,42 (2,31-2,99)	-1,04 (-2,40-4,50)	-1,83 (-1,95-5,86)
NFL	-2,51 [-3,10 - (-1,82)]	-7,32 [-7,37- (-1,17)]	-7,28(-7,37-0,87)

6.5 ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES RTKs NAS DIFERENTES AMOSTRAS E ETAPAS ANALISADAS

Na Figura 22 está representado um exemplo da avaliação da fosforilação. O quadrado corresponde a duplicata da intensidade de fosforilação do receptor EGFR e a seta mostra o controle positivo.

Figura 22. Fotografia da marcação da fosforilação em uma membrana.



Para avaliar se houveram diferenças significativas, foi feito uma análise de variância (ANOVA) do número médio de pixels para cada proteína nas diferentes etapas em uma mesma amostra (Figuras 23, 24 e 25) e na mesma etapa entre as diferentes amostras (Figuras 26, 27 e 28).

Quando a fosforilação detectada nas células mesenquimais foi comparada com os níveis de fosforilação das células neuroinduzidas ou neurodiferenciadas da amostra 1, todos os receptores avaliados apresentaram diferença estatisticamente significativa com um aumento dos níveis nas etapas de neuroindução e neurodiferenciação. Entretanto, após a neuroindução os níveis de fosforilação não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, isto é, na comparação entre as culturas neuroinduzidas com as neurodiferenciadas (Figura 23).

Figura 23. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas da amostra 1 nas diferentes etapas do estudo.

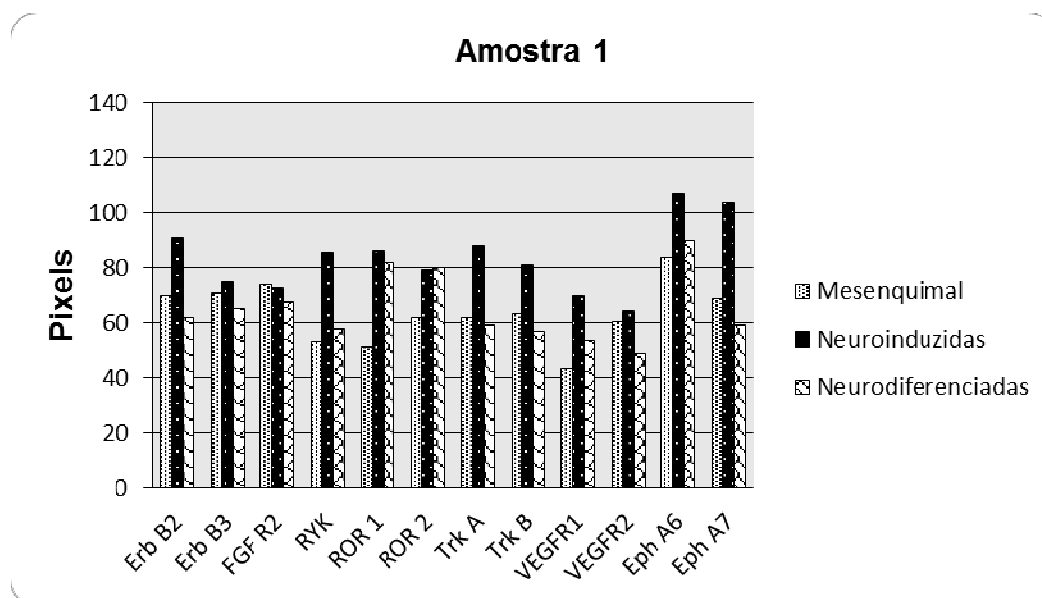
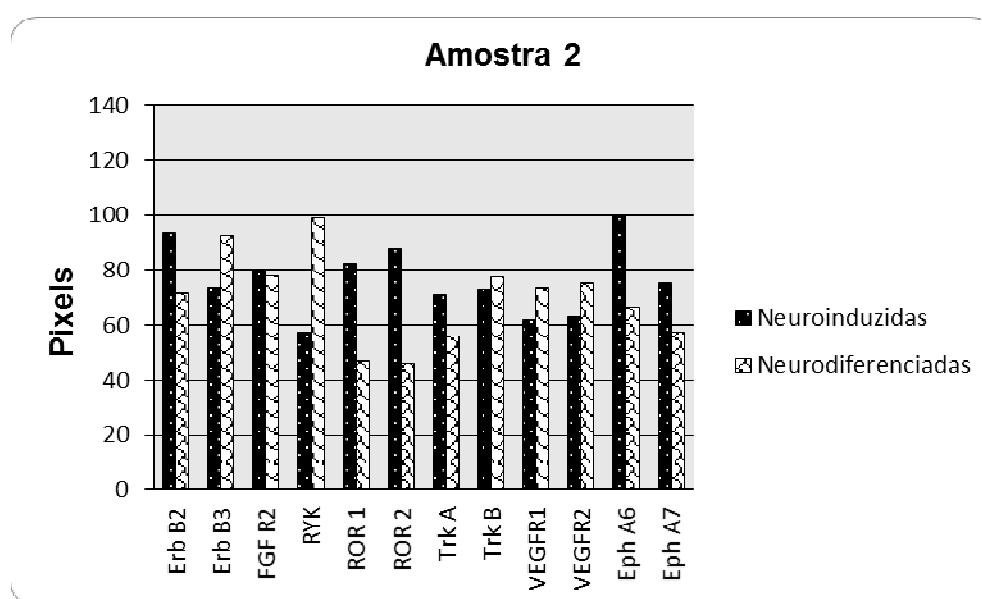


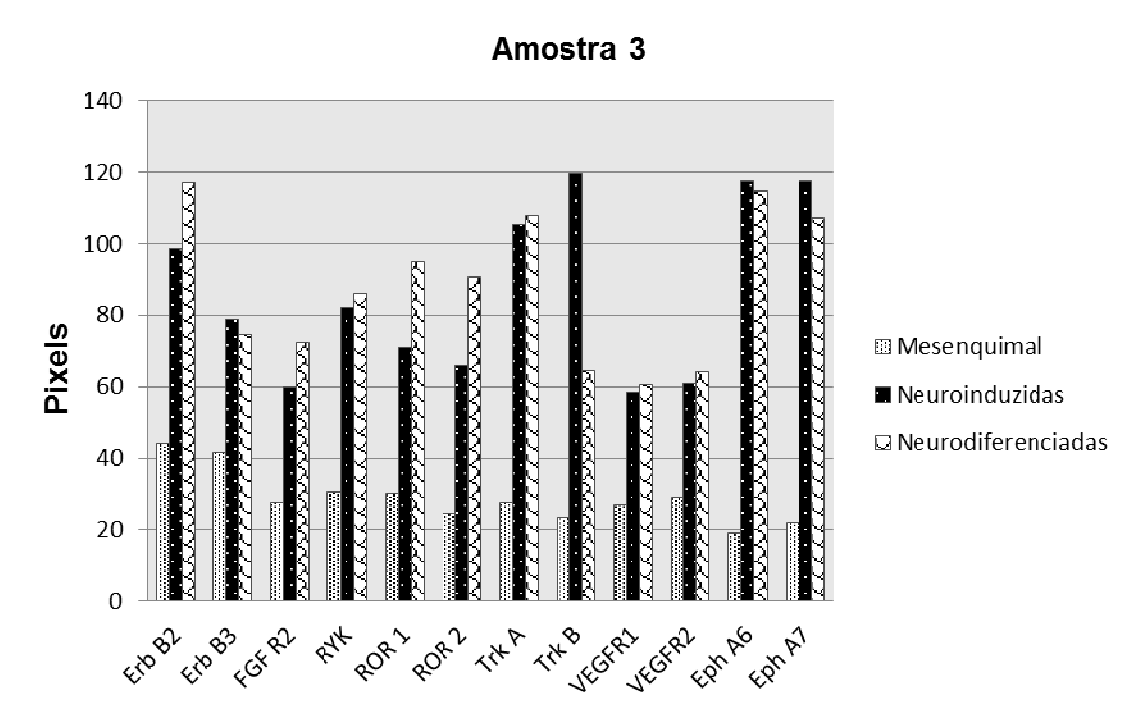
Figura 24. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas da amostra 2 nas diferentes etapas do estudo.



Quando a fosforilação detectada nas células neuroinduzidas foi comparada com os níveis de fosforilação das células neurodiferenciadas da amostra 2, somente os receptores FGF R2, TRK B, VEGF R1 e EPH A6 não apresentaram diferenças significativas (Figura 24).

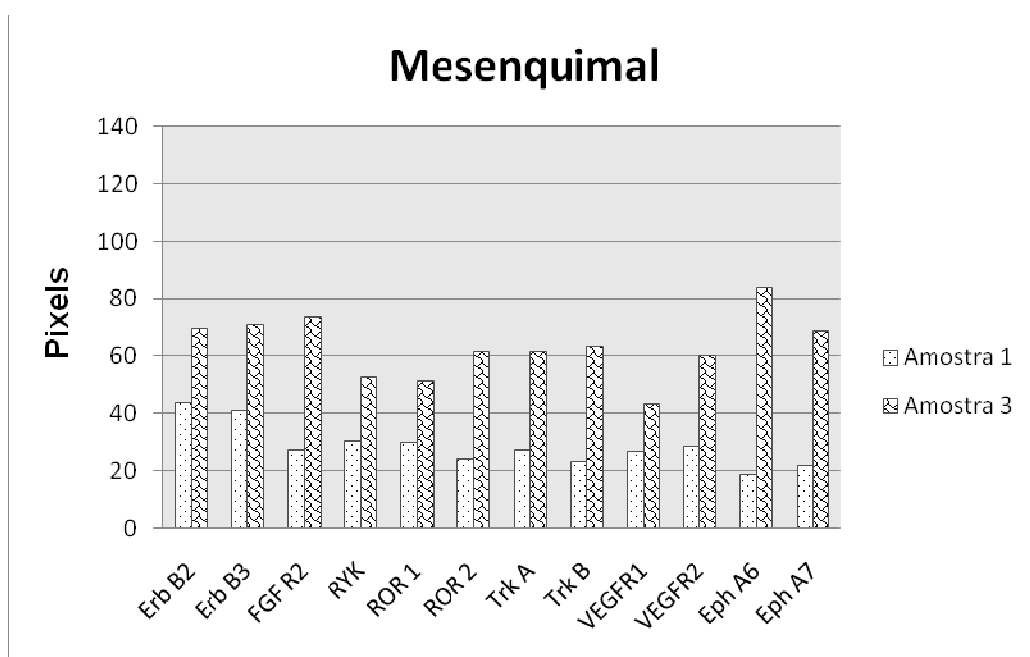
Quando a fosforilação detectada nas células mesenquimais foi comparada com os níveis de fosforilação das células neuroinduzidas da amostra 3, os genes RYK, ROR 1, TRK A, Eph A6 e Eph A7 apresentaram níveis significativamente distintos. Na comparação entre as culturas de células mesenquimais com as neurodiferenciadas, somente os genes ROR 1, ROR2 e Eph A7 apresentaram diferenças nos níveis de fosforilação estatisticamente significativas. Ainda, nas culturas da amostra 3, diferenças significativas nos níveis de fosforilação foram detectadas nos receptores: Erb B2, Erb B3, Trk A, Trk B, VEGF R1, Eph A7.

Figura 25. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas da amostra 3 nas diferentes etapas do estudo.



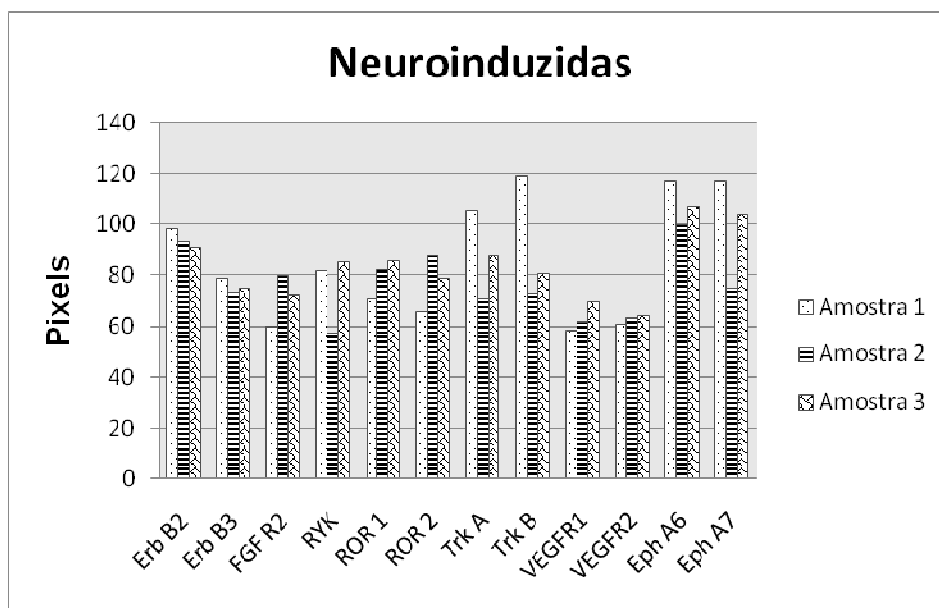
Quando os níveis de fosforilação de cada receptor foram comparados entre as três amostras, não foi detectada diferenças significativas nas culturas mesenquimais (Figura 26).

Figura 26. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas na etapa mesenquimal nas amostras 1 e 3.



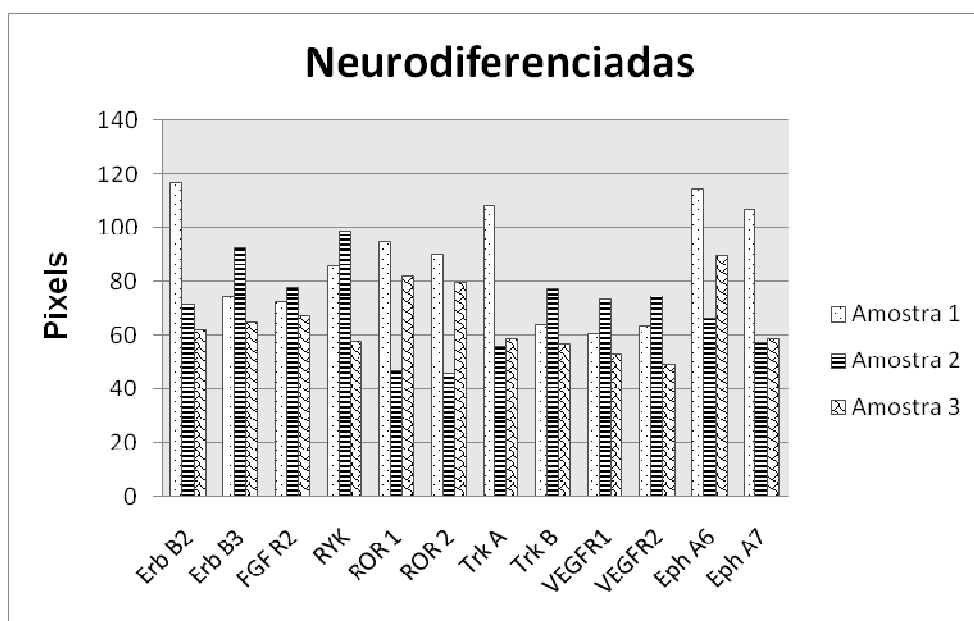
Entre as culturas neuroinduzidas (Figura 27) houve diferença na fosforilação dos receptores: FGF R2, ROR 2, Trk A, Trk B, VEGF R1 e Eph A7 (Tabela 2).

Figura 27. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas na etapa de neuroindução nas amostras estudadas.



Nas culturas neurodiferenciadas, níveis de fosforilação significativamente distintos foram detectados em todos os receptores, com exceção do FGF R2 e RYK, como pode ser observado na Figura 28.

Figura 28. Gráfico de barras representando a intensidade de fosforilação dos receptores nas culturas na etapa de neurodiferenciação nas amostras estudadas.



Nas Tabela 4 estão descritos os receptores cujos níveis de fosforilação foram significativamente distintos em pelo menos uma das etapas de diferenciação avaliadas.

Tabela 4. Receptores com níveis de fosforilação distintos entre as amostras com os respectivos níveis de significância em cada etapa analisada.

Proteína	Neuroinduzida	Neurodiferenciada
ROR 2	p = 0,0013	p = 0,0002
Trk A	p = 0,0171	p = 0,0032
Trk B	p = 0,0010	p = 0,0190
VEGFR 1	p = 0,0346	p = 0,0277
Eph A7	p = 0,0010	p = 0,0006
FGF R2	p = 0,0167	NS
Erb B2	NS	p = 0,0105
Erb B3	NS	p = 0,0042
ROR 1	NS	p = 0,0030
VEGFR 2	NS	p = 0,0017
Eph A6	NS	p = 0,0240

Discussão

7 DISCUSSÃO

A primeira fonte de células-tronco mesenquimais (MSCs) identificada foi a medula óssea (CAPLAN, 1991). A partir daí muitos estudos mostraram que as MSCs poderiam ser encontradas em uma grande variedade de tecidos. Além da medula óssea, estas células foram identificadas e isoladas do tecido adiposo (ZUK et al., 2001), cordão umbilical (WANG et al., 2004b), polpa dental (GRONTHOS et al., 2000), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), placenta (MIAO et al., 2006), entre outros. Em uma comparação entre o sangue e o tecido do cordão umbilical, o número de MSCs que podem ser obtidas a partir do tecido é superior ao número obtido do sangue do cordão umbilical (SECCO et al., 2008). Mesmo que a obtenção das duas fontes não acarreta nenhum risco ou desconforto para a parturiente e seu bebê, o tecido do cordão umbilical tem sido considerado a melhor e mais rápida alternativa fonte de MSCs (SECCO et al., 2009). Apesar disso, existem poucos estudos que empregaram as MSCs a partir do tecido do cordão umbilical humano, sendo o sangue do cordão o mais utilizado nas pesquisas (SECCO et al., 2008)(SECCO et al., 2009), assim como a medula óssea (MUELLER; GLOWACKI, 2001).

Este estudo foi desenvolvido a partir da obtenção de tecido de três cordões umbilicais distintos. Por meio do emprego de metodologias descritas na literatura e adaptadas as condições de cultura, foi possível obter MSCs em quantidades suficientes para o prosseguimento das análises. As MSCs foram caracterizadas conforme os critérios estabelecidos pela ISCT (DOMINICI et al., 2006). As três amostras comprovaram a plasticidade, através da indução química de diferenciação. A morfologia celular foi alterada quando submetidas ao processo de diferenciação adipogênica. Estas observações também foram descritas em outros trabalhos, incluindo os de (RAGNI et al., 2013), (HAYWARD et al., 2013), (AN et al., 2015), (CUI et al., 2015) e (PANEPUCCI et al., 2004). A indução osteogênica também resultou na alteração de morfologia. Nódulos mineralizados

corados pelo *Alizarina Red S* foram observados, assim como já descrito por (KADAM; BHONDE, 2010), (AMABLE et al., 2013), (HU et al., 2013), (WANG et al., 2004a) e (CUI et al., 2015).

As MSCs tem se mostrado promissoras para o tratamento de várias doenças degenerativas por sua grande plasticidade que as tornam capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (BARRY; MURPHY, 2004). Entre as diversas aplicações das MSCs, estão às doenças neurodegenerativas, para as quais as células-tronco vêm sendo consideradas como uma opção, devido à sua capacidade de diferenciação em tipos de neurônios específicos ou de glia, o que poderá substituir as células perdidas em uma determinada doença ou lesão neurológica (MENDEZ-OTERO et al., 2009).

Um grande número de métodos e meios de cultivo e uma grande variabilidade nos resultados já foram descritos com relação ao processo de diferenciação neural *in vitro* com células obtidas de medula óssea (WOODBURY et al., 2000), de tecido adiposo (FUJIMURA et al., 2005)(FRANCO LAMBERT et al., 2009), de polpa dental (KERKIS et al., 2007)(ARTHUR et al., 2008), de sangue de cordão umbilical (SECCO et al., 2008)(SECCO et al., 2009), dentre outras. Entretanto estudos empregando células obtidas de tecido de cordão umbilical ainda são limitados.

No presente estudo, foi possível observar mudanças morfológicas confirmadas por meio da expressão de marcadores das estruturas neuronais. No entanto, um neurônio maduro no SNC não pode ser definido como tal por suas características citológicas, nem pela expressão de proteínas específicas. O fator mais importante que define a funcionalidade de um neurônio é a sua excitabilidade ou a sua habilidade de ativar o potencial de ação e, assim, comunicar-se com outras células através de neurotransmissores nas sinapses (LU; TUSZYNSKI, 2005). Embora neste estudo não tenha sido possível a continuidade e comprovação da funcionalidade neuronal, outras propriedades e características específicas de células neurais foram detectadas. As células em um processo inicial de neurodiferenciação também possuem um papel importante na medicina regenerativa podendo ser aplicadas para a prevenção de doenças. Na revisão de Lu e Tuszyński (2005) foram apresentados alguns estudos que

demonstraram que neurônios funcionalmente maduros podem ser gerados *in vitro* a partir de células tronco embrionárias (ES) e/ou células tronco adultas (LU; TUSZYNSKI, 2005). Segundo Croft et al., (2006), o tratamento de lesões cerebrais com células-tronco neurodiferenciadas *in vitro* apresentou um aumento da neurogênese no local da lesão quando comparado com o tratamento com células-tronco não diferenciadas (CROFT; PRZYBORSKI, 2006). Estes achados corroboram a hipótese de que as células, em um processo inicial de diferenciação, como no presente estudo, podem ser capazes de completar o desenvolvimento *in vivo* e trazer benefícios na regeneração dos tecidos.

O processo de diferenciação neural é acompanhado pela expressão de marcadores moleculares, como de células-tronco neurais (Ascl1, Neuro D6), de neurônios (MAP1, NFL, Stx1A) e de astrócitos (GFAP) (REDWINE; EVANS, 2002).

O fator de transcrição Sox está envolvido na especificação, diferenciação e maturação das ES. Para conduzir a neurogênese, há uma ligação de Sox com um conjunto de potencializadores gênicos. Inicialmente, o Sox auxilia a pré-selecionar genes neurais e, a seguir, assegura a ativação dos precursores neurais e neurônios. O Sox 2 é necessário para o estabelecimento de ES, mantendo a sua pluripotência, garantindo sua auto-renovação. Este gene faz parte da combinação de fatores de transcrição que são capazes de restabelecer as características pluripotentes de células-tronco em células terminalmente diferenciadas. O Sox 2 liga-se a vários locais no genoma atuando como um fator precursor nas ES. Adicionalmente, o Sox 2 tem outras funções durante o desenvolvimento: é fortemente expresso em todo o neuroectoderma e nas células precursoras neuronais e pode ser encontrado em células precursoras neuronais que persistem como células-tronco neurais nos nichos neurogênicos do cérebro adulto (WEGNER, 2011). Todas essas afirmações corroboram com os níveis de expressão desse gene detectado nas culturas do presente estudo tendo aumentado sua expressão nas culturas neuroinduzidas e reduzindo nas culturas neurodiferenciadas, mas sempre em maior quantidade quando comparado às culturas mesenquimais.

O gene ASCL1, é um fator de transcrição envolvido no comprometimento neuronal, é um gene pró-neural que codifica um grupo de proteínas bHLH que atuam como reguladores transcricionais com função fundamental na diferenciação neuronal. Durante a embriogênese é essencial para diferenciação neural além de ser um fator chave para a reprogramação de fibroblastos em neurônios funcionais *in vitro* (KIM et al., 2011). O ASCL1 se restringe à zona ventricular no tubo neural e é conhecido por ser necessário para a diferenciação neuronal e a especificação de subconjuntos de neurônios em diversas regiões do sistema nervoso (BATTISTE et al., 2007). Os resultados aqui obtidos mostraram que o ASCL1 foi expresso igualmente nas duas etapas.

O gene Neuro D6 é expresso, especificamente no sistema nervoso com níveis mais elevados na placa cortical do cérebro. Este gene pode estar envolvido na diferenciação e manutenção de células neurais. No sistema nervoso em desenvolvimento, Neuro D6 é expresso na placa cortical, onde as células neurais maduras estão presentes, e na zona intermédia, mas não na zona ventricular, em que as células precursoras neurais estão a dividir. Neuro D6 é também expresso no cérebro adulto, onde a neurogênese já está completada (SHIMIZU et al., 1995)(MONTZKA et al., 2009). Neste estudo, foi possível comprovar, mais uma vez, que este gene é um marcador de maturidade neural pois sua expressão estava ainda mais aumentada nas culturas neurodiferenciadas.

O marcador neural MAP1 apresentou os mesmos níveis de expressão nas células neuroinduzidas e neurodiferenciadas. Provavelmente, por se tratar de proteínas de microtúbulos, não é possível que, no processo de neurogênese esta proteína possa ser dispensada. De fato, MAP1 e MAP2, são as MAP mais abundantes no cérebro e estão localizadas, principalmente, nos compartimentos somato-dendríticos dos neurônios (GOEDERT; CROWTHER; GARNER, 1991). A MAP1 é também componente principal nas ligações cruzadas entre microtúbulos ou entre microtúbulos e outros componentes do citoesqueleto nos dendritos, como já revelado por métodos de microscopia (SHIOMURA; HIROKAWA, 1987). A expressão de MAP1 resulta na agregação intracelular de microtúbulos, manutenção da morfologia neuronal e formação e crescimento de neuritos em células não-neuronais (GOEDERT; CROWTHER; GARNER, 1991).

O GFAP é um marcador de células acessórias da glia já bem estabelecido desde a década de 80 como marcador de astrócitos do SNC, de glia, de células de Schwann e de células satélites ganglionares (ENG, 1985)(JESSEN; THORPE; MIRSKY, 1984). Sua localização é no citoesqueleto (HANSSON; RÖNNBÄCK, 2003). Assim como Jadhay et al., (2011), que sugeriram que as células gliais não expressam esta proteína nos estágios iniciais e nem finais do desenvolvimento (JADHAV; ROESCH; CEPKO, 2011), o presente estudo mostrou uma maior expressão de GFAP nas células neuroinduzidas, reduzindo nas culturas neurodiferenciadas. Esses achados também são corroborados por Song et al., (2002), que demonstraram que nos astrócitos em desenvolvimento, o GFAP é mais expresso pois é um componente importante do citoesqueleto (SONG; STEVENS; GAGE, 2002).

Os neurofilamentos são filamentos intermediários de neurônios que conferem rigidez, resistência e orientação para o transporte intracelular de axônios e dendritos (LIU et al., 2004). São marcadores amplamente utilizados para os neurônios (MONTZKA et al., 2009) e possuem três subunidades expressas em fases distintas do desenvolvimento. Segundo (LIU et al., 2004), o NFL é expresso no início da diferenciação neuronal. Assim, espera-se detectar sua presença em todas as etapas da neurogênese como foi observado nas células neuroinduzidas e neurodiferenciadas do presente estudo.

As syntaxinas (Stx) são proteínas específicas do sistema nervoso relacionadas com o ancoramento das vesículas sinápticas, crescimento axonal e migração neural (BENNETT et al., 1993) (ULLOA et al., 2015). Tem sido relacionada a progressão e invasão de tumores de glioblastomas (ULLOA et al., 2015). Surpreendentemente, no presente estudo sua expressão foi trezentas vezes mais elevada nas culturas neuroinduzidas e neurodiferenciadas, do que nas culturas mesenquimais provavelmente refletindo a intensa atividade proliferativa desencadeada durante a neurogênese.

Neste estudo a fosforilação dos receptores tirosina quinases foi investigada durante o processo de neurogênese, isto é, desde a célula mesenquimal, passando pela etapa de neuroindução e finalmente no final da etapa de neurodiferenciação.

A proteína ROR 2 atua como um receptor ou co-receptor na via de Wnt (ENDO et al., 2012) e tem como função regular diversos processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração, polaridade e crescimento axonal (CADIGAN; NUSSE, 1997). ROR 2 é expressa no sistema nervoso em desenvolvimento, incluindo o neocórtex (AL-SHAWI et al., 2001). Esta ativação foi também detectada neste estudo, nas culturas neuroinduzidas das amostras 1 e 3.

Os receptores Eph são proteínas de membrana com 14 membros distintos, que estão presentes em diversos tipos celulares embrionários e que participam de vários processos do desenvolvimento e idade adulta. Estes processos vão desde o direcionamento da migração celular por estímulo ou repulsão, associação a moléculas de adesão e do citoesqueleto, angiogênese e direcionamento da formação neuronal do SNC e periférico (KRULL et al., 1997). Como RTKs, os Ephs possuem domínios intracelulares envolvidos na transdução de sinal. A família Eph é a maior entre as famílias de RTK. O Eph A7 tem um papel importante no desenvolvimento embrionário sendo expresso antes do fechamento do tubo neural, nas bordas da placa neural em embriões de galinha (ARAUJO; NIETO, 1997). Eph A7 é um mediador ativo e complexo de maturação e função neuronal cortical (CLIFFORD et al., 2014). Entretanto, no presente estudo os níveis de fosforilação do Eph A7 foram mais elevados na etapa de neuroindução tendo seus níveis reduzidos nas culturas neurodiferenciadas, talvez isso implique em uma função anterior a maturidade neuronal como já descrito por alguns autores citados acima que sugerem uma ação deste receptor também nos estágios iniciais do desenvolvimento.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem um papel importante no desenvolvimento e na função dos sistemas circulatório e nervoso, exercendo efeitos tróficos e de proteção dos neurônios (GREENBERG; JIN, 2014). Está envolvido na sinalização vascular (PIERCE et al., 1995) e a sua suplementação exógena sustenta a sobrevivência de células neuronais e gliais depois de lesões tóxicas e isquêmicas (MATSUZAKI et al., 2001). Este fator de crescimento induz a neurogênese em células progenitoras neuronais *in vitro* e *in vivo* (JIN et al., 2002) e facilita tanto a mobilização de células quanto a

revascularização (KWAK et al., 2000). Entre os RTKs, o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) foi originalmente identificado por seu papel crucial no desenvolvimento, manutenção e função do sistema vascular (SCHNEIDER; SCHNEIDER; PLATE, 2013). Este RTK está vinculado aos membros da família VEGF que contém seis glicoproteínas homólogos distintas. O VEGFR-1 não produz um forte sinal mitogênico e modula negativamente a proliferação de células endoteliais durante o desenvolvimento embrionário (ROBERTS et al., 2004). Em células neuronais maduras, ele está envolvido na sobrevivência e sinalização (SCHNEIDER; SCHNEIDER; PLATE, 2013). Este efeito também pode ser observado nas culturas das amostras 2 e 3, onde os sinais de fosforilação estavam aumentados tanto no VEGFR1 quanto no VEGFR2. Em efeito inverso foi detectado nas culturas da amostra 1 em ambos receptores.

As neurotrofinas compreendem uma família de proteínas secretadas, em sua maioria, pela via dependente de cálcio, capazes de promover o crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência e a mielinização de neurônios do SNC e periférico, dentre outros efeitos (ARÉVALO; WU, 2006). As ações exercidas pelas neurotrofinas são mediadas por dois tipos principais de receptores membranares, os RTKs do tipo Trk (quinase relacionada à tropomiosina) e o receptor p75, pertencente à família de receptores do fator de necrose tumoral. O gene Trk confere a ativação constitutiva da atividade da tirosina quinase de induzir a proliferação contínua das células (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009). Os receptores Trks são divididos em subtipos, TrkA, TrkB e TrkC. As neurotrofinas possuem certo grau de seletividade para os subtipos de receptores Trk, sendo que o NGF (fator de crescimento do nervo) é mais seletivo para o subtipo TrkA, o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), NT-4 (neurotrofina 4) e NT-5 (neurotrofina 5) se ligam preferencialmente ao subtipo TrkB e, por fim, a NT-3 (neurotrofina 3) se liga mais seletivamente ao subtipo TrkC (ZAMPIERI; CHAO, 2006). Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os níveis de NT3 (Trk C) são maiores nas fases iniciais e diminuem ao longo do desenvolvimento. O contrário ocorre com BDNF (Trk B) e NGF (Trk A), cuja expressão aumenta durante o desenvolvimento. Estas três moléculas estão expressas no hipocampo

adulto (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009)(MAISONPIERRE et al., 1990). Resultados discordantes foram obtidos nesta investigação onde a fosforilação do TrkA e TrkB estava aumentada nas culturas neuroinduzidas e reduzida após neurodiferenciação, isto é, o perfil de fosforilação aqui observado foi similar ao descrito na literatura para o TRK C.

A associação do receptor Erb B com seu ligante (NRG1) regula as funções e o comportamento neuronal, incluindo a proliferação, diferenciação, migração de células progenitoras neurais e células gliais, bem como a mielinização, sinaptogenese e plasticidade sináptica. (SATO et al., 2015), demonstraram que a sinalização por meio do receptor Erb B estimula a divisão celular produzindo neurônios, a partir de células progenitoras neurais no cérebro dos vertebrados. No presente estudo, resultados inconclusivos com relação aos níveis de fosforilação foram obtidos. Por exemplo, nas amostras 1 e 2 houve redução na fosforilação, tanto do Erb B2 quanto Erb B3, nas células mais maduras, isto é, neurodiferenciadas. Entretanto, um padrão inverso foi detectado nas culturas da amostra 3.

Poucos estudos têm demonstrado a importância do FGFR no desenvolvimento neuronal, muitos deles associando sua função com a do EGFR. Aparentemente, ambos receptores são expressos nas células tronco precursoras neurais (NSCs) em rápida proliferação. Em modelos animais nocautes, a infusão dos ligantes FGF ou EGF no cérebro é capaz de restabelecer e promover a proliferação das NSCs, confirmando sua função central na neurogênese (SÜTTERLIN et al., 2013). Neste estudo, somente durante a fase de neuroindução houve discrepâncias nos níveis de fosforilação deste receptor

O receptor Ryk desempenha uma função primordial na orientação do crescimento axonal durante o desenvolvimento do sistema nervoso central de mamíferos, principalmente quando associado a um de seus ligantes, o Wnt. Alguns estudos mostraram que a ativação do Ryk causa uma quimiorrepulsão axonal e coordena o estabelecimento espacial dos axônios principais como no corpo caloso e trato corticoespinal. Além disso, as interações Ryk-Wnt são fundamentais na orientação espacial dos axônios das células ganglionares da retina para a região lateral do teto óptico no cérebro de embriões de galinha

(KEEBLE; COOPER, 2011). Provavelmente, as funções do Ryk nas células do sistema nervoso central são mais necessárias nos estágios posteriores a neurodiferenciação, isto é, maturação neural. Nas amostras 2 e 3 este receptor encontrava-se mais fosforilado nas culturas neurodiferenciadas. Possivelmente, seus níveis de fosforilação estariam mais aumentados ainda se estas culturas fossem direcionadas a diferenciação terminal em tipos neuronais específicos. Ainda, surpreendentemente, este foi o único receptor que não apresentou alterações significativas nos seus níveis de fosforilação entre as três amostras estudadas e nas células das três diferentes etapas de diferenciação estudadas, isto é, células tronco mesenquimais, células neuroinduzidas e células neurodiferenciadas.

Finalmente, os dados obtidos no presente estudo estão de acordo com outros publicados na literatura, como os relatados por (MONTZKA et al., 2009). Esses autores apontam uma grande variação entre doadores com relação a expressão de genes neurais corroborando a heterogeneidade das células mesenquimais humanas, neste caso derivadas de medula óssea. Este fato poderá dificultar a possibilidade do emprego dessas células na medicina regenerativa, tornando sua aplicação tão complexa quando os transplantes, do ponto de vista da histocompatibilidade. Entretanto, o transplante autólogo permanece a melhor estratégia.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo indicam que:

- células-tronco mesenquimais podem ser obtidas de tecido de cordão umbilical humano;
 - as células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical possuem plasticidade para neuroindução e neurodiferenciação;
 - entre os genes envolvidos na neurogênese, o STX 1A encontrava-se mais expresso, ao passo que o SOX 2 apresentou menor nível de expressão;
 - todos os receptores analisados apresentaram níveis de fosforilação aumentado em relação às células tronco mesenquimais;
 - quando os níveis de fosforilação foram comparado entre as diferentes etapas da neurogênese, houve grande variação;
 - na comparação entre as amostras, os níveis de fosforilação dos receptores tirosina quinases aqui investigados também foram variáveis;
 - somente o receptor Ryk não apresentou variação entre os níveis de fosforilação entre as amostras e as etapas da neurogênese.
-
-



Perspectivas



9 PERSPECTIVAS

Novas estratégias de análise dos dados obtidos neste estudo ainda serão realizadas, pois das 49 proteínas receptoras, até o momento apenas doze foram avaliadas.

Adicionalmente, será verificado se há relação entre os níveis de fosforilação dos RTKs com a expressão dos genes marcadores neurais.

Considerando o custo dos materiais utilizados para este estudo, após uma análise mais detalhada, e se for possível definir poucos receptores que fundamentais para o processo de neurogênese, técnicas alternativas e de menor custo poderão ser empregadas para uma avaliação de um maior número de amostras na tentativa de definir as funções temporais e específicas dos receptores.

Ainda, o emprego dessas mesmas estratégias em culturas induzidas à diferenciação tipos neuronais distintos, poderá fornecer dados adicionais para a melhor compreensão e manejo das células neurais em estados fisiológicos e patológicos.

Referências Bibliográficas

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, E. et al. Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6286, jan. 2009.

AL-CHALABI, A.; MILLER, C. C. J. Neurofilaments and neurological disease. **BioEssays**, v. 25, n. 4, p. 346–355, 2003.

AL-SHAWI, R. et al. Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development. **Dev. Genes Evol.**, v. 211, p. 161–171, 2001.

AMABLE, P. R. et al. Identification of appropriate reference genes for human mesenchymal cells during expansion and differentiation. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73792, jan. 2013.

AMREIN, I.; ISLER, K.; LIPP, H. P. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: Influence of chronological age and life history stage. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 978–987, 2011.

AN, B. et al. Non-enzymatic isolation followed by supplementation of basic fibroblast growth factor improves proliferation, clonogenic capacity and SSEA-4 expression of perivascular cells from human umbilical cord. **Cell Tissue Res**, p. 767–777, 2015.

ARAÚJO, L.; ARAÚJO, L.; TORRES, G. Impacto das variáveis sociodemográficas e de saúde na capacidade funcional de idosos de baixa renda. **Ciência Cuid. Saúde**, p. 847-854, 2015.

ARAUJO, M.; NIETO, A. The expression of chick EphA7 during segmentation of the central and peripheral nervous system. **Elsevier Science**, v. 68, p. 173–177, 1997.

ARÉVALO, J. C.; WU, S. H. Neurotrophin signaling: many exciting surprises. **Cell and Molecular Life Science**, v. 63, p. 1523–1537, 2006.

ARKING, R. **The Biology of Aging: Observations & Principles**. [s.l.: s.n.].

ARTHUR, A. et al. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. **Stem cell**, v. 26, p. 1787–1795, 2008.

BAJADA, S. et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 4, n. 7, p. 524–531, 2010.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 4, p. 568–84, abr. 2004.

BATTISTE, J. et al. Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 2, p. 285–293, 2007.

BENNETT, M. K. et al. The Syntaxin Family of Vesicular Transport Receptors. **Cell**, v. 74, p. 863–873, 1993.

BIZON, J. L.; GALLAGHER, M. More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in Long-Evans rats. **Science of aging knowledge environment** □: **SAGE KE**, n. 7, p. 1–5, 2005.

BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R.; WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: Entity or function? **Cell**, v. 105, n. 7, p. 829–841, 2001.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v. 411, p. 355–365, 2001.

CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & Development**, p. 3286–3305, 1997.

CAMPAGNOLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first- trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396–2402, 2001.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research**, v. 9, p. 641–650, 1991.

CLIFFORD, M. A. et al. EphA7 signaling guides cortical dendritic development and spine maturation. **PNAS**, v. 111, p. 3–8, 2014.

CROFT, A.; PRZYBORSKI, S. Formation of Neurons by Non-Neural Adult Stem Cells □: Potential Mechanism Implicates an Artifact of Growth in Culture. **Stem cell**, v. 44, n. 0, p. 1841–1851, 2006.

CUI, X. et al. Human umbilical cord and dental pulp-derived mesenchymal stem cells □: Biological characteristics and potential roles in vitro and in vivo. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, p. 3269–3278, 2015.

DAMASCENO, B. P. Envelhecimento cerebral: O problema dos limites entre o normal e o patológico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 1, p. 78–83, 1999.

DE BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928–1942, 2001.

DEMIR, O. et al. From Birth Till Death: Neurogenesis, Cell Cycle, and Neurodegeneration. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 292, n. 12, p. 1953–1961, dez. 2009.

DIMOS, J. T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5893, p. 1218–21, 29 ago. 2008.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

ENDO, M. et al. Ror family receptor tyrosine kinases regulate the maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. **Journal of cell science**, v. 125, n. Pt 8, p. 2017–29, 15 abr. 2012.

ENG, L. F. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): the Major Protein of Glial Intermediate Filaments in Differentiated Astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 8, p. 203–214, 1985.

FERNÁNDEZ VALLONE, V. B. et al. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? **Elsevier Science Publishers**, v. 85, n. 1-2, p. 1–10, jan. 2013.

FORRAZ, N.; MCGUCKIN, C. P. The umbilical cord: A rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. **Cell Proliferation**, v. 44, n. SUPPL. 1, p. 60–69, 2011.

FRANCO LAMBERT, A. P. et al. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? **Elsevier Science**, v. 77, n. 3, p. 221–228, mar. 2009.

FUJIMURA, J. et al. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. **Elsevier Science**, v. 333, p. 116–121, 2005.

GALLACHER, L. et al. Isolation and characterization of human CD34 - Lin - and CD34 + Lin - hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. **Blood**, v. 95, n. 9, p. 2813–2820, 2000.

- GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 440–444, 2007.
- GOEDERT, M.; CROWTHER, R. A.; GARNER, C. C. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. **Elsevier Science Publishers**, v. 14, p. 251–252, 1991.
- GOODWIN, H. S. et al. Multilineage Differentiation Activity by Cells Isolated From Umbilical Cord Blood: Expression of Bone, Fat, and Hematopoietic Lineages. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 7, p. 581–588, 2001.
- GREENBERG, D.; JIN, K. Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) and Stroke. **Cell Molecular Life Science**, v. 70, n. 10, p. 1753–1761, 2014.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Cell Biology**, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.
- HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 8, p. 341–348, 2003.
- HAUSOTT, B. et al. Signaling by neuronal tyrosine kinase receptors: relevance for development and regeneration. **Anatomical record**, v. 292, n. 12, p. 1976–85, dez. 2009.
- HAYWARD, C. J. et al. Harvesting the potential of the human umbilical cord: isolation and characterisation of four cell types for tissue engineering applications. **Cells, tissues, organs**, v. 197, n. 1, p. 37–54, jan. 2013.
- HU, L. et al. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **BioMed research international**, v. 2013, p. 438243, jan. 2013.
- HUANG, G. T.-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of dental research**, v. 88, n. 9, p. 792–806, set. 2009.
- HUBBARD, S. R.; TILL, J. H. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. **Annual Reviews Biochem.**, v. 69, p. 373–98, 2000.
- HUI, H. et al. Stem Cells: General Features and Characteristics. **Stem Cells in Clinic and Research**, p. 1–20, 2011.
- JADHAV, A. P.; ROESCH, K.; CEPKO, C. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. **National Institutes of Health**, v. 28, n. 4, p. 249–262, 2011.
-

JANZ, F. L.; ROMAO, C. M.; BYDLOWSKI, S. P. Líquido amniótico como fonte de células-tronco mesenquimais. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 15, p. 7–010, 2009.

JESSEN, K. R.; THORPE, R.; MIRSKY, R. Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein \square : an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. **Journal of Neurocytology**, v. 200, p. 187–200, 1984.

JIN, K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **PNAS**, v. 99, n. 18, p. 11946–11950, 2002.

KADAM, S. S.; BHONDE, R. R. Islet neogenesis from the constitutively nestin expressing human umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. **Islets**, v. 2, n. 2, p. 112–20, 2010.

KEEBLE, T. R.; COOPER, H. M. Ryk \square : A novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 2011–2017, 2011.

KERKIS, I. et al. Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. **Cells Tissues Organs**, v. 900, p. 105–116, 2007.

KIM, E. J. et al. Ascl1 (Mash1) Defines Cells with Long-Term Neurogenic Potential in Subgranular and Subventricular Zones in Adult Mouse Brain. **PLoS one**, v. 6, n. 3, p. 1–6, 2011.

KLIPP, E.; LIEBERMEISTER, W. Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. **BMC neuroscience**, v. 7, p. 1–16, jan. 2006.

KODE, J. A et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. **Cytotherapy**, v. 11, n. 4, p. 377–91, jan. 2009.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KOSOVSKY, M. Culture Conditions and ECM Surfaces Utilized for the Investigation of Stem Cell Differentiation. p. 1–16, 2013.

KRULL, C. E. et al. Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. **Current Biology**, v. 7, n. 8, p. 571–580, 1997.

- KWAK, N. et al. VEGF Is Major Stimulator in Model of Choroidal Neovascularization. **Investigative Ophthalmology e Visual Science.**, v. 41, n. 10, p. 3158–3164, 2000.
- LIU, Q. et al. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 24, p. 3057–3075, 2004.
- LU, P.; TUSZYNSKI, M. H. Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons? **Elsevier Science**, v. 193, p. 273–278, 2005.
- LUMELSKY, N. et al. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. **Science**, v. 292, n. May, p. 1389–1395, 2001.
- MAISONPIERRE, P. C. et al. NT-3, BDNF, and NGF in the Developing Rat Nervous System: Parallel as well as Reciprocal Patterns of Expression. **Neuron**, v. 5, p. 501–509, 1990.
- MANDELKOW, E.; MANDELKOW, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. **Current opinion in cell biology**, v. 7, n. 1, p. 72–81, 1995.
- MATSUZAKI, H. et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. **FASEB Journal**, v. 15, p. 1218–1220, 2001.
- MENDEZ-OTERO, R. et al. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 55 21, p. 99–103, 2009.
- MIAO, Z. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 30, n. 9, p. 681–687, 2006.
- MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011.
- MONTZKA, K. et al. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. **BMC neuroscience**, v. 10, p. 16, 2009.
- MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. **Stem Cell Regulatory Mechanisms**, v. 88, p. 287–298, 1997.
- MUELLER, S. M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of cellular biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 583–90, jan. 2001.
-

NEVE, R. L. et al. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. **Brain research**, v. 387, n. 3, p. 271–280, 1986.

NEWBERN, J. M. et al. Specific functions for ERK/MAPK signaling during PNS development. **Neuron**, v. 69, n. 1, p. 91–105, 13 jan. 2011.

NIRMAL, R. S.; NAIR, P. D. Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold. **European Cells and Materials**, v. 26, p. 234–251, 2013.

NISHIMOTO, S.; NISHIDA, E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. **European Molecular Biology Organization**, v. 7, n. 8, p. 782–6, ago. 2006.

PANEPUCCI, R. A et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 22, n. 7, p. 1263–78, jan. 2004.

PENG, Y. et al. Mesenchymal stem cells: A revolution in therapeutic strategies of age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 103–115, 2013.

PETERSEN, B. E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5417, p. 1168–1170, 1999.

PHINNEY, D. G. et al. Plastic Adherent Stromal Cells From the Bone Marrow of Commonly Used Strains of Inbred Mice: Variations in Yield, Growth, and Differentiation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 585, p. 570–585, 1999.

PIERCE, E. A. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 905–909, 1995.

PISCAGLIA, A. C. Stem cells, a two-edged sword: Risks and potentials of regenerative medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 27, p. 4273–4279, 2008.

RAGNI, E. et al. Adipogenic potential in human mesenchymal stem cells strictly depends on adult or foetal tissue harvest. **Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 2456–2466, 2013.

REDWINE, J. M.; EVANS, C. F. Markers of central nervous system glia and neurons in vivo during normal and pathological conditions. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 265, p. 119–140, 2002.

RIVEROS, D. M. et al. Células madre y células troncoembrionarias: diferencias biológicas. **Vet. Méx.**, v. 38, n. 443, p. 477–501, 2007.

ROBERTS, D. M. et al. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flt-1 (VEGFR-1) Modulates Flk-1 (VEGFR-2) Signaling During Blood Vessel Formation. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1531–1535, 2004.

ROCHA, A. S. et al. Considerações Sobre Células-Tronco Embrionárias. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 303–313, 2012.

SANCHEZ-RAMOS, J. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Experimental neurology**, v. 164, n. 2, p. 247–256, 2000.

SATO, T. et al. Neuregulin 1 Type II-ErbB Signaling Promotes Cell Divisions Generating Neurons from Neural Progenitor Cells in the Developing Zebrafish Brain. **PLoS Biology**, v. 10, p. 1–21, 2015.

SAÚDE, M. DA. **Índice de Envelhecimento**.

SCAHILL, R. I. et al. A Longitudinal Study of Brain Volume Changes in Normal Aging Using Serial Registered Magnetic Resonance Imaging. **Arch Neurol.**, v. 60, p. 989–994, 2003.

SCHNEIDER, I.; SCHNEIDER, F.; PLATE, K. Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2 — two unequal brothers in mind. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 1705–1725, 2013.

SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 1, p. 146–50, jan. 2008.

SECCO, M. et al. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. **Stem cell reviews**, v. 5, n. 4, p. 387–401, dez. 2009.

SHAH, G. U. L. N.; MOORADIAN, A. D. Age-related changes in the blood-brain barrier. **Elsevier Science**, v. 32, p. 501–519, 1997.

SHIMIZU, C. et al. MATH-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system. **European Journal Biochem.**, v. 229, p. 239–248, 1995.

SHIOMURA, Y.; HIROKAWA, N. Colocalization of Microtubule-associated Protein 1A and Microtubule-associated Protein 2 on Neuronal Microtubules In Situ Revealed with Double-Label Immunoelectron Microscopy. **The journal of Cell Biology**, v. 104, n. June, p. 1575–1578, 1987.

SMITH, M. D. A. C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 3–7, 1999.

SONG, H.; STEVENS, C. F.; GAGE, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature**, v. 417, p. 39–44, 2002.

SONG, J. et al. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 7, p. 1032–1043, 2012.

SPURWAY, J.; LOGAN, P.; PAK, S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. **Australasian Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 15, n. 3, p. 97–102, 2012.

STRAUB, R. H. et al. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, n. 14, p. 1591–1611, 2001.

SÜTTERLIN, P. et al. Molecular and Cellular Neuroscience The molecular basis of the cooperation between EGF , FGF and eCB receptors in the regulation of neural stem cell function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 52, p. 20–30, 2013.

TONDREAU, T. et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 8, p. 1105–12, set. 2005.

TROULINAKI, K.; TAVERNARAKIS, N. Neurodegenerative conditions associated with ageing: A molecular interplay? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 1, p. 23–33, 2005.

TROUNSON, A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. **BMC medicine**, v. 7, p. 1–5, 2009.

TUAN, R. S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. **Arthritis Research & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 32–45, 2003.

UITTENBOGAARD, M.; CHIARAMELLO, A. Expression profiling upon Nex1/MATH-2-mediated neurogenesis in PC12 cells and its implication in regeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 6, p. 1332–1343, 2004.

UITTENBOGAARD, M.; CHIARAMELLO, A. The basic helix-loop-helix transcription factor Nex-1/Math-2 promotes neuronal survival of PC12 cells by modulating the dynamic expression of anti-apoptotic and cell cycle regulators. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, n. 3, p. 585–596, 2005.

ULLOA, F. et al. Blockade of the SNARE Protein Syntaxin 1 Inhibits Glioblastoma Tumor Growth. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0119707, 2015.

VAN VRANKEN, B. E. et al. Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme: a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium. **Tissue engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1177–87, 2005.

VITORELI, E.; PESSINI, S.; SILVA, M. J. P. DA. A auto-estima de idosos e as doenças crônico-degenerativas. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, p. 102–114, 2005.

WANG, H.-S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 22, n. 7, p. 1330–7, jan. 2004a.

WANG, J.-F. et al. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. **Stem Cell Transplantation**, v. 89, p. 1–5, 2004b.

WEGNER, M. SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. **Genes and Development**, v. 25, n. 23, p. 2423–2428, 2011.

WOODBURY, D. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Journal of neuroscience research**, v. 61, n. 4, p. 364–370, 2000.

ZAMPIERI, N.; CHAO, M. V. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. **Neurotrophins**, v. 34, p. 607–611, 2006.

ZHANG, J. et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. **Cancer Biol Med**, v. 12, p. 10–22, 2015.

ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue□: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 28 de janeiro de 2014.

Senhor Pesquisador: DENISE CANTARELLI,

A Comissão Científica do IGG apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATORES TRÓFICOS E ATUAÇÃO DAS RTKS NA NEURODIFERENCIAÇÃO E NEUROGÊNESE DE CÉLULAS TRONCO ADULTAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO**".

Solicitamos que providencie os documentos necessários para o encaminhamento do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Salientamos que somente após a aprovação deste Comitê o projeto deverá ser iniciado.

Atenciosamente,

Prof. Alfredo Cataldo Neto
Coordenador Adjunto da CC/IGG

PUCRS

Campus Central
Av. Tpirança, 6690 - P. 60 - CEP: 90.610-000
Fone: (51) 3336-8153 - Fax (51) 3320-3862
E-mail: igg@pucrs.br
www.pucrs.br/igg

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE E/OU TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA:

“NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.”

A – PROPOSTA DO PROGRAMA: Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa: “Neurodiferenciação de células-tronco de cordão umbilical humano”.

B – OBJETIVOS DO PROGRAMA: Durante a gravidez, o oxigênio e nutrientes essenciais passam do sangue materno para o bebê através da placenta e do cordão umbilical. Após o parto, o sangue que permanece no cordão umbilical e na placenta é geralmente descartado assim como o cordão umbilical. Este sangue contém um grande número de células-tronco, que são células jovens, que conseguem se reproduzir. Pesquisas em andamento buscam utilizar essas células na regeneração de órgãos, como o coração e o cérebro, pois estas células podem se transformar em diversas outras células, tais como, células sanguíneas, musculares e nervosas (neurônios). A coleta ocorrerá após o nascimento do seu bebê e não afetará de nenhuma maneira o parto ou os cuidados dispensados ao seu filho. O objetivo deste trabalho é avaliar se as células-tronco de cordão umbilical humano podem transformar-se em células nervosas para o tratamento de doenças neurológicas de diversas ordens. Com a sua permissão, o sangue do cordão umbilical de seu filho assim como o tecido do cordão umbilical poderá ser usado para os objetivos citados anteriormente. O sangue do cordão umbilical de seu filho não será usado para doação para pacientes que precisam de transplante, será apenas para pesquisa.

C – RISCOS E DESCONFORTOS ESPERADOS: Não existe qualquer tipo de risco ou desconforto para você ou para o seu bebê na participação do programa. O sangue coletado da placenta e o tecido do cordão umbilical não são necessários para o seu bebê após o nascimento, uma vez que este material seria descartado. Todas as informações coletadas serão mantidas confidenciais. Nem você e nem o seu bebê serão identificados em qualquer publicação dos dados.

D – BENEFÍCIOS: O único benefício em participar deste programa é que, doando o sangue da placenta de seu bebê ou o tecido do cordão umbilical para a pesquisa, você poderá ajudar-nos a conhecer o tratamento de lesões no cérebro com o uso de células-tronco de cordão umbilical.

E – CUSTOS: Não haverá, para o participante, nenhum custo com a realização da pesquisa proposta. Caso você decida não participar do programa, não sofrerá nenhum prejuízo no atendimento dispensado a você e a seu filho. A decisão de não participar do programa não irá afetar o seu atendimento no hospital.

F – TERMO DE PARTICIPAÇÃO: Assuntos de importância para você serão esclarecidos antes do consentimento ser assinado. Você e seu bebê não sofrerão nenhum prejuízo em seu atendimento no hospital caso não queira participar da pesquisa. Para dúvidas ou esclarecimentos, a senhora poderá entrar em contato com a pesquisadora Rachel Dias Molina pelo telefone 51 84309004 ou pelo email rachelmolina16@hotmail.com ou através do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS pelo telefone 3320 3345.

G – ALTERNATIVAS PARA PARTICIPAÇÃO: Você pode decidir não doar o sangue da placenta de seu filho ou o tecido do cordão umbilical para o projeto. Caso decida não participar do programa, o sangue da placenta ou o tecido não será coletado, será desprezado, não sendo utilizado na pesquisa.

CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE E/OU TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL

Declaro que li as informações anteriormente descritas a respeito do projeto de pesquisa “Neurodiferenciação de células-tronco de cordão umbilical humano” e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aceito participar da doação de sangue e/ou tecido do cordão umbilical para o projeto proposto, com o objetivo de pesquisa, não sendo usado para doação. Este material poderá ser depositado, armazenado e utilizado durante o prazo de vigência do projeto.

Nome da Mãe

Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Mãe

Data

ANEXO 3 - TABELA COM VALORES DE “p”

Tabela 1. Valores de p obtidos nas comparações das culturas da amostra 1.

Proteína	MSCs – NI*	MSCs – ND*	NI – ND
Erb B2	0,0074	0,0120	0,1306
Erb B3	0,0009	0,0005	0,0565
FGF R2	0,0040	0,0147	0,1662
RYK	0,0134	0,0116	0,5528
ROR 1	0,0213	0,0061	0,0916
ROR 2	0,0076	0,0029	0,0021
Trk A	0,0069	0,0014	0,7603
Trk B	0,0005	0,0050	0,0028
VEGF R1	0,0150	0,0099	0,5636
VEGF R2	0,0019	0,0016	0,1679
Eph A6	0,0044	0,0004	0,6970
Eph A7	0,0001	0,0007	0,0365

Células tronco mesenquimais:MSCs; neuroinduzidas:NI;neurodiferenciadas:ND.

Tabela 2. Valores de p obtidos nas comparações das culturas da amostra 2.

Proteína	NI* – ND*
Erb B2	0,0171
Erb B3	0,0476
FGF R2	0,5528
RYK	0,0359
ROR 1	0,0164
ROR 2	0,0028
Trk A	0,0172
Trk B	0,2366
VEGF R1	0,0507
VEGF R2	0,0423
Eph A6	0,0803
Eph A7	0,0195

Células neuroinduzidas:NI; neurodiferenciadas: ND.

Tabela 3. Valores de p obtidos nas comparações das culturas da amostra 3.

Proteína	MSCs – NI*	MSCs – ND*	NI – ND
Erb B2	0,0505	0,4134	0,0392
Erb B3	0,2155	0,1679	0,0465
FGF R2	0,6855	0,1215	0,2285
RYK	0,0120	0,7224	0,1401
ROR 1	0,0229	0,0128	0,4768
ROR 2	0,3290	0,0260	0,3118
Trk A	0,0007	0,5582	0,0278
Trk B	0,0629	0,2482	0,0218
VEGF R1	0,1486	0,4930	0,0454
VEGF R2	0,4506	0,0695	0,0615
Eph A6	0,0442	0,6335	0,2450
Eph A7	0,0104	0,0465	0,0049

Células tronco mesenquimais:MSCs; neuroinduzidas:NI; neurodiferenciadas: ND.

Tabela 4. Valores de p obtidos nas comparações entre as amostras 1 e 3 das culturas mesenquimais.

Proteína	Valor de p
Erb B2	0,6731
Erb B3	0,9494
FGF R2	0,9463
RYK	0,8075
ROR 1	0,7965
ROR 2	0,9707
Trk A	0,9998
Trk B	0,9975
VEGF R1	0,5802
VEGF R2	0,8897
Eph A6	0,9234
Eph A7	0,9788

Tabela 5. Valores de p obtidos nas comparações entre as amostras 1, 2 e 3 das culturas neuroinduzidas.

Proteína	Valor de p
Erb B2	0,1643
Erb B3	0,3207
FGF R2	0,0167
RYK	0,0602
ROR 1	0,2248
ROR 2	0,0013
Trk A	0,0171
Trk B	0,0001
VEGF R1	0,0346
VEGF R2	0,6495
Eph A6	0,3468
Eph A7	0,0001

Tabela 6. Valores de p obtidos nas comparações entre as amostras 1 e 3 das culturas mesenquimais.

Proteína	Valor de p
Erb B2	0,0105
Erb B3	0,0042
FGF R2	0,2513
RYK	0,0538
ROR 1	0,0003
ROR 2	0,0002
Trk A	0,0032
Trk B	0,0190
VEGF R1	0,0277
VEGF R2	0,0017
Eph A6	0,0240
Eph A7	0,0006
