

Lista de Abreviaturas

- 6-OHDA** 6-Hidroxidopamina
- BDNF** Factor Neurotrófico Derivado de Cérebro
- BHE** Barreira Hematoencefálica
- CL** Corpos de Lewy
- CO₂** Dióxido de Carbono
- COMT** Catecol-O-metiltransferase
- DA** Doença de Alzheimer
- DP** Doença de Parkinson
- DTT** Ditionitrito
- EM** Esclerose Múltipla
- ES** Células Estaminais Embrionárias
- FBS** Soro Fetal Bovino
- G-CSF** Factores Estimuladores de Colónia de Granulócitos
- GDNF** Factor Neurotrófico Derivado de uma Linha de Células da Glia
- GFAP** Proteína Ácida Fibrilar Glial
- GM-CSF** Factores Estimuladores de Colónia de Macrófagos/Granulócitos
- GPX** Glutationa Peroxidase
- HUCPVCs** Células Perivasculares do Cordão Umbilical Humano
- IFN** Interferão
- IL** Interleucina
- IP** Proteína Induzível Por IFN
- LDH** Lactato Desidrogenase
- MAO-B** Monoamina Oxidase-B
- MCA** Meio Condicionado por Astrócitos
- MCP** Proteína Quimioattractante de Monócitos
- M-CSF** Factores Estimuladores de Colónia de Macrófago
- MEM** Meio Mínimo Essencial
- MFB** feixe prosencefálico medial
- MNB** Meio Neurobasal
- MPP⁺** 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MSA Atrofia de Sistemas Múltiplos
MSCs Células Estaminais Mesênquimais
MTT Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NGF Factor de Crescimento Neuronal
NO Óxido Nítrico
NSCs Células Estaminais Neuronais
O₂⁻ Anião Superóxido
ONOO⁻ Anião Peroxinitrito
PBS Tampão Fosfato Salino
PVDF Diflurido Polivildieno
ROS Espécies Reactivas de Oxigénio
NOS Espécies Reactivas de Nitrogénio
r.p.m. rotações por minuto
SEM Erro Padrão da Média
SDS Dodecilsulfato de sódio
SN *Substantia nigra*
SNC Sistema nervoso central
SNpc *Substantia nigra pars compacta*
TGF Factor de crescimento transformador
TH Tirosina Hidroxilase
TNF Factor de necrose tumoral
UCMS Células Estaminais da Matriz do Cordão Umbilical
NT Neurotrofina
NGF Factor de crescimento neuronal

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é causada por uma progressiva e selectiva perda de neurónios dopaminérgicos mesencefálicos da via nigroestriatal. Para além da perda de neurónios dopaminérgicos, inclusões proteicas intraneurais citoplasmáticas denominadas por “Corpos de Lewy”, contendo α -sinucleína e ubiquitina, são também características desta patologia. Os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelo desenvolvimento da DP não se encontram totalmente compreendidos. Estudos anteriores sugeriram, que os astrócitos exercem um efeito neuroprotector na DP, nomeadamente na protecção dos neurónios dopaminérgicos da toxicidade exercida pela 6OHDA. Os astrócitos secretam vários factores neurotróficos que estão envolvidos na sobrevivência neuronal quer durante o desenvolvimento quer após lesões cerebrais. Por outro lado, tem havido tentativas de aplicar a terapia com células estaminais em várias doenças neurodegenerativas, como por exemplo a DP. Pensa-se que um dos possíveis mecanismos envolvidos na acção destas células envolve a libertação de citocinas, factores de crescimento e moléculas neuroreguladoras. Com base nestes dados neste trabalho propusemos comparar o efeito neuroprotector exercido por meios condicionados por astrócitos e por células estaminais do cordão umbilical humano, em lesões dopaminérgicas promovidas por exposição à toxina 6OHDA ou pela remoção de soro do meio de cultura.

Com o objectivo de avaliar a capacidade neuroprotectora do meio condicionado por astrócitos, incubaram-se as células da linha celular N27 com meios de cultura expostos aos astrócitos durante diferentes períodos de tempo, 24, 48 e 72 horas, sendo de seguida adicionado ao mesmo meio a toxina 6OHDA durante mais 24h. Este ensaio permitiu constatar que o meio condicionado por astrócitos durante 24 a 72 horas não exerceu qualquer tipo de protecção relativamente à lesão causada por 6OHDA, na linha celular N27. Porém, em culturas primárias de neurónios do mesencéfalo ventral os meios condicionados pelos astrócitos durante 24 a 96 horas foram eficazes em proteger as células da lesão promovida pela 6OHDA. Os meios condicionados por astrócitos foram ainda capazes de proteger os neurónios dopaminérgicos de um outro tipo de lesão, a remoção do soro do meio de cultura das células N27. Numa tentativa de identificar os mediadores responsáveis pela protecção exercida pelos meios condicionados procedemos ao fraccionamento do meio condicionado (sem soro) tendo

os resultados obtidos mostraram que os componentes do MCA com acção neuroprotectora contra os efeitos provocados pela ausência de soro, têm um peso molecular inferior a 10 KDa. Por último, analisámos a capacidade protectora de meios condicionado por células perivasculares do cordão umbilical em proteger as células N27 da lesão induzida por remoção do soro do meio de cultura.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que o meio condicionado por astrócitos possui maior capacidade neuroprotectora que o meio condicionado por células perivasculares do cordão umbilical. Alguns dos factores presentes no meio condicionado de astrócitos poderão, no futuro, ser identificados e ser utilizados como moléculas protectoras na terapia de doenças neurodegenerativas, como a DP.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is caused by the progressive and selective loss of mesencephalic dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway. Besides the loss of dopaminergic neurons, intraneuronal proteinaceous cytoplasmic inclusions known as "Lewy Bodies", containing α -synuclein and ubiquitin, are also characteristic of PD. The molecular and cellular mechanisms responsible for the development of PD are not fully understood. Previous studies suggested that astrocytes have a neuroprotective effect in PD, particularly in the protection of dopaminergic neurons from the toxicity exerted by 6OHDA. Astrocytes secrete various neurotrophic factors that are involved in neuronal survival either during the development or after brain damage. Moreover, the stem cell therapy has been applied in several neurodegenerative diseases, such as in PD and it is thought that one possible mechanism involved in the neuroprotection mediated by these cells is the release of cytokines, growth factors and neuroregulatory molecules. Therefore, the purpose of this study was to compare the neuroprotective effect exerted by media conditioned by astrocytes and by stem cells from human umbilical cord, in the dopaminergic lesions promoted by exposure to the toxin 6OHDA or by removal of serum from the culture media.

In order to evaluate the neuroprotective capacity of media conditioned by astrocytes, N27 cells were incubated, with media obtained after different periods of conditioning: 24, 48 and 72 hours and then treated with 6OHDA. The results obtained showed that the media conditioned by astrocytes for 24 to 72 hours did not exert any protection from the injury caused by 6OHDA, in the N27 cell line. However, exposure of primary cultures of neurons of the *substantia nigra* to media conditioned by astrocytes from 24-96 hours protected the cells from the injury promoted by 6OHDA. Although astrocyte conditioned was unable to protect N27 from the 6OHDA lesion, it was capable of inhibiting N27 cell damage promoted by a different stimulus, the removal of serum from the culture media. Fractionation of the astrocyte conditioned media showed that the components with neuroprotective capabilities against the effects caused by the absence of serum possess a molecular weight below 10 KDa. Lastly, incubation of the N27 cell line with media conditioned by perivascular cells from the umbilical cord did not confer any protection for the removal of serum from the media.

Taken together, the results obtained in this study showed that the media

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

conditioned by astrocytes have a bigger neuroprotective capacity to protect dopaminergic cells than media conditioned by umbilical cord perivascular cells. Some of the factors present in media conditioned by astrocytes may in future be identified and used as protective molecules in the therapy of neurodegenerative diseases such as PD

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

Capítulo I

1. Introdução

1.1 Doença de Parkinson

Descrita pela primeira vez por James Parkinson, a doença de Parkinson (DP) é causada por uma progressiva e selectiva perda de neurónios dopaminérgicos mesencefálicos da via nigroestriatal (Yi Wang, 2007; Deumens et al, 2002). Para além da perda de neurónios dopaminérgicos, inclusões proteicas intraneurais citoplasmáticas denominadas por “Corpos de Lewy” (CL), contendo α -sinucleína e ubiquitina, são também características desta patologia. (Figura 1) (Spillantini et al., 1997; Matsuzaki et al., 2004). A degeneração selectiva dos neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) provoca os sintomas mais importantes da DP, mas há muitas vezes neurodegeneração generalizada e formação de CL em outras regiões do cérebro, dependendo da fase da doença (Braak et al., 2003; Braak e Del Tredici, 2009). Apesar de intensa investigação, a causa da perda neuronal nesta doença e o papel dos CL não são totalmente conhecidos (Mcgeer et al, 2004).

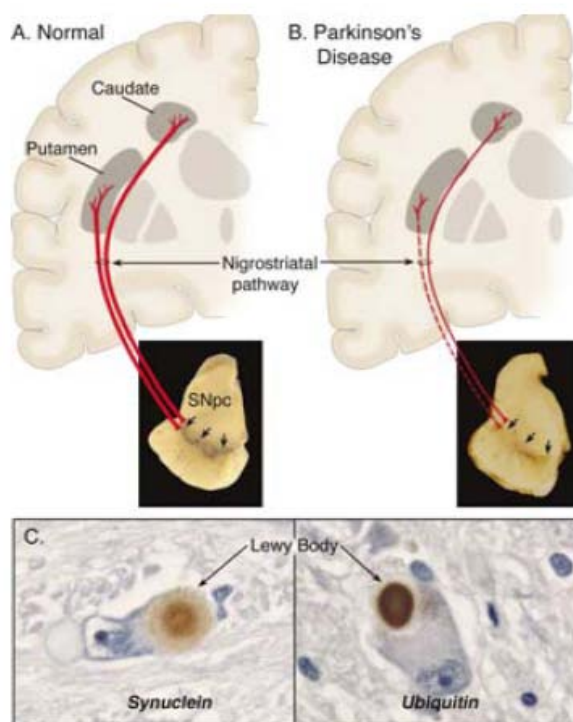


Figura 1 – Características neuropatológicas da DP. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal (linhas contínuas a vermelho). A fotografia mostra a pigmentação normal da SNpc, devido há neuromelanina nos neurónios dopaminérgicos. (B) Representação

esquemática da via nigroestriatal na DP (linhas descontinuas a vermelho). A fotografia mostra a perda da pigmentação, devido à acentuada perda de neurónios dopaminérgicos. (C) Imunohistoquímica de CL na SNpc revelando a presença de α -sinucleína e ubiquitina (Dauer e Przedborski, 2003).

Epidemiologicamente, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum nos idosos, a seguir à doença de Alzheimer, com uma prevalência de cerca de 360 por 100000 e uma incidência de 18 por 100000, sendo responsável por 80% dos parkinsonismos. Relativamente à etiopatologia, embora ainda seja desconhecida, actualmente a hipótese mais aceite, é de que a DP é uma doença multifactorial com determinantes genéticos, ambientais e/ou relacionados com o envelhecimento (Shannon, 2004; Deumens et al, 2002). Vários estudos sugerem que uma disfunção da função mitocondrial, stress oxidativo, processos neuroinflamatórios, diminuição da função proteossómica e agregação de proteínas podem explicar a perda de neurónios na SNpc (Thomas, 2009).

Os sintomas característicos desta doença incluem tremor, bradicinésia (dificuldade em iniciar e realizar um novo movimento), rigidez e instabilidade postural (Wang et al., 2007). Em casos extremos, os indivíduos sofrem ainda demência com uma diminuição da memória e pensamentos abstractos (Deumens et al, 2002). Antes dos sintomas da DP aparecerem, restam apenas 50-60 % dos neurónios da *substantia nigra* (SN) e cerca 20% da enervação dopaminérgica no *putamen*. O que leva a que muitas vezes, o diagnóstico de DP só possa ser feito quando o indivíduo já tem a doença há algum tempo. As terapias mais frequentemente aplicadas actualmente centram-se no tratamento médico e cirúrgico para o controlo dos sintomas. Terapias farmacológicas tais como levodopa (L-DOPA), agonistas da dopamina e inibidores da monoamina oxidase-B (MAO-B) são efectivas nas fases iniciais da doença (Wang et al., 2007). A eficácia da levodopa pode ser reforçada com a co-administração de compostos que inibem de alguma forma a sua metabolização. Inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT), reduzem a metilação no intestino, aumentando a absorção da levodopa, prolongando a sua meia-vida e, desta forma, aumentando a duração da acção de cada dose (Nutt et al., 1994). Fármacos que inibem a MAO-B, a enzima responsável pela degradação da dopamina podem também aumentar a semi-vida da levodopa (Rabey et al., 2000). Além da levodopa, a droga mais poderosa usada para tratar sintomas da DP

são agonistas da dopamina, que actuam inicialmente, estimulando alguns dos receptores de dopamina. No entanto, os receptores da dopamina podem tornar-se progressivamente menos sensíveis, diminuindo a eficácia desta terapia (Schapira, 2005). As estratégias terapêuticas futuras necessitam de se focar não só no melhoramento dos sintomas da DP mas também na protecção ou diminuição da degeneração dos neurónios, de forma a tornar mais lenta a progressão da doença (Wang et al., 2007).

1.2 Modelos experimentais da 6OHDA

Actualmente estão disponíveis modelos animais da DP que têm contribuído para compreender a patogénese e progressão da doença humana. Os químicos que são mais frequentemente usados para induzir parkinsonismo em modelos animais são a 6-hidroxi-dopamina (6OHDA) e 1-metil-4-fenil-1-2-3-6-tetrahidropiridina (MPTP) (Schober, 2004). A lesão selectiva dos neurónios dopaminérgicos pode ser alcançada pela administração da neurotoxina 6OHDA. Foi a primeira toxina catecolaminérgica a ser descoberta, e continua a ser uma das melhor caracterizadas. Foi usada para induzir o primeiro modelo animal a estar associado com a morte de neurónios dopaminérgicos na SNpc (Nass e Przedborski, 2008). Desde então a 6OHDA foi amplamente utilizada em estudos *in vitro* e *in vivo*. Esta toxina é um análogo hidroxilado do neurotransmissor natural dopamina. A 6OHDA é transportada para dentro do corpo celular e fibras dos neurónios dopaminérgicos e neurónios noradrenérgicos. Esta leva à degeneração dos terminais nervosos e pode também afectar os corpos celulares. O poder neurotóxico desta molécula baseia-se no potente efeito inibitório que exerce sobre as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (complexos da cadeia I e IV). Devido ao défice metabólico causado pelo bloqueio destas enzimas, os neurónios deixam de poder exercer as suas funções fisiológicas normais e conseqüentemente morrem (Deumens et al., 2002).

Têm sido desenvolvidos vários modelos da doença de Parkinson em ratos, que incluem a administração de 6OHDA directamente na *substantia nigra* (SN), no feixe prosencefálico medial (MFB), ou no estriado, uma vez que a 6OHDA não pode atravessar a barreira hemato-encefálica. A administração directa na SN e MFB resulta na rápida (cerca de 24 horas) e irreversível perda de neurónios dopaminérgicos

marcados para a tirosina hidroxilase (TH) na SN (Na et al., 2010; Javoy et al., 1976; Bove et al., 2005; Ungerstedt, 1968; Perese et al., 1989). Enquanto que a injeção de 6OHDA no estriado leva a uma degeneração mais lenta durante semanas (Nass e Przedborski, 2008). Depois da injeção na *substantia nigra*, as toxinas são selectivamente acumuladas nos neurónios dopaminérgicos. O metabolismo intracelular da 6OHDA, resulta na produção de radicais livres, peróxido de hidrogénio e na consequente destruição dos neurónios devido ao stress oxidativo (Berger et al., 1991). O modelo da 6OHDA não mimetiza todas as características clínicas e patológicas da DP. A 6OHDA não leva à produção de CL na SN e não afecta outras áreas do cérebro envolvidas na DP (Hefti et al., 1980, Betarbet et al., 2002). Apesar disto, o modelo de rato de 6OHDA unilateral tem sido e continua a ser, uma das experiências mais importantes no que concerne a testes pré-clínicos de novas terapias (Del Tredici et al., 2002).

1.3 Astrócitos

No sistema nervoso central (SNC), as células da glia são compostas por astrócitos, oligodendrócitos e microglia. Os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização e não têm qualquer implicação na DP, mas sim noutras doenças como a atrofia de sistemas múltiplos (MSA). O papel da microglia é relativamente desconhecido. Após uma lesão, infecção ou doença, os astrócitos e a microglia são mobilizados e ambos são capazes de responder e participar no processo patológico.

Os astrócitos constituem cerca de 50 % das células cerebrais (Henning et al., 2008). Têm pequenos corpos celulares com ramificações que se estendem em todas as direcções (figura 2), algumas das quais contactam e envolvem paredes vasculares locais, o que auxilia na formação de um importante componente do cérebro, a barreira hematoencefálica (BHE). Para além disso, os astrócitos

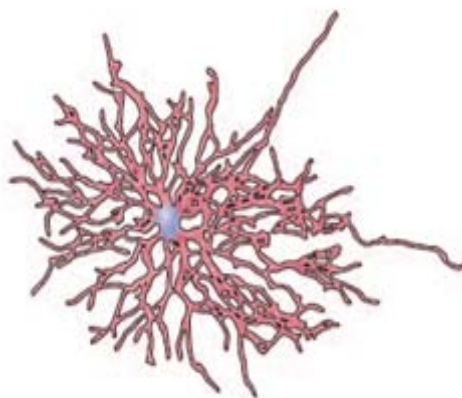


Figura 2: Representação de um astrócito (adaptado de Neuroscience, 2004).

estão também envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e acoplamento neurovascular, assim como no suporte de mecanismos de defesa imunitários através da produção de várias citocinas imunoactivas (Kim et al., 2006; Koehler et al., 2006; Snell, 2001). Os astrócitos apoiam os neurónios quer fisicamente, formando uma matriz celular, quer fisiologicamente, proporcionando aos neurónios um micro-ambiente estável e factores de crescimento (Henning et al., 2008). Os astrócitos são ainda importantes na manutenção da concentração de potássio extracelular e regulam a actividade sináptica através da captação de neurotransmissores da fenda sináptica (Teismann e Shulz, 2004). As membranas contêm vários receptores e transportadores de neurotransmissores e estão equipadas para regular a formação, estabilidade e eficácia das sinapses. Tem-se demonstrado, que em várias doenças neurodegenerativas e neurológicas os astrócitos estão disfuncionais (Henning et al., 2008). A disfunção é muitas vezes acompanhada por hipertrofia dos astrócitos, proliferação, extensão das ramificações e um aumento do número de processos mediados pelos astrócitos, denominado astrogliose. Em simultâneo com a astrogliose existe um aumento da síntese da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Várias evidências sugerem que estas células estão envolvidas em funções neuroprotectoras e neurodegenerativas sendo as funções destas células pouco definidas (Liberto et al., 2004; Sofroniew, 2005). Por um lado, está descrito que estes astrócitos reactivos aumentam os danos teciduais através da libertação de citocinas pró-inflamatórias e metabolitos de ácido araquidónico, óxido nítrico (NO) e espécies reactivas de oxigénio (ROS), que podem afectar adversamente a sobrevivência celular após danos no SNC (Dayton e Major, 1996). Por outro lado, estudos anteriores também sugeriram que os astrócitos conseguem proteger os neurónios contra danos induzidos por espécies reactivas de oxigénio (ROS) e nitrogénio (RNS), através da secreção de factores solúveis e insolúveis, podendo também, indirectamente, regular os danos neuronais pela modulação da inflamação através da diminuição da expressão de mediadores inflamatórios microgliais (figura 3) (Tanaka et al., 1999; Vincent et al., 1996; Vincent et al., 1997; Aloisi et al., 1997; Pyo et al., 2003; Chen et al., 2005).

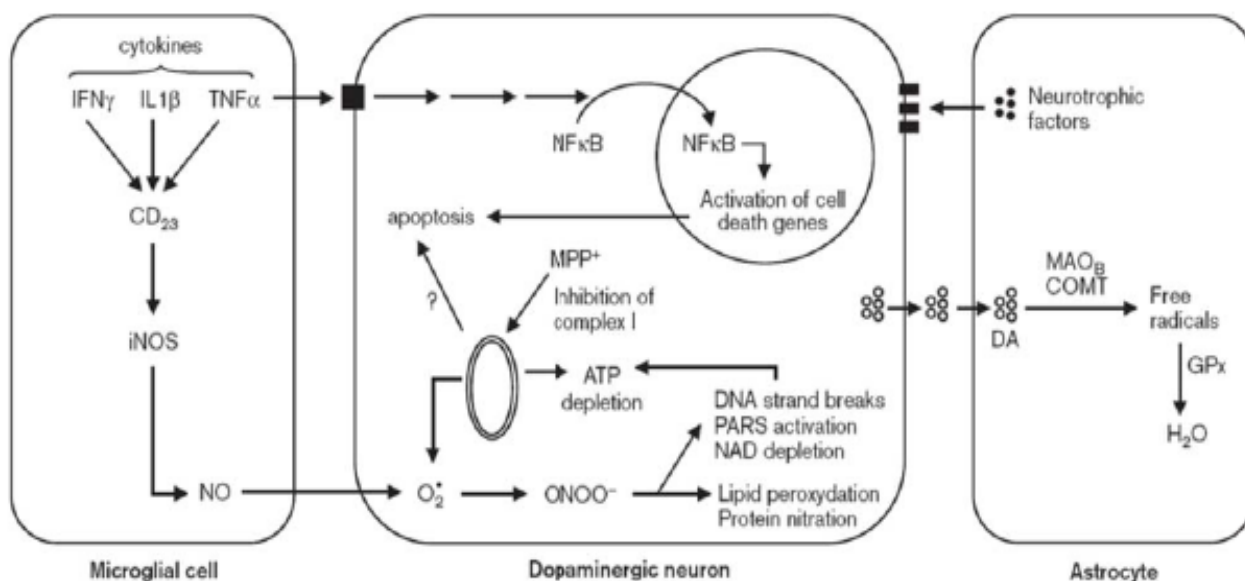


Figura 3: Possível envolvimento das células gliais na DP. As células activadas da microglia podem contribuir para a degeneração dos neurónios dopaminérgicos, devido à libertação de compostos citotóxicos como citocinas, as quais podem induzir a apoptose ou a formação de óxido nítrico (NO). O ião superóxido presente nos neurónios dopaminérgicos pode reagir com o NO formando o ião peroxinitrito (ONOO⁻), o qual pode causar danos lipídicos, danos ao nível das proteínas e ainda danos ao nível do DNA. Os astrócitos podem exercer um efeito neuroprotector nos neurónios dopaminérgicos, através da produção de factores neurotróficos, como o GDNF, ou através da metabolização da dopamina pela monoamina oxidase-B (MAO-B) e catecol-O-metil-transferase (COMT). Os astrócitos podem também eliminar, através da glutatona peroxidase (GPX) os radicais livres (Vila et al., 2001).

1.3.1 Função dos Astrócitos na Doença de Parkinson e no modelo experimental da 6OHDA

A quantidade de astrócitos GFAP positivos está inversamente relacionada com a quantidade de neurónios dopaminérgicos mortos, sugerindo que numa área com poucos astrócitos, os neurónios dopaminérgicos estão mais susceptíveis à degeneração (Teismann e Schulz, 2004). Nomeadamente, a área mais afectada na DP é a SNpc, dado que a densidade de astrócitos é baixa, enquanto que por exemplo, a área tegmental

ventral possui uma maior densidade de astrócitos, e é menos afectada. Foi observada, uma diminuição de 30 % na densidade celular astrogliar da SN em tecidos pós-morte de doentes com DP (Hirsch e Hunot, 2009). A quantidade de astrócitos com marcação para a α -sinucleína está relacionada com a extensão da morte celular na DP. Os astrócitos respondem particularmente a citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-1 β e TNF- α e acredita-se que estas citocinas participam na activação dos astrócitos após lesão do SNC (Teismann e Schulz, 2004).

O efeito neuroprotector dos astrócitos activados na DP foi corroborado através dos resultados obtidos em modelos experimentais da DP. No modelo da 6OHDA, após injeção estereotáxica de 6OHDA no feixe nigroestriatal em ratos, foi detectado um aumento da proteína GFAP imunorreactiva no estriado logo após 24 horas, com um máximo no 4º dia e a qual permaneceu durante 1 mês após a injeção. A infusão estereotáxica de IL-1 β na SN de ratos levou a um aumento da acção de astrócitos enquanto que os neurónios dopaminérgicos da SNpc foram protegidos da toxicidade da 6OHDA. Também se demonstrou que os astrócitos aumentaram a sobrevivência e a expressão fenotípica de neurónios mesencefálicos em culturas, ao diminuir a morte por apoptose desses neurónios. Outra via pela qual os astrócitos podem proteger neurónios dopaminérgicos é através da captura de compostos tóxicos libertados durante a morte neuronal. A dopamina pode levar à produção de níveis elevados de ROS e os astrócitos, uma vez que expressam MAO-B e COMT, podem reduzir o stress oxidativo através da metabolização da dopamina. Por outro lado, os astrócitos são capazes de reduzir a neurotoxicidade gerada pelo NO, através de um mecanismo dependente da enzima glutatona. Em suma, estes resultados apoiam a ideia de que os astrócitos têm um papel neuroprotector na DP e que estes podem ter uma função de neutralização da acção tóxica da microglia (Teismann e Schulz, 2004; Henning et al., 2008; Giulian et al., 1993).

1.3.2 Factores Libertados pelos Astrócitos

Os astrócitos produzem diferentes citocinas e quimiocinas no SNC normal. Contudo uma expressão anómala destes factores ocorre em situações de doença, tais como na doença de Alzheimer (DA), na esclerose múltipla (EM), na DP e situações onde há danos cerebrais. Estudos *in vitro* e *in vivo* referiram a capacidade dos astrócitos em produzirem IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IFN- α e IFN- β , TNF- α e TGF- β , factores estimuladores de colónia de granulócitos (G-CSF), GM-CSF, M-CSF e quimiocinas incluindo a IL-8, MCP-1 e IP-10. Assim, os astrócitos desempenham um papel importante no tipo e extensão das respostas imunitárias e inflamatórias do SNC, devido ao facto de serem potentes fontes de citocinas e quimiocinas imunologicamente importantes (Dong e Benveniste, 2001).

Os astrócitos secretam também vários factores solúveis conhecidos como factores neurotróficos, como por exemplo: o GDNF, o BDNF, o NFG, a NT-3, a NT-4/5 e a NT-6 (Seth e Koul, 2008; Hefti, 1997). Nomeadamente, o GDNF e o BDNF parecem promover a sobrevivência dos neurónios mesencefálicos contra a degeneração induzida por várias toxinas, como o MPTP e 6OHDA, assegurando a sobrevivência destes neurónios em modelos animais da DP (Siegel e Chauhan, 2000). A acção dos factores neurotróficos na sobrevivência neuronal ocorre quer durante o desenvolvimento, quer após lesões cerebrais, assim como, estes parecem também modular a plasticidade neuronal que ocorre durante o envelhecimento e sob condições degenerativas (Thoenen, 1995; Lindvall et al., 1994; Tucker et al., 2001; Siegel e Chauhan, 2000). Várias evidências sugerem que alterações na expressão de factores neurotróficos podem contribuir para a neurodegeneração. De facto, neurónios que não recebem factores neurotróficos em quantidades suficientes entram num processo apoptótico (Thoenen et al., 1987).

1.4 Células Estaminais

As células estaminais são células indiferenciadas, sem características específicas de um tecido maduro e capazes de proliferar para se auto-reproduzirem. Elas podem dar origem a outras células progenitoras, ou podem diferenciar-se em um ou mais tipos de células, em resposta a estímulos adequados. Propriedades essenciais das células estaminais, nomeadamente, a auto-renovação e a multipotencialidade, têm feito destas células uma fonte alternativa muito atraente de células para transplante neuronal. A transplantação/ injeção de células estaminais/ progenitoras tem surgido como outra estratégia para a reparação da função após a perda neuronal (Salgado et al., 2009). A terapia com células estaminais tem sido aplicada em várias doenças neurodegenerativas, como por exemplo na DP e doença de Alzheimer (DA) (Hou e Hong, 2008). Este tipo de células é tipicamente classificado de acordo com a sua origem. Assim sendo, existem três grupos comumente usados no tratamento da DP: células estaminais embrionárias (ES), células estaminais neuronais (NSCs) e células estaminais mesênquimais (MSCs), como é possível ver na figura 4 (Wang et al., 2007).

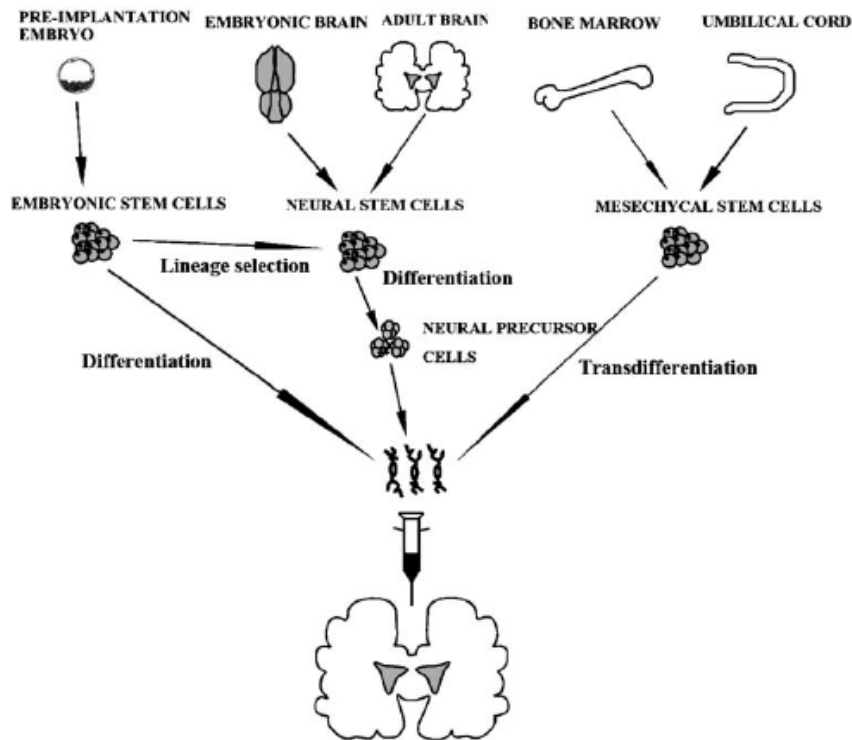


Figura 4: Fontes alternativas de células estaminais para transplantação na DP (Wang et al., 2007).

As células ES são células pluripotentes que podem dar origem a todos os tipos de células. Estas após diferenciação para células estaminais neuronais (NSCs) e/ou células progenitoras neuronais, podem ser utilizadas para transplante. As NSCs e MSCs pertencem às células estaminais somáticas que podem transformar-se em neurónios maduros no sistema nervoso central (SNC) adulto. As NSCs isoladas a partir de embriões ou cérebros adultos estão limitadas à regeneração de linhas celulares do sistema nervoso e têm menor potencial de propagação que as ES. As MSCs da medula óssea e do cordão umbilical, são capazes de se diferenciar ao longo de varias linhagens, incluindo células neuronais e têm uma significativa capacidade de proliferação. As MSCs são abundantes, seguras e o seu uso é eticamente aceitável como fonte de células estaminais (Wang et al., 2007). Vários investigadores têm mostrado que as MSCs se podem diferenciar em células dopaminérgicas através de sinais extrínsecos no meio ou por manipulação genética. MSCs manipuladas têm demonstrado ser benéficas quando transplantadas para modelos experimentais da doença de Parkinson, tornando-se candidatas a substituir neurónios dopaminérgicos em doentes com a doença de Parkinson (Sadan et al., 2009). Outras fontes de células estaminais podem ser as células germinativas embrionárias e as células estaminais derivadas do líquido amniótico, que são consideradas ambas como células estaminais multipotentes (Pan et al., 2005)

1.4.1 Células Estaminais Mesênquimais

Diversos estudos têm avaliado o impacto das células estaminais / progenitoras mesênquimais isoladas a partir da medula óssea e do tecido adiposo em doenças relacionadas com o SNC. Curiosamente, a administração destas células mostrou promover a sobrevivência e regeneração neuronal, estimulando também a proliferação e diferenciação de células residentes, limitando deste modo, a extensão da lesão neurológica (Salgado et al., 2009). Ao contrário de outras células estaminais, as MSCs são capazes de migrar para repararem células e tecidos doentes (Wang et al., 2007).

O cordão umbilical tem surgido como uma fonte viável de células estaminais hematopoiéticas para transplantação e contém um décimo do número de células

estaminais encontradas na medula óssea (Wang et al., 2007). As células estaminais hematopoiéticas CD133⁺ do cordão umbilical, podem transdiferenciar-se em células neuronais, astrócitos e oligodendrócitos depois do tratamento com ácido retinóico (Jang et al., 2004). Células estaminais somáticas humanas derivadas do cordão umbilical podem diferenciar-se em células com características neuronais, em meio sem soro, as quais expressam transcritos de genes associados com o desenvolvimento e/ou sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos (Wang et al., 2007). As células estaminais derivadas a partir da matriz da geleia de *Wharton* do cordão umbilical humano, chamadas de células estaminais da matriz do cordão umbilical (UCMS) são outra fonte de MSCs. Demonstrou-se que esta população de células é muito importante no tratamento de doenças neurodegenerativas, nomeadamente da doença de Parkinson. De facto, a injeção destas células em animais, nos quais foi induzida a doença de Parkinson, desencadeou uma melhoria do comportamento e aumento do número de neurónios marcados para TH. Hirko et al. também demonstrou que as células UCMS são capazes de modular a reacção inflamatória dentro do cérebro, após isquémia global, revelando um papel neuroprotector no SNC. Contudo, pouco se conhece sobre os mecanismos subjacentes à interacção entre as células estaminais derivadas do cordão umbilical e as células neuronais e gliais residentes. Embora se tenha descrito que estas células se diferenciam para a linhagem neuronal, é mais provável que, à semelhança do que tem sido referido para as células estaminais da medula óssea, estes efeitos sejam mediados pela libertação de citocinas e factores de crescimento (Salgado et al., 2009).

1.5 Linha celular N27

A linha celular 1RB3AN27 (N27), são clones imortalizados que derivam de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo fetal de rato. É uma população homogénea de células neuronais maioritariamente TH positivas, que expressam o transportador de dopamina e a maioria das enzimas para a síntese e metabolismo da dopamina. Produzem também ácido homovanílico, que é um metabolito da dopamina e possuem organelos celulares (incluindo mitocôndrias) mais desenvolvidos do que em outras em linhas celulares (Prasad et al., 1994; Chen et al., 2008). Depois da diferenciação, as células

N27 adquirem características morfológicas e funcionais de neurónios dopaminérgicos pós-mitóticos, como alargamento do corpo celular, aumento da expressão de TH e transportadores de dopamina e aumento da produção de dopamina. Estudos demonstraram que estas células diferenciadas são ainda mais vulneráveis à neurotoxicidade induzida pela 6OHDA e MPP⁺ que as células indiferenciadas. Foi demonstrado ainda, que as células N27 indiferenciadas têm uma maior susceptibilidade à morte por apoptose, induzida por toxinas dopaminérgicas, semelhante ao que se verifica nas culturas primárias (Nass e Przedborski, 2008). As células N27 são usadas na investigação de doenças neurodegenerativas, especialmente no estudo da DP, devido às características semelhantes com os neurónios dopaminérgicos (Prasad et al., 1994; Chen et al., 2008).

1.6 Objectivos

Estudos anteriores sugeriram, que os astrócitos exercem um efeito neuroprotector na doença de Parkinson, nomeadamente na protecção dos neurónios dopaminérgicos da toxicidade exercida pela 6OHDA. Os astrócitos secretam vários factores neurotróficos que estão envolvidos na sobrevivência neuronal quer durante o desenvolvimento quer após lesões cerebrais. Por outro lado, a terapia com células estaminais tem sido aplicada em várias doenças neurodegenerativas, como por exemplo na doença de Parkinson e pensa-se que um dos possíveis mecanismos envolvidos é a libertação de citocinas, factores de crescimento e moléculas neuro-reguladoras.

Assim sendo, o objectivo deste trabalho é comparar o efeito neuroprotector exercido por meios condicionados por astrócitos e células estaminais do cordão umbilical humano em dois tipos de lesões dopaminérgicas: a exposição à toxina 6OHDA e a remoção de soro do meio de cultura.

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

Capítulo II

2 Materiais e Métodos

2.1 Culturas de neurónios da *substantia nigra*

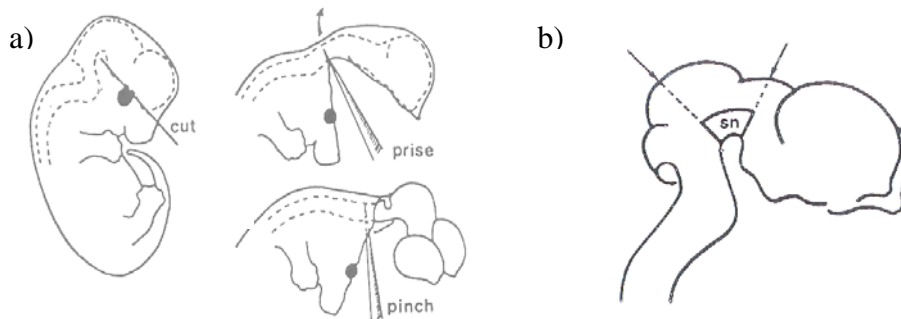


Figura 5: a) Representação das incisões para a remoção de um cérebro de um embrião de rato com 14 mm. b) Dissecção da *substantia nigra* a partir do mesencéfalo ventral de um embrião de rato com 12 mm (SN: *substantia nigra*) (Dunnet e Björklund, 1999).

A cultura de neurónios da *substantia nigra* foi obtida a partir de embriões de ratos *Wistar* entre o 15º e 16º dia de gestação. Para tal, a fêmea grávida foi anestesiada com quetamina (87,5 mg/ kg) e xilazina (12,5 mg/ Kg) na cavidade peritoneal e aberta na zona do útero para que fossem retirados os embriões. Estes foram colocados numa caixa de petri contendo PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4) frio. A fêmea foi morta por decapitação. De seguida os embriões foram extraídos do respectivo saco amniótico e placenta, e a região de interesse, isto é a *substantia nigra*, foi isolada como ilustrado na figura 5. Após a dissecção o tecido foi alvo de digestão enzimática com DNase (0,5 mg/mL) e tripsina (0,5 mg/ mL) dissolvidas em PBS e colocadas durante 5 a 10 minutos a 37 °C. Foi desprezado o sobrenadante e parou-se a digestão adicionando aos tecidos 10 % de FBS em PBS. Após sedimentar o pellet, o sobrenadante foi novamente removido e fez-se dissociação mecânica em PBS, inicialmente com uma pipeta de 5 mL, seguindo-se passagens sequenciais por pontas estéreis com orifícios de diferentes tamanhos. Centrifugou-se durante 3 minutos a 1500 r.p.m. e ressuspendeu-se em meio neurobasal (MNB, Gibco) suplementado com B27 (Gibco), 0,05 µg/ mL de glutamina (Sigma), 50 µg/ mL de gentamicina e 25 µM de glutamato (Sigma). Fez-se uma diluição de 1:1 da suspensão celular obtida com azul tripano a 0,4 % em NaCl a 0,9 % e contaram-se as células viáveis (não coradas de azul) no microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubaer.

Após terem sido feitas as diluições necessárias em MNB distribuíram-se as células em placas com 12 poços com uma densidade de $0,4 \times 10^6$ células/ poço. Os poços das placas estavam previamente revestidas com poli-D-lisina e podiam, dependendo do objectivo do isolamento, conter lamelas também revestidas. As culturas de neurónios foram mantidas na incubadora a 37°C, numa atmosfera de 95% ar e 5% CO₂ até serem utilizadas 4 dias após a cultura.

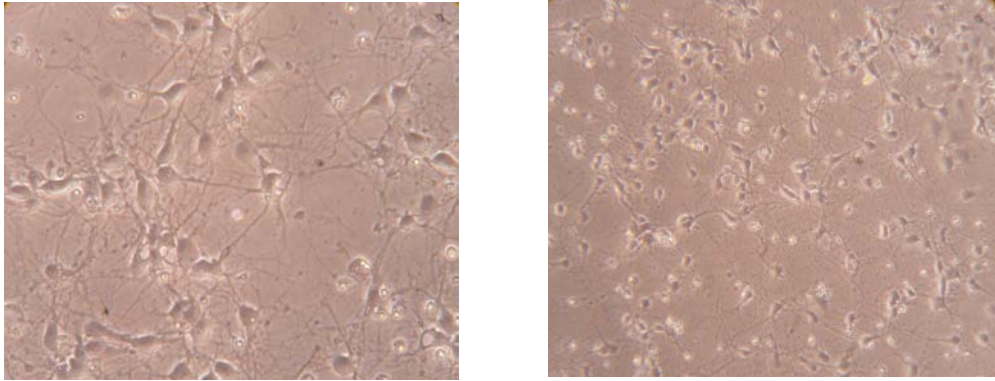


Figura 6: Fotografias de células de neurónios da *substantia nigra* há 6 dias em cultura (200x e 100x, respectivamente).

2.2 Culturas de células glias do mesencéfalo ventral

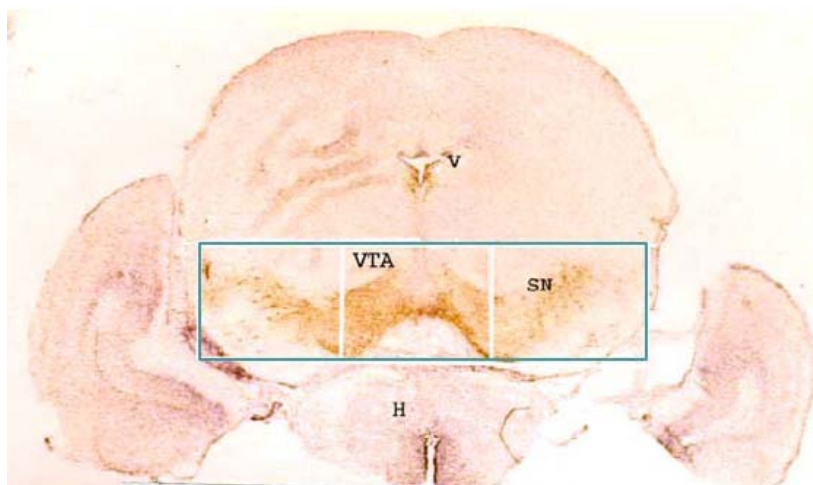


Figura 7: Secção coronal de cérebro de rato. As linhas azuis indicam a zona de corte feitas durante a dissecação (SN: *substantia nigra*, VTA: área tegmental ventral, V: aqueduto, H: hipotálamo) (Staal et al., 2007).

As culturas de células gliais do mesencéfalo ventral foram obtidas a partir de cérebros de ratos recém nascidos com 1 a 3 dias de vida. Os cérebros foram retirados e colocados em PBS frio. Procedeu-se à dissecação da área de interesse como é mostrado na figura 7 e retiraram-se cuidadosamente as meninges, sendo o mesencéfalo ventral de seguida dissociado mecanicamente, inicialmente com uma pipeta de 5 mL, seguindo-se passagens sequenciais por pontas estéreis com orifícios de diferentes tamanhos. Fez-se passar a suspensão celular por um filtro de nylon com um poro de 70 μm e centrifugou-se durante 8 minutos, a 230 g, à temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em meio M10 C-G contendo 10% de FBS não inactivado pelo calor (Gibco), glicose 0,34 %, insulina 5 mg/ L, 12.000 unidades/ L de penicilina e 12 mg/ L de estreptomicina no meio mínimo essencial (MEM, Sigma Aldrich). Fez-se uma diluição 1:1 da suspensão celular obtida com azul tripano a 0,4 % em NaCl a 0,9 % e contaram-se as células viáveis (não coradas de azul) no microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubaer. Após terem sido feitas as diluições necessárias em M10 C-G, as células foram distribuídas em frascos com 75 cm^2 ou 175 cm^2 , previamente revestidos com poli-D-lisina, com uma densidade de $1 \times 10^6 / 75 \text{ cm}^2$ ou $2 \times 10^6 / 175 \text{ cm}^2$, respectivamente. As culturas de células gliais do mesencéfalo ventral foram mantidas numa incubadora a 37°C com uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de cultura de cada frasco foi mudado a cada 3-4 dias. Após 7-9 dias, colocaram-se os frascos a agitar (AGITORB200) a 160 r.p.m., durante 4 horas e a 37 °C, de modo a remover ao máximo outro tipo de células presentes na cultura, como por exemplo microglia. Após o processo de agitação adicionou-se novo meio M10 C-G e este foi mantido por 24 horas, até ao início do condicionamento.

2.3 Linha celular N27

A linha celular de neurónios dopaminérgicos foi mantida em meio RPMI (10 % de FBS não inactivado pelo calor, 100 unidades de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 2 g/ L de bicarbonato de sódio) numa atmosfera humificada com 95 % de ar e 5 % de CO₂, a 37 °C e em placas de cultura de 10 cm de diâmetro. Sempre que estas atingiram uma confluência de aproximadamente 70 % procedeu-se à tripsinização das células. Para tal, removeu-se o meio e adicionou-se tripsina (7,5mg/ mL) durante 5 a

10 segundos. Removeu-se a tripsina e adicionou-se meio RPMI, ressuspendeu-se e adicionaram-se 2 mL da suspensão celular numa nova placa de cultura contendo 10 mL de meio RPMI. Para as experiências as células foram passadas para placas de 96 poços, 48 poços e 24 poços com diferentes densidades de acordo com a experiência em questão. Para os ensaios com meio condicionado de astrócitos as células foram mantidas em M10 C-G, em vez do RPMI, dado que os astrócitos apenas se mantinham viáveis em M10 C-G e não em RPMI, enquanto que as células N27 apresentavam um comportamento igual quando estavam em contacto com o meio M10 C-G.

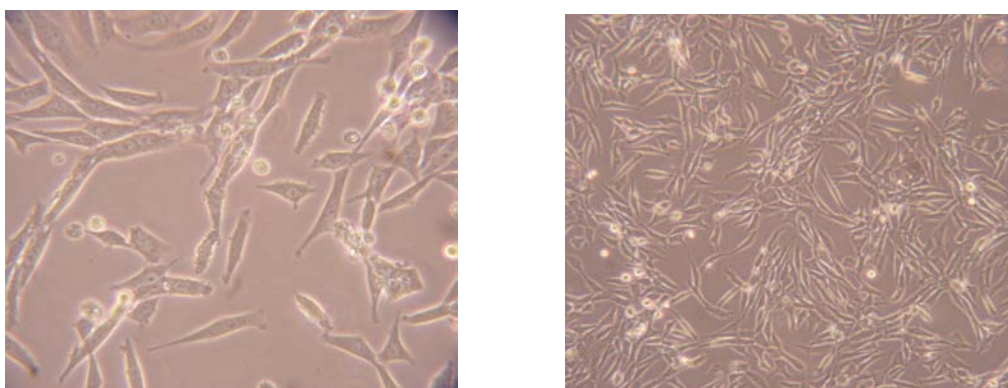
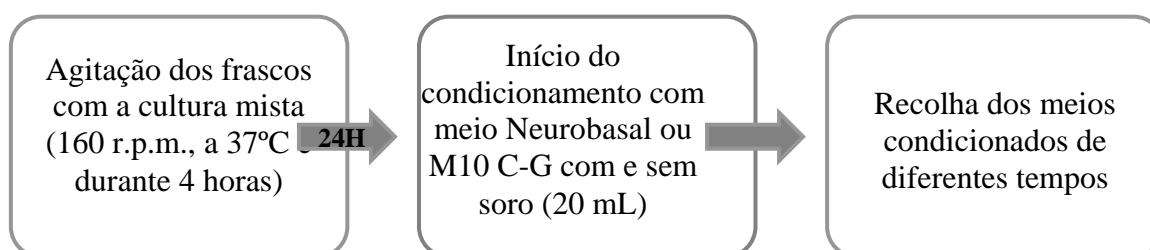


Figura 8: Fotografias das células da linha celular N27 (200x e 100x, respectivamente).

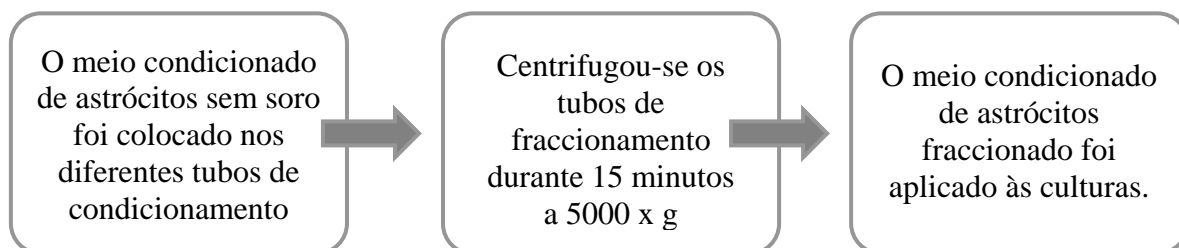
2.4 Meio Condicionado de Astrócitos

24 Horas após da agitação para a remoção da microglia, foi colocado no frasco meio neurobasal com soro, no caso de se ir aplicar nas culturas primárias de neurónios da *substantia nigra* e deu-se início aos diferentes tempos de condicionamento: 24, 48, 72 e 96 horas. Para se obter meio condicionado de astrócitos para aplicar na linha celular N27, após a agitação foi colocado no frasco meio M10 C-G com e sem soro e deu-se início aos diferentes tempos de condicionamento: 24, 48 e 72 horas no caso do MCA com soro e apenas 24 horas de condicionamento no caso do MCA sem soro. Findo esse tempo, os meios condicionados foram recolhidos do frasco e armazenados a -80°C .



2.5 Meio Condicionado de Astrócitos Sem Soro Fraccionado

Para fraccionar meio condicionado pelos astrócitos sem soro fraccionado, fez-se passar o meio condicionado sem soro por um tubo de fraccionamento (Vivaspin, Sartorius) contendo uma membrana com poros de diferentes tamanhos, que permite a passagem de moléculas com diferentes pesos moleculares. Foram usados tubos de fraccionamento cujo tamanho do poro da membrana permite a passagem de moléculas com tamanho inferior a 50 KDa, 30 KDa e 10 KDa. Antes do fraccionamento os tubos foram passados por etanol a 70 % e posteriormente lavados com água Mili-Q estéril. O meio condicionado de astrócitos sem soro foi colocado nos diferentes tubos de fraccionamento e centrifugado durante 15 minutos a 5000 x g (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifugas). Após o fraccionamento o MCA sem soro fraccionado foi aplicado às culturas.



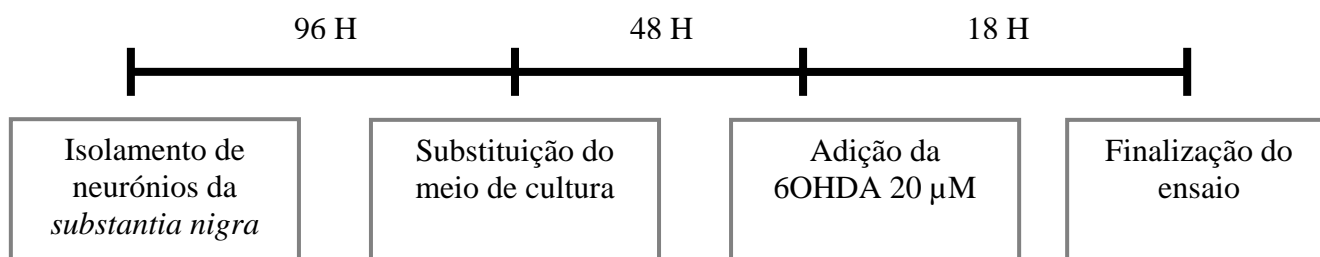
2.6 Meio Condicionado de Células Perivasculares do Cordão Umbilical Humano

Os meios condicionados de células perivasculares (HUCPVCs) do cordão umbilical foram cedidos pela Universidade do Minho, Braga, Portugal. De um modo breve, as HUCPVCs foram isoladas a partir do cordão umbilical humano de 4 a 5 cm de tamanho, do qual foi isolada a matriz da geleia de *Wharton*. As células foram colocadas a crescer em frascos de cultura com uma densidade de 4000 células/ cm² e meio RPMI. Os meios foram mudados a cada 2/3 dias e as células foram tripsinizadas e passadas

para novos frascos de cultura quando estas apresentavam uma boa confluência. Para se obter o meio condicionado de HUCPVCs as células foram passadas e semeadas com uma densidade de 4000 células/ cm² e passados 3 dias o meio foi mudado. Depois de 24 horas e 96 horas o meio condicionado foi recolhido e congelado.

2.7 Tratamento das culturas de neurónios da *Substantia Nigra*

Após 4 dias em cultura, o meio de cultura foi substituído, por meio condicionado por astrócitos, meio condicionado por células perivasculares do cordão umbilical. 48 Horas depois as células foram incubadas com 6OHDA (20 µM) durante 18 horas. A 6OHDA foi dissolvida em ácido ascórbico numa concentração stock de 1 mM e foi armazenada a -80 °C. Antes de cada experiência a solução stock de 6OHDA foi dissolvida em meio de cultura, na concentração final já referida de 20 µM.



2.8 Tratamento das culturas da linha celular N27

Para determinar a concentração de 6OHDA que causava uma lesão dopaminérgica significativa nas células N27, colocaram-se as células em placas de cultura com 48 poços numa densidade de 0,06 x 10⁵ de células/ poço. Passadas 48 horas incubaram-se as células com as diferentes concentrações de 6OHDA (50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM e 300 µM) por 24 horas.

Na experiência para avaliar o efeito de MCA com soro, na reversão da lesão com 6OHDA, colocaram-se as células em placas de cultura com 48 poços com uma densidade de $0,06 \times 10^5$ células/ poço. Passadas 48 horas, procedeu-se à mudança de meios para os meios condicionados por astrócitos de diferentes tempos de condicionamento. Depois de 48 horas incubou-se com 6OHDA com uma concentração final de $150 \mu\text{M}$ por 24 horas. Para avaliar o efeito do MCA sem soro nas N27, cultivaram-se as células em placas de cultura com 24 poços a uma densidade de $0,125 \times 10^5$ células/ poço. Depois de 48 horas alteraram-se os meios e assim se mantiveram por 48 horas.

Com o intuito de avaliar o efeito de MCA sem soro fraccionado na linha celular, cultivaram-se as células em placas de cultura com 48 poços com uma densidade de $0,06 \times 10^5$ células/ poço. Depois de 48 horas substituíram-se os meios e assim se mantiveram por 48 horas até ao final da experiência.

Por último para analisar o efeito de meios condicionados de células perivasculares do cordão umbilical na ausência de soro, as células foram colocadas com uma densidade de $0,03 \times 10^5$ células/ poço em placas de cultura com 96 poços. Passadas 48 horas foram substituídos os meios e assim se mantiveram por 48 dias até ao final da experiência.

2.9 Western Blot

Os níveis de proteína TH nas células foram determinados por Western Blot. Para a extracção da proteína usou-se tampão de lise (Tris 25mM, EDTA 2,5 mM, EGTA 2,5 mM, Triton X-100 0,2%, DTT 1 mM, PMSF 1mM e leupeptina $25,57 \mu\text{M}$). A concentração de proteínas determinou-se usando o método de Bradford e albumina de soro bovino (Biorad Protein Assay). Desnaturaram-se as amostras pela adição de tampão (Tris 100 mM, glicina 100 mM, SDS 4 %, ureia 8 M e 0,01% de azul bromofenol) seguido de aquecimento durante 5 minutos a 100°C . As proteínas foram separadas por SDS-PAGE usando um gel com 12% de acrilamida e uma voltagem de 160V durante aproximadamente 1 hora. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de difluorido de polivinildieno, previamente activada em metanol durante 5 segundos, em água durante 5 minutos e por último equilibradas em tampão de electrotransferência (10 mM de CAPS em metanol 10%, pH 11) durante 15 minutos.

Após a electrotransferência bloquearam-se as membranas com 5 % de leite em TBS-T (Tween-20 0,1% em Tris 20 mM e 137 mM de solução NaCl), durante 60 minutos à temperatura ambiente. De seguida as membranas foram incubadas, durante a noite a 4°C, com o anticorpo primário anti-TH obtido de murganho (1:5000, *Transduction Laboratories*) diluído em TBS-T. O excesso de anticorpo primário que não ligou foi removido por 4 lavagens de 10 cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário dirigido contra as imunoglobulinas de murganho conjugado à fosfatase alcalina (1:10000) diluído em TBS-T, durante 1 hora e à temperatura ambiente. Foram feitas 4 lavagens de 10 cada com TBS – T, mais uma vez para remover o excesso de anticorpo secundário que não ligou. Por último as membranas foram expostas durante 5 minutos, ao substrato da fosfatase alcalina (*ECF Western Blotting Reagent Packs, Amersham*). As bandas foram reveladas usando o sistema *Molecular Imager FX* (BioRad) e quantificadas usando o software *Quantity One* (BioRad).

2.10 Imunocitoquímica

Para os ensaios da Imunocitoquímica, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4 % durante 15 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 10 % em PBS durante 5 minutos. As células foram então incubadas com solução de bloqueio (20% FBS em PBS contendo 0,1% de Tween-20) durante uma hora à temperatura ambiente. Seguidamente incubaram-se com o anticorpo primário anti-TH obtido de murganho (1:1000) diluído em PBS-T (PBS contendo 0,1 % Tween-20) com 1 % FBS por 2 horas. Ao fim deste tempo as lamelas foram lavadas com PBS-T para remover o excesso de anticorpo primário que não ligou. Incubou-se de seguida com o anticorpo secundário anti imunoglobulinas de murganho conjugado ao fluoróforo Alexa® 488 (1:1000) diluído mais uma vez em PBS-T durante 1 hora e lavou-se novamente para remover o excesso de anticorpo secundário que não ligou. Marcou-se o núcleo celular com Hoechst (2µM / lamela) durante 20 minutos seguido de 3 lavagens para remover o excesso que não ligou. As lamelas foram montadas em lâminas usando o meio de montagem fluorescente DAKO (DAKO North América Inc.) e observadas no microscópio invertido *Zeiss* com uma ampliação de 40 x.

2.11. Avaliação da Redução do MTT

De modo a avaliar a viabilidade celular procedeu-se à medição da redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). Para tal removeu-se o meio de cultura das células e incubaram-se com MTT 0,5 mg/ mL em meio Krebs (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM glicose 10 mM, Hepes 20 mM, pH 7,35) durante 60-90 minutos a 37 °C, até se observar a formação de cristais azuis pelas células viáveis. De seguida dissolveu-se o precipitado azul com HCl 0,04 M em isopropanol. Agitou-se a placa de cultura até se dissolver totalmente o precipitado e por último mediu-se a absorvência a 570 nm, usando um leitor ELISA de microplacas.

2.12 Avaliação da libertação da LDH

A viabilidade celular foi ainda avaliada por medição através de um Kit (*CytoTox-96-NonRadioactive-Cytotoxicity-Assay for LDH activity*; Promega bioscience) que mede a lactato desidrogenase (LDH) libertada para o meio de cultura quando há morte celular. Para tal recolheram-se 25 µL de meio de cultura das células tratadas, para uma placa de 96 poços. Adicionou-se 25 µL de *Substract mix*, fornecido no Kit a cada poço, incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente e às escuras. Adicionou-se, por último, 25 µL de solução de paragem fornecida no Kit. Leu-se a absorvência a 490 nm, usando o leitor Elisa de microplacas.

2.13 Análise de dados e estatística

Os dados foram expressos como percentagem de valores obtidos em condições de controlo e representam a média ± SEM (erro padrão da média). A análise dos dados obtidos foi feita através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Por sua vez, a análise estatística foi feita através do teste One-way ANOVA, seguido do teste Bonferroni's Multiple Comparison. Os valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

Capítulo III

3. Resultados

3.1 Determinação do efeito da 6OHDA em células N27.

De modo a avaliar o efeito de meios condicionados na reversão da lesão causada por 6OHDA, na linha celular N27, foi necessário determinar a concentração de 6OHDA ideal, isto é, que causasse uma lesão dopaminérgica significativa, mas não total. Para tal, foram testadas diferentes concentrações de 6OHDA: 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M e 300 μ M e a viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT. Os resultados obtidos estão representados na figura 9.

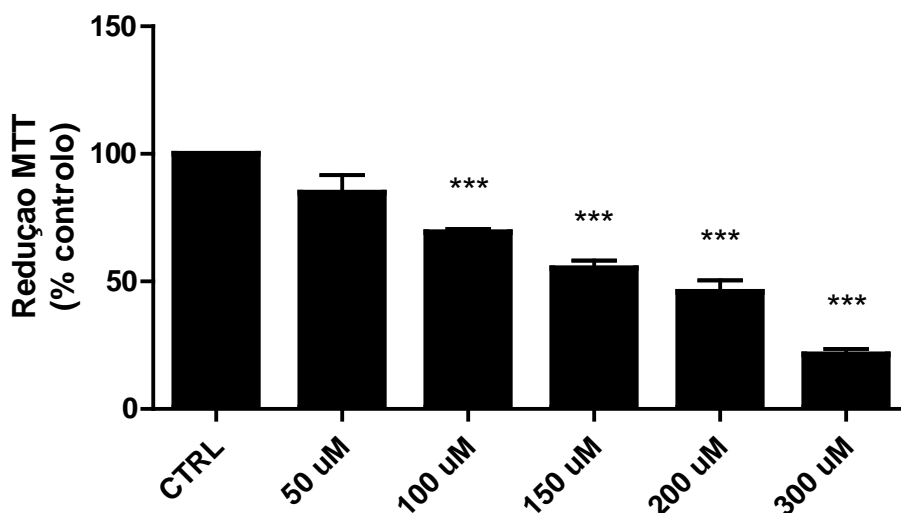


Figura 9: Alterações da viabilidade celular, estimadas pela redução do MTT, em células N27 expostas a 6OHDA. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. *** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo.

Os dados obtidos mostram uma diminuição da redução do MTT com o aumento da concentração da 6OHDA. Para a concentração de 150 μ M de 6OHDA observou-se uma diminuição na redução do MTT de $44,8 \pm 3,0$ %, relativamente ao controlo, sendo esta a concentração seleccionada para utilização nos ensaios seguintes.

3.2 Avaliação da capacidade neuroprotectora dos meios condicionados de astrócitos (MCA), na linha celular N27.

Com o objectivo de avaliar a capacidade neuroprotectora dos MCA, na linha celular N27, incubaram-se as células com meios condicionados pelos astrócitos durante diferentes períodos de tempo: 24, 48 e 72 horas. Após 48 h de exposição aos MCA foi adicionado às células, ainda em MCA, 6OHDA (150 μ M). As células foram expostas à toxina dopaminérgica durante 24h. No final deste período, foi avaliada a redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais e a libertação da LDH para o meio (Figura 10 e 11).

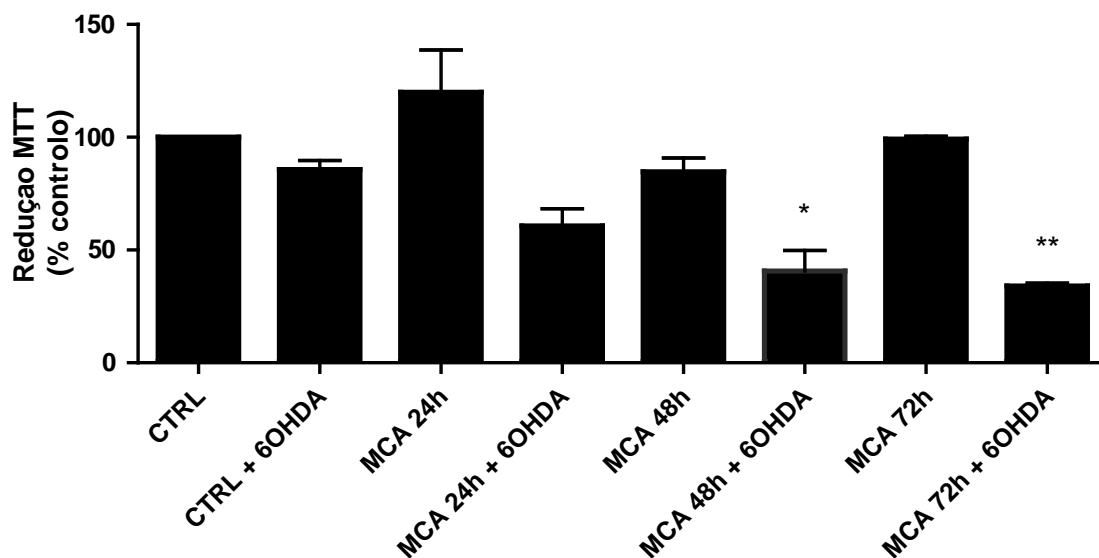


Figura 10: Efeito da duração do período de condicionamento pelos astrócitos na capacidade do MCA proteger da toxicidade dopaminérgica. As células depois de incubadas com os MCA foram tratadas com 6OHDA e a viabilidade celular foi analisada através do teste do MTT. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em quadruplicado. A análise estatística foi feita usando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ quando comparado com o controlo.

A exposição das células N27 à 6OHDA induziu uma pequena diminuição de $14,4 \pm 4,1$ % na redução do MTT comparativamente com o controlo. A exposição ao MCA durante 24 horas, na ausência de 6OHDA, promoveu um aumento na redução do MTT para $120,0 \pm 18,7$ % do controlo. No entanto, o meio condicionado não induziu qualquer protecção da acção da 6OHDA. A exposição à toxina induziu uma diminuição na redução do MTT para $85,6 \pm 4,1$ do controlo, enquanto que a adição da toxina a células expostas a MCA durante 24, 48 ou 72 h reduziu para respectivamente $60,7 \pm 7,6$ %, $40,7 \pm 9,1$ % e $34,0 \pm 1,3$ % do controlo os níveis de MTT reduzido (Figura 10).

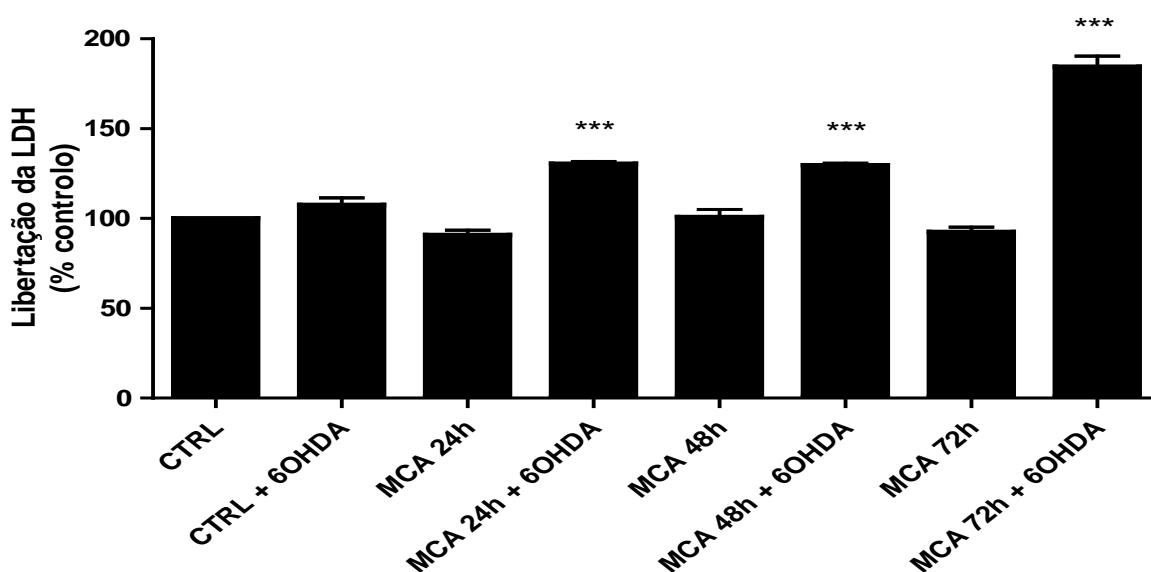


Figura 11: Efeito neuroprotector de meios de astrócitos condicionados durante 24, 48 e 72 horas, na linha celular N27. As células depois de incubadas com os MCA foram tratadas com 6OHDA e a viabilidade celular foi analisada através do teste de LDH. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de uma experiência realizada em quadruplicado. A análise estatística foi feita usando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. *** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo.

O aumento da LDH libertada para o meio na presença de 6OHDA permitiu confirmar a acção neurotóxica da 6OHDA. De modo semelhante ao observado para o teste do MTT observou-se que a incubação com MCA, na ausência de exposição à 6OHDA, induziu um aumento da viabilidade celular de aproximadamente 10% quando comparado com o controlo. Porém, tal como verificado para o teste do MTT, também

não se observou qualquer prevenção da libertação de LDH induzida pela 6OHDA na presença de MCA. Células expostas a 6OHDA na presença de meio condicionado durante 24 ou 48h horas apresentaram um aumento de cerca de 30 % na libertação de LDH, enquanto células estimuladas com 6OHDA na presença de meio condicionado por astrócitos durante 72 horas levou a um aumento em cerca de 84 % na libertação de LDH

Em resumo, tanto os resultados da redução do MTT (figura 10), como da libertação de LDH (figura 11), permitiram concluir que, o MCA não exerce qualquer tipo de neuroprotecção da lesão induzida por 6OHDA na linha celular N27.

3.3 Avaliação do efeito neuroprotector do meio condicionado de astrócitos (MCA), relativamente ao efeito da ausência de soro na linha celular N27.

O soro contém nutrientes e factores tróficos essenciais à sobrevivência e proliferação de alguns tipos de células em cultura e a sua remoção pode ser uma forma de induzir “agressão” para as culturas celulares. Assim, nesta parte do trabalho estudou-se de que forma o MCA afectava a lesão induzida pela ausência de soro no meio de cultura. O efeito da acção do meio condicionado por astrócitos nas alterações da redução do MTT induzidas por remoção do soro está representado na figura 12.

A remoção do soro do meio de cultura induziu uma diminuição drástica nos níveis de redução do MTT para $25,4 \pm 10,4$ % do controlo. No entanto a incubação prévia das células com MCA reverteu estes níveis para valores do controlo ($98,1 \pm 10,5$ % relativamente ao controlo) indicando que o condicionamento do meio pelos astrócitos protegeu as células dos efeitos provocados pela ausência de soro.

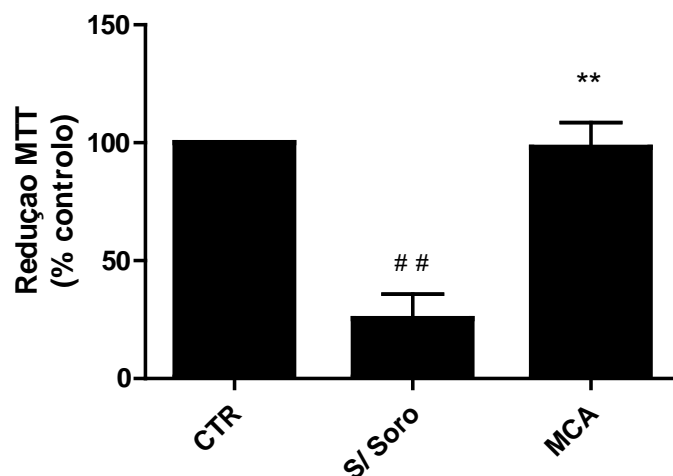


Figura 12: Efeito neuroprotector de meio condicionado de astrócitos (MCA), na ausência de soro na linha celular N27. As células foram incubadas com o MCA sem soro e a viabilidade celular foi analisada pelo teste de redução do MTT. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi feita usando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. ** $p < 0,001$ quando comparado com o controlo sem soro e # # $p < 0,001$ quando comparado com o controlo.

3.4 Identificação da fracção molecular do meio condicionado por astrócitos com acção neuroprotectora na linha celular N27

Com o intuito de reunir informação sobre as moléculas libertadas pelos astrócitos, que estivessem envolvidas na protecção celular na ausência de soro, foram preparadas fracções de MCA (sem soro) com peso molecular inferior a 50 KDa, a 30 KDa e a 10 KDa. As culturas da linha celular foram expostas às diferentes fracções e foi avaliada a viabilidade celular utilizando o teste de redução do MTT.

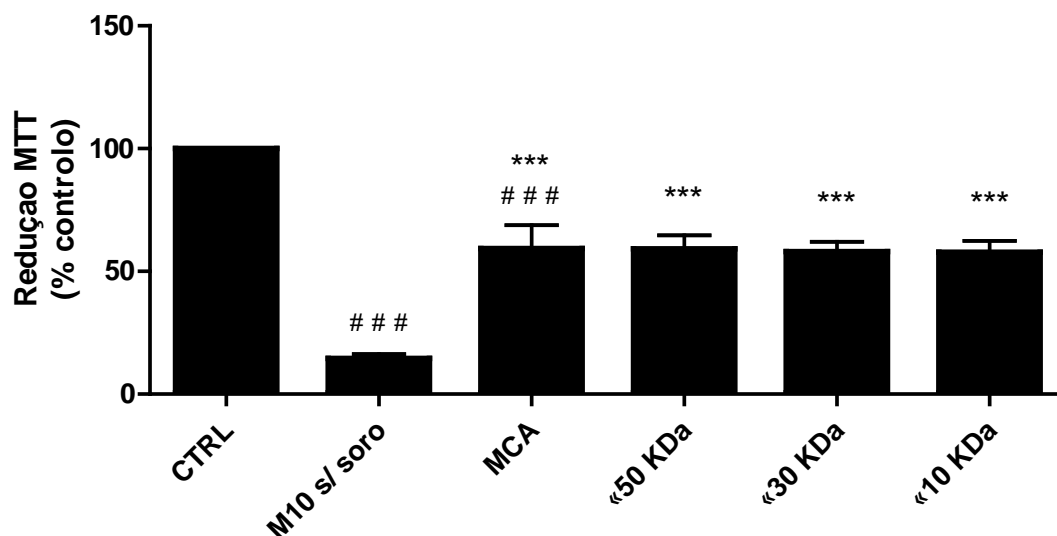


Figura 13: Efeito neuroprotector das diferentes fracções de MCA, na ausência de soro, na linha celular N27. As células foram incubadas com diferentes fracções de MCA sem soro e a viabilidade celular foi analisada pelo teste de redução do MTT. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em quadruplicado. A análise estatística foi feita usando o programa One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. *** $p < 0,0001$ quando comparado com o M10 s/ soro) e ### $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo

Foi possível observar que em concordância com os resultados descritos na secção 3.3, existiu uma reversão da lesão causada pela ausência de soro. Os resultados obtidos mostraram que as 3 fracções testadas induziram uma reversão de cerca de 45% na redução do MTT induzida pela remoção do soro (Figura 13) o que parece sugerir que as moléculas segregadas pelos astrócitos com acção protectora sobre as células N27 têm um peso molecular inferior a 10kDa.

3.5 Avaliação do efeito dos meios condicionados por astrócitos (MCA) na reversão da lesão causada por 6OHDA, em culturas primárias do mesencéfalo ventral.

Com o objectivo de testar se a capacidade neuroprotectora do MCA também se observa em culturas primárias de células neuronais, incubaram-se estas células com meio de astrócitos condicionado durante 24, 48, 72 e 96 horas. Após 48 horas de exposição ao MCA, foi adicionada 6OHDA (20 μ M) às células. De modo a avaliarmos a extensão da lesão dopaminérgica numa cultura primária do mesencéfalo ventral foi-se determinar, por Imunocitoquímica, o número de células com marcação para o marcador dopaminérgico TH (figura 14) e ainda os níveis deste marcador por Western Blot (figura 15).

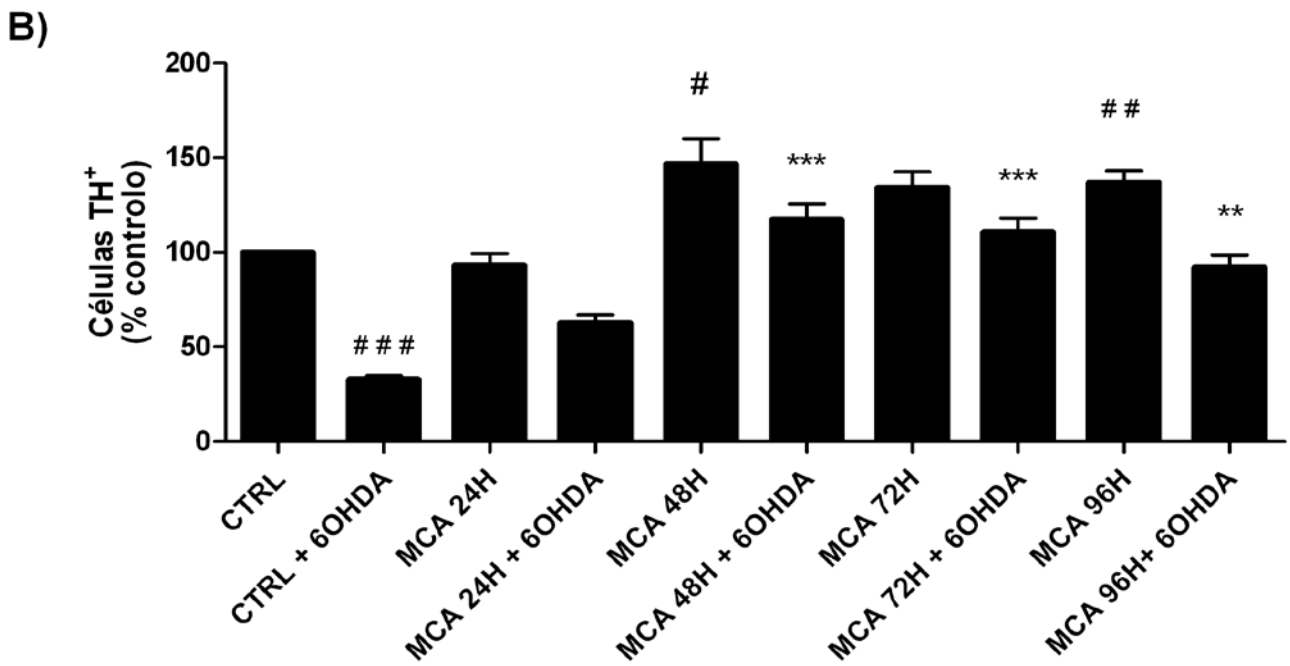
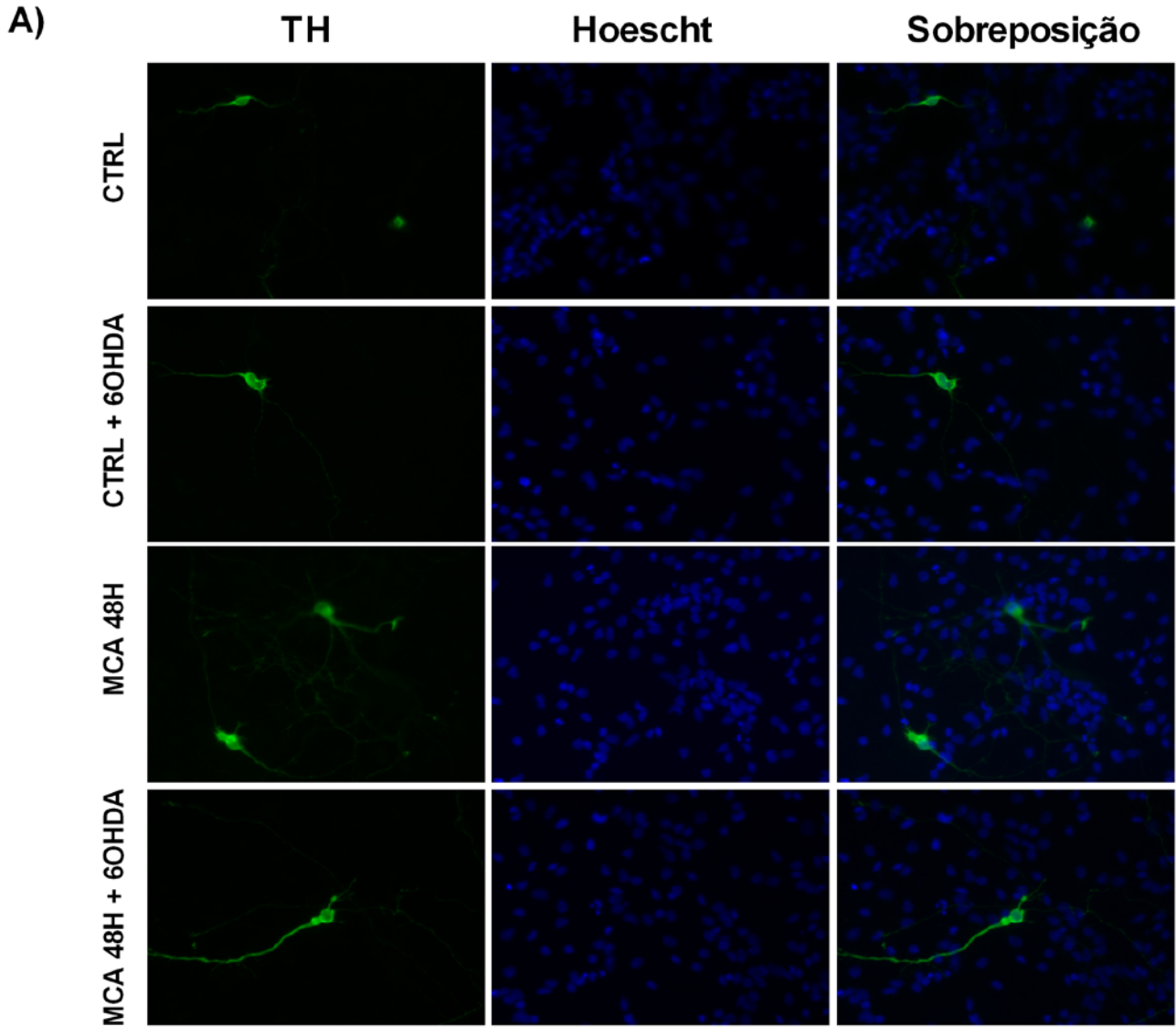


Figura 14: Efeito de meios de astrócitos condicionados durante 24, 48, 72 e 96 horas, na reversão da lesão causada pela exposição de 18 horas a 6OHDA, numa cultura primária de neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra*. A) Imagens de imunofluorescência de culturas de neurónios dopaminérgicos depois de incubadas com os MCA e tratadas com 6OHDA. As imagens foram obtidas através de um microscópio de fluorescência invertido *Zeiss*, usando uma ampliação de 40x. **B)** Quantificação do número de neurónios TH positivos presentes nas culturas de neurónios dopaminérgicos depois de expostas ao MCA e tratadas com 6OHDA. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de duas experiências realizadas em triplicado. A análise estatística foi feita usando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. *** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,001$ quando comparado com o controlo tratado com 6OHDA; ### $p < 0,0001$ e ## $p < 0,001$ quando comparado com o controlo.

Os resultados mostraram que a exposição a 6OHDA promoveu uma redução do número de células TH positivas de $67,2 \pm 2,2$ % quando comparado com o controlo e que os meios condicionados por astrócitos durante diferentes tempos (24-96h) foram eficazes em reverter a lesão dopaminérgica. A incubação com os meios condicionados promoveu a sobrevivência das células TH positivas no controlo ($146,7 \pm 13,4$ % relativamente ao controlo, $134,3 \pm 8,2$ % do controlo e $137,2 \pm 5,9$ % do controlo para os meios condicionados durante 48, 72 ou 96h, respectivamente). Para o MCA durante 24 horas não se observou este efeito protector no número de células TH positivas ($93,3 \pm 6,2$ % do controlo). Por outro lado, em situações em que se promoveu a lesão dopaminérgica por exposição a 6OHDA, observou-se uma redução de $67,2 \pm 2,2$ % no número de células TH positivas quando comparado com o controlo, no entanto todos os MCA testados reverteram essa lesão. Mesmo o MCA 24 horas, que apresentou um menor número de células TH positivas comparativamente ao controlo, quando as culturas foram tratadas com 6OHDA apresentou um aumento no número de neurónios TH positivos ($62,7 \pm 4,2$ %) relativamente ao valor apresentado pelo controlo tratado com 6OHDA. Ao expor as culturas ao MCA 48 horas, verificou-se que estas apresentaram um maior número de neurónios TH positivos. Para além disto, este MCA foi o que demonstrou conferir maior protecção às células dopaminérgicas reduzindo em cerca de $84,4 \pm 8,4$ % a lesão induzida pela 6OHDA (comparando MCA 48 horas com

CTRL + 6OHDA). Por último, também os MCA 72 horas e MCA 96 horas mostraram proteger as células dopaminérgicas da lesão causada por 6OHDA, revertendo o número de células TH positivas aos valores encontrados no controlo ($110,768 \pm 7,367$ % relativamente ao controlo e $92,307 \pm 6,139$ % relativamente ao controlo, respectivamente).

As imagens da Imunocitoquímica (figura 14 a) permitiram ainda verificar que os neurónios quando incubados com os MCA não só apresentaram alterações no número de células TH positivas, como também os neurónios apresentaram alterações fenotípicas, isto é, de um modo geral, os neurónios TH positivos revelaram prolongamentos axonais mais desenvolvidos, e estabelecendo uma rede neuronal mais complexa que na células controlo.

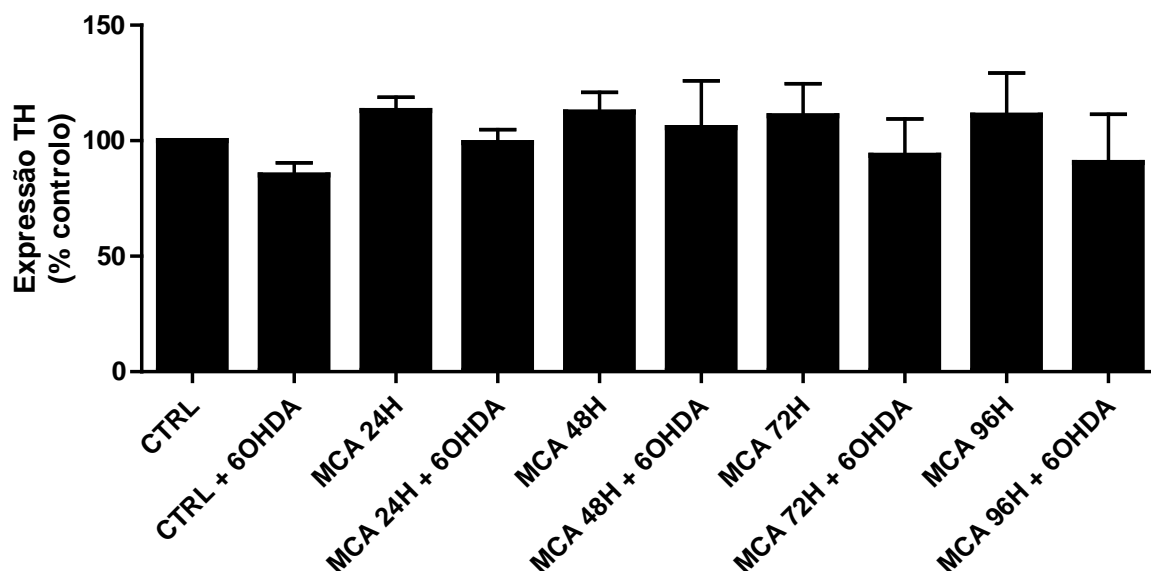


Figura 15: Efeito na reversão da lesão causada por 6OHDA, de meios de astrócitos condicionados durante 24, 48, 72 e 96 horas, numa cultura primária de neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra*. Este efeito foi analisado por Western Blot. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de quatro experiências realizadas em triplicado. Sem significado estatístico.

Da análise das alterações de TH por Western Blot verificou-se que a exposição a 6OHDA induziu uma pequena diminuição, não estatisticamente significativa, nos níveis da proteína (85% do controlo). Também não foi observado qualquer efeito da exposição

aos meios condicionados pelos astrócitos durante diferentes períodos de tempo (Figura 15).

A análise do número de células que expressam o marcador TH por Imunocitoquímica e dos níveis totais da proteína nas culturas por Western Blot, resultaram em dados aparentemente contraditórios, mas que podem resultar de efeitos compensatórios decorrentes da diminuição da transmissão dopaminérgica.

3.6 Efeito do meio condicionado células estaminais perivascularares do cordão umbilical humano (HUCPVC's) na acção da remoção do soro em células N27

Para avaliar o efeito neuroprotector dos meios condicionados por HUCPVC's, na linha celular N27 na ausência de soro, incubaram-se as células com os meios condicionados por HUCPVC's durante 24 e 96 horas e avaliou-se a viabilidade celular através do teste da redução do MTT. Os resultados obtidos estão representados na figura 16.

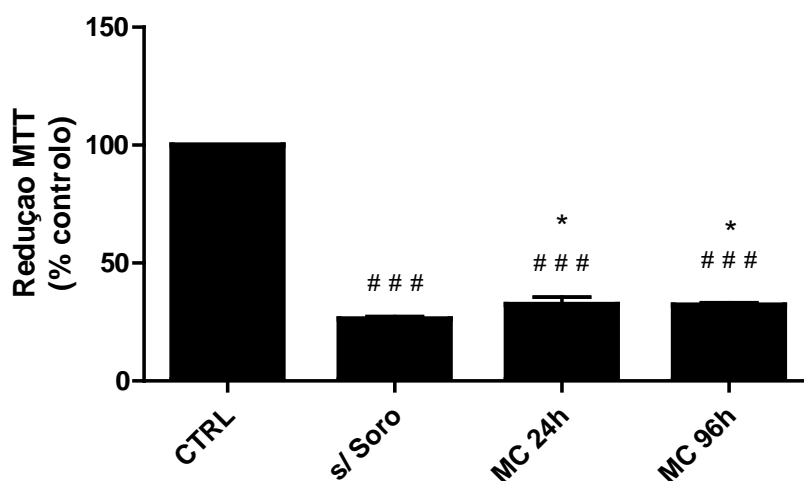


Figura 16: Efeito do meio condicionado por HUCPVC's na acção da remoção do soro em células N27. Depois de incubadas com o meio condicionado por HUCPVC's na ausência de soro, a viabilidade celular foi analisada através do teste do MTT. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (CTRL) e representam a média \pm SEM de uma experiência independente realizadas em quintuplicado. A análise estatística foi feita usando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. * $p < 0,01$ quando comparado com o controlo sem soro e ### $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo.

Os resultados obtidos mostraram não haver qualquer efeito neuroprotector por parte do meio condicionado por HUCPVC's da lesão induzida pela remoção do soro. Na ausência de soro verificou-se uma redução de $73,7 \pm 1,0$ % nos níveis de redução de MTT. A exposição aos meios condicionado por HUCPVC's durante 24 horas ou 96 horas não alteraram significativamente estes valores. Deste modo, conclui-se que não existe um efeito neuroprotector do meio condicionado por HUCPVC's da lesão promovida pela remoção do soro nas células N27.

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

Capítulo IV

4. Discussão

Com este trabalho pretendeu-se avaliar o efeito neuroprotector de vários meios condicionados, tanto em culturas primárias de neurónios da *substantia nigra*, como em culturas da linha celular N27. Os meios condicionados testados foram: o meio condicionado de astrócitos (MCA) com e sem soro e o meio condicionado de células perivasculares do cordão umbilical humano (HUCPVC's).

Relativamente ao MCA, muitos estudos já descreveram a capacidade neuroprotectora dos astrócitos na doença de Parkinson, nomeadamente, devido à produção por parte destas células de factores neurotróficos solúveis, envolvidos na sobrevivência, maturação, diferenciação e desenvolvimento das células neuronais (Seth e Karl, 2008; Teismann e Schulz, 2004). Está também documentado, *in vivo*, que os astrócitos protegem os neurónios da toxicidade causada por 6OHDA (Teismann e Schulz, 2004). Verificou-se neste trabalho, que o MCA não foi eficaz em proteger as células da linha celular N27, da lesão causada por 6OHDA (secção 3.2). O facto de haver um ligeiro aumento da viabilidade celular quando as células foram expostas ao MCA 24 horas, sugeriu que os astrócitos libertaram para o meio factores neurotróficos, porém a libertação destes factores não foi suficiente para proteger as células da toxicidade induzida por 6OHDA, na linha celular N27. Surpreendentemente verificou-se que após a exposição das células aos MCA e após tratamento com 6OHDA houve uma redução da viabilidade celular quando comparado com o controlo tratado com 6OHDA, indicando que os componentes do MCA juntamente com a 6OHDA potenciaram ainda mais a morte celular dopaminérgica.

Foi também testada a capacidade neuroprotectora de MCA na ausência de soro, na linha celular N27 (secção 3.3). Está descrito, que a ausência de soro causa a morte selectiva morte dos neurónios dopaminérgicos em culturas primárias, mas que o meio condicionado por astrócitos confluentes do tipo 1, consegue resgatar os neurónios dopaminérgicos da morte celular induzida pela privação de soro (Takeshima et al., 1994). Estes resultados são concordantes com os obtidos na linha celular N27, isto é, o MCA (sem soro) conseguiu reverter o efeito provocado pela ausência de soro. Uma possível explicação para este resultado pode estar na conversão dos astrócitos em astrócitos reactivos. Está descrito que a formação de astrócitos reactivos ocorre frequentemente em situações de isquémia, trauma ou dano cerebral e ainda quando há o tratamento com 6OHDA e MPTP em modelos animais da DP (Chen et al., 2005). Os

astrócitos reactivos podem produzir vários factores neurotróficos que promovem a sobrevivência neuronal, podem sintetizar substratos extracelulares que promovem o crescimento axonal e sinaptogénese, podem actuar como captadores de radicais livres, protegendo os neurónios contra os danos induzidos por espécies reactivas de oxigénio (ROS) e nitrogénio (RNS), podendo também, indirectamente, regular os danos neuronais pela modulação da inflamação através da diminuição da expressão de mediadores inflamatórios microgliais (Tanaka et al., 1999, Vincent et al., 1996, Vincent et al., 1997; Aloisi et al., 1997; Pyo et al., 2003, Chen et al., 2005). Na obtenção do MCA, as culturas primárias de astrócitos foram incubadas durante 24 horas com meio sem soro. Durante esta incubação observou-se que os astrócitos alteraram por completo a sua forma, tornando-se mais alongados e apresentando menor capacidade de aderência, o que pode sugerir que a incubação dos astrócitos com meio sem soro, promoveu a conversão dos astrócitos na sua forma reactiva e possivelmente alterando o padrão de expressão dos factores neurotróficos que produziam no estado basal. Esta mudança para meio sem soro pode ter implicado que os astrócitos passassem a expressar outros factores que no estado basal não eram expressos, mas que também os astrócitos podem ter aumentado ou diminuído a expressão de factores que também eram expressos no estado basal. Isto pode ajudar a compreender porque é que o MCA sem soro protegeu as células da linha celular N27 da lesão causada pela ausência de soro, enquanto que o MCA na presença de soro não protegeu as células da linha celular da toxicidade da 6OHDA.

Com o intuito de reunir informação sobre as moléculas libertadas pelos astrócitos capazes de reverter a lesão causada pela ausência de soro, foi feito neste trabalho um estudo onde o MCA sem soro foi fraccionado de acordo com diferentes pesos moleculares (secção 3.4). Foram preparadas fracções com peso molecular inferior a 50 KDa, a 30 KDa e a 10 KDa tendo todas elas revertido o efeito causado pela ausência de soro. Nesta experiência, a viabilidade celular registada na presença de MCA foi ligeiramente inferior ao obtido na secção 3.3. Tal pode ter-se devido ao facto dos astrócitos nesta cultura poderem estar menos reactivos e assim libertarem menos factores neurotróficos para o meio condicionado sem soro. Isto levou a que o MCA sem soro conseguisse reverter o efeito provocado pela ausência de soro, mas de uma forma mais modesta, comparativamente ao resultado da secção 3.3. Tendo em conta os resultados obtidos com as fracções testadas, seria interessante no futuro fraccionar o

MCA sem soro de acordo com outros pesos moleculares. Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que os mediadores solúveis mais importantes presentes no MCA capazes de modelar a activação microglial possuíam um peso molecular inferior a 3 KDa. Daí talvez fosse interessante testar e verificar se fracções de peso molecular inferior a 3 KDa, continuam ou não a ter a capacidade de reverter o efeito provocado pela ausência de soro.

Neste trabalho foi ainda testada a capacidade neuroprotectora do meio condicionado pelos astrócitos durante diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas) na toxicidade induzida pela 6OHDA em culturas primárias de neurónios da *substantia nigra* (SN). Para tal, as células foram incubadas com os diferentes MCA e tratadas com 6OHDA e o número de células TH positivas, assim como os níveis de expressão da proteína TH foram analisados por Imunocitoquímica e Western Blot, respectivamente.

Relativamente aos resultados obtidos na Imunocitoquímica (secção 3.5, figura 14 b), é de realçar que a simples exposição das células ao MCA, independentemente do tempo de condicionamento, aumentou o número de células TH positivas comparativamente ao controlo. Em qualquer cultura de células existem células que vão morrendo naturalmente devido ao envelhecimento da própria cultura. O que se verificou com esta experiência é os MCA parecem conter factores que contrariaram esse envelhecimento natural promovendo, nomeadamente, a sobrevivência das células dopaminérgicas, quando comparado com o controlo. O tratamento das culturas de neurónios da SN com 6OHDA, levou à redução do número de células TH positivas relativamente ao controlo. Esta redução foi revertida quando as células foram incubadas com o MCA e tratadas com 6OHDA, sugerindo que para além do MCA conter moléculas que promovem a sobrevivência neuronal, contém também moléculas que protegem as células da lesão com 6OHDA. Tendo em conta que estes MCA foram recolhidos de culturas de astrócitos que estiveram sempre na presença de meio com soro, duas hipóteses podem ser levantadas para explicar o resultado desta experiência. Por um lado os astrócitos, mesmo na presença de meio com soro, podem ter ficado reactivos, devido à elevada confluência em que se encontravam na cultura e estar a libertar factores neurotróficos para o meio, como já referido anteriormente. Porém convém não esquecer que os astrócitos demasiado reactivos podem libertar factores neurotóxicos, que em vez de protegerem podem acelerar a morte dos neurónios, uma

vez, que, para além do efeito neuroprotector, está também descrito que os astrócitos reactivos podem aumentar os danos dos tecidos através da libertação de citocinas pró-inflamatórias e metabolitos de ácido araquidónico, óxido nítrico (NO) e espécies reactivas de oxigénio (ROS), que podem afectar adversamente a sobrevivência celular após danos no SNC (Dayton e Major, 1996). Por outro lado, os astrócitos poderiam não estar reactivos libertando para o meio factores neurotróficos que protegeram as células neuronais da toxicidade induzida por 6OHDA, como também já descrito anteriormente. Uma dessas possíveis moléculas responsáveis por contrariar o envelhecimento natural das células da cultura, assim como de proteger as células da toxicidade causada pela 6OHDA, poderia ser o GDNF. Está descrito que o GDNF é capaz de suportar a viabilidade de neurónios dopaminérgicos da SN de ratos pós-natais e neurónios embrionários mesencefálicos humanos, através da inibição da morte natural por apoptose (Clarkson et al., 1997; Burke et al., 1998) e também pela atenuação da apoptose induzida por 6OHDA em culturas de neurónios mesencefálicos de ratos pós-natais (Ding et al., 2004). Outra das moléculas pode ser o BDNF, que como o GDNF, parece promover a sobrevivência dos neurónios mesencefálicos contra a degeneração induzida por várias toxinas, como o MPTP e 6OHDA, assegurando a sobrevivência destes neurónios em modelos animais da DP (Siegel e Chauhan, 2000). A situação em que se observou menor número de células TH positivas, assim como uma protecção menos eficaz, foi quando se incubou as células com o MCA 24 horas, sugerindo que os factores responsáveis pela capacidade neuroprotectora, como os factores responsáveis pela sobrevivência neuronal demoram algum tempo a serem produzidos e acumulados no meio, parecendo não sofrer grande degradação ao longo do tempo de condicionamento.

Através das imagens da Imunocitoquímica (secção 3.5, figura14 a) foi possível observar, que os neurónios TH positivos apresentam alterações fenotípicas quando expostas ao MCA, nomeadamente, um aumento do tamanho e das ramificações dos prolongamentos axonais.

Relativamente à ausência de alterações nos níveis proteicos de TH, quando as células foram expostas aos diferentes MCA e quando foram expostas a 6OHDA, ao contrário do que se verificou na Imunocitoquímica, a aparente diferença de resultados pode ser explicada pela capacidade demonstrada por alguns neurónios dopaminérgicos de compensar a perda de transmissão dopaminérgica, aumentando os níveis de

expressão da TH assim como da sua actividade (Zigmond et al., 1989; Mazloom and Smith, 2006). Logo, a TH medida por Western Blot pode não traduzir verdadeiramente o número de neurónios dopaminérgicos sobreviventes na cultura. Assim, a lesão dopaminérgica parece ser mais correctamente avaliada por contagem das células que apresentam marcação para a TH, e os resultados das análises por Imunocitoquímica demonstraram que quando as culturas primárias de neurónios da *substantia nigra* são expostas aos diferentes MCA existe uma redução da lesão causada por 6OHDA. Este resultado parece não ser concordante com observado em células N27 expostas a 6OHDA. Esta aparente incongruência nos resultados, pode ser explicada pela presença de outras células na cultura primária que estão ausentes na cultura da linha celular N27 e que podem mediar a acção protectora. Uma das vantagens das culturas primárias embrionárias mesencefálicas é a presença de neurónios dopaminérgicos no contexto fisiológico, isto é neurónios dopaminérgicos com outro tipo de neurónios mesencefálicos. Os neurónios dopaminérgicos representam apenas 2-5 % de toda a população de neurónios em cultura. As culturas de células da linha celular N27 são uma população de células homogéneas que representam apenas os neurónios dopaminérgicos (Nass e Przedborski, 2008). Por outro lado a vulnerabilidade das culturas primárias e das linhas celulares às lesões pode ser distinta o que pode explicar as diferenças observadas.

Neste trabalho foi ainda testada a capacidade protectora de meios condicionados por HUCPVC's, na linha celular N27 na ausência de soro (secção 3.6). Em estudos anteriores demonstrou-se que o transplante de MSC's exerceu, parcialmente, um efeito neuroprotector nos neurónios dopaminérgicos (Wang et al., 2010). Pensa-se que esse efeito neuroprotector das MSC's, se deva em parte, à sua capacidade em substituir os neurónios doentes ou danificados, através da diferenciação celular. No entanto, outros estudos sugerem que a sua capacidade pode dever-se à produção de factores neurotróficos que apoiam a sobrevivência das células neuronais, induzindo a proliferação celular endógena e promovendo a regeneração de fibras nervosas danificadas (Crigler et al., 2005). Porém, a incubação de células da linha celular N27 com meios condicionados por HUCPVC's não foi capaz de proteger as células da ausência de soro. Mais uma vez, este resultado sugere que os factores neurotróficos produzidos em condições normais por HUCPVC's dependem da presença de outras células para exercerem a sua capacidade neuroprotectora. Como já foi referido, a cultura

de células da linha celular N27 é uma população de células homogéneas que representa apenas a população de neurónios dopaminérgicos (Nass e Przedborski, 2008). Outras células que estão presentes *in vivo*, mas não na cultura de células da linha celular N27 parecem fazer a diferença na capacidade neuroprotectora dos meios condicionados por HUCPVC's.

Tentou-se ainda avaliar a acção dos meios condicionados por HUCPVC's em culturas primárias de neurónios dopaminérgicos da SN na ausência de soro. Contudo, verificou-se a morte neuronal generalizada na presença destes meios condicionados, pelo que não foi possível continuar este estudo.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que o meio condicionado por astrócitos possui maior capacidade neuroprotectora que o meio condicionado por células perivasculares do cordão umbilical. Alguns dos factores presentes no meio condicionados de astrócitos poderão, no futuro, ser identificados e utilizados como moléculas protectoras na terapia de doenças neurodegenerativas, como a DP.

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

Capítulo V

5. Conclusões

Neste trabalho experimental foi avaliada a capacidade neuroprotectora exercida por vários meios condicionados, em lesões neuronais promovidas por exposição à toxina 6OHDA ou pela remoção de soro do meio de cultura. Os meios condicionados foram preparados por exposição durante diferentes períodos de tempo (entre 24 e 96h) a culturas de astrócitos mesencefálicos ou a células estaminais perivasculares do cordão umbilical humano. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O meio condicionado por astrócitos durante 24 a 72 horas não exerceu qualquer tipo de protecção relativamente à lesão causada por 6OHDA, na linha celular N27, mas protegeu as culturas primárias de neurónios da *substantia nigra* da lesão promovida pela toxina. O MCA foi ainda eficaz em proteger as células N27 contra os efeitos provocados por outro tipo de lesão, a remoção do soro do meio de cultura.
- Os componentes do MCA com acção neuroprotectora contra os efeitos provocados pela ausência de soro parecem ser de peso molecular inferior a 10 KDa.
- Contrariamente ao observado com os MCA, os meios condicionados por HUCPVC's não conferiram qualquer protecção contra a morte das células N27 promovida pela ausência de soro no meio de cultura.

*Estudo da protecção de lesões dopaminérgicas exercida por meios condicionado
por células estaminais e por astrócitos.*

Capítulo VI

6. Referências Bibliográficas

Aloisi, F., G. Penna, et al. (1997). "IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes." *J Immunol* 159(4): 1604-12.

Berger, K., S. Przedborski, et al. (1991). "Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats." *Brain Res Bull* 26(2): 301-7.

Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2002). "Animal models of Parkinson's disease." *Bioessays* 24(4): 308-18.

Bove, J., D. Prou, et al. (2005). "Toxin-induced models of Parkinson's disease." *NeuroRx* 2(3): 484-94.

Braak, H. and K. Del Tredici (2009). "Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease." *Adv Anat Embryol Cell Biol* 201: 1-119.

Braak, H., K. Del Tredici, et al. (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiol Aging* 24(2): 197-211.

Burke, R. E., M. Antonelli, et al. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture." *J Neurochem* 71(2): 517-25.

Chen, L. W., K. L. Yung, et al. (2005). "Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease." *Curr Drug Targets* 6(7): 821-33.

Chen, P., A. Li, et al. (2008). "Protective effects of a new metalloporphyrin on paraquat-induced oxidative stress and apoptosis in N27 cells." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(2): 125-32.

Chen, Q., Y. Long, et al. (2005). "Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors." *J Neurosci Res* 80(5): 611-9.

Clarkson, E. D., W. M. Zawada, et al. (1997). "GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminergic neurons in vitro." *Cell Tissue Res* 289(2): 207-10.

Crigler, L., R. C. Robey, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis." *Exp Neurol* 198(1): 54-64.

Dale Purves et al., (2004). "Neuroscience", 3ª Edição, Sinauer Associates, Inc.

Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* 39(6): 889-909.

Dayton, E. T. and E. O. Major (1996). "Recombinant human interleukin 1 beta induces production of prostaglandins in primary human fetal astrocytes and immortalized human fetal astrocyte cultures." *J Neuroimmunol* 71(1-2): 11-8.

Del Tredici, K., U. Rub, et al. (2002). "Where does parkinson disease pathology begin in the brain?" *J Neuropathol Exp Neurol* 61(5): 413-26.

Deumens, R., A. Blokland, et al. (2002). "Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway." *Exp Neurol* 175(2): 303-17.

Ding, Y. M., J. D. Jaumotte, et al. (2004). "Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor." *J Neurochem* 89(3): 776-87.

Dong, Y. and E. N. Benveniste (2001). "Immune function of astrocytes." *Glia* 36(2): 180-90.

Dunnett S. B. & Björklund A. (1999). *Neural Transplantation Methods*: Humana Press.

Giulian, D., K. Vaca, et al. (1993). "Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival." *J Neurosci* 13(1): 29-37.

Hefti, F. (1997). "Pharmacology of neurotrophic factors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 239-67.

Hefti, F., E. Melamed, et al. (1980). "Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization." *Brain Res* 195(1): 123-37.

Henning, J., U. Strauss, et al. (2008). "Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease." *Neurosci Res* 62(4): 246-53.

Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" *Lancet Neurol* 8(4): 382-97.

Hou, L. and T. Hong (2008). "Stem cells and neurodegenerative diseases." *Sci China C Life Sci* 51(4): 287-94.

Jang, Y. K., J. J. Park, et al. (2004). "Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells." *J Neurosci Res* 75(4): 573-84.

Javoy, F., C. Sotelo, et al. (1976). "Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system." *Brain Res* 102(2): 201-15.

Kim, Y. S. and T. H. Joh (2006). "Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease." *Exp Mol Med* 38(4): 333-47.

Koehler, R. C., D. Gebremedhin, et al. (2006). "Role of astrocytes in cerebrovascular regulation." *J Appl Physiol* 100(1): 307-17.

Liberto, C. M., P. J. Albrecht, et al. (2004). "Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes." *J Neurochem* 89(5): 1092-100.

Lindvall, O., Z. Kokaia, et al. (1994). "Neurotrophins and brain insults." *Trends Neurosci* 17(11): 490-6.

Matsuzaki, M., T. Hasegawa, et al. (2004). "Histochemical features of stress-induced aggregates in alpha-synuclein overexpressing cells." *Brain Res* 1004(1-2): 83-90.

Mazloom, M. and Y. Smith (2006). "Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys." *J Comp Neurol* 495(4): 453-69.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2004). "Inflammation and the degenerative diseases of aging." *Ann N Y Acad Sci* 1035: 104-16.

Na, S. J., A. G. DiLella, et al. (2010) "Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease." *Neurochem Res* 35(5): 761-72.

Nass R, Przedborski S (2008). *Parkinson's Disease: Molecular and therapeutic insights from model systems*: Elsevier Academic Press.

Nutt, J. G., W. R. Woodward, et al. (1994). "Effect of peripheral catechol-O-methyltransferase inhibition on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa in parkinsonian patients." *Neurology* 44(5): 913-9.

Pan, Y., X. Chen, et al. (2005). "In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells." *Biochem Biophys Res Commun* 327(2): 548-56.

Perese, D. A., J. Ulman, et al. (1989). "A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model." *Brain Res* 494(2): 285-93.

Prasad, K. N., E. Carvalho, et al. (1994). "Establishment and characterization of immortalized clonal cell lines from fetal rat mesencephalic tissue." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A(9): 596-603.

Pyo, H., M. S. Yang, et al. (2003). "Wortmannin enhances lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in microglia in the presence of astrocytes in rats." *Neurosci Lett* 346(3): 141-4.

Rabey, J. M., I. Sagi, et al. (2000). "Rasagiline mesylate, a new MAO-B inhibitor for the treatment of Parkinson's disease: a double-blind study as adjunctive therapy to levodopa." *Clin Neuropharmacol* 23(6): 324-30.

Richard S. Snell, (2001). "Clinical Neuroanatomy for Medical Students", 5ª Edição, Lippincott Williams & Wilkins.

Sadan, O., N. Shemesh, et al. (2009). "Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases." *Isr Med Assoc J* 11(4): 201-4.

Salgado, A. J., J. S. Fraga, et al. (2009). "Role of Human Umbilical Cord Mesenchymal Progenitors Conditioned Media in Neuronal/Glial Cell Densities, Viability and Proliferation." *Stem Cells Dev*.

Schapira, A. H. (2005). "Present and future drug treatment for Parkinson's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(11): 1472-8.

Schober, A. (2004). "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP." *Cell Tissue Res* 318(1): 215-24.

Seth, P. and N. Koul (2008). "Astrocyte, the star avatar: redefined." *J Biosci* 33(3): 405-21.

Shannon KM. (2004). Movement Disorders. *in* Neurology in clinical practice. Vol. II. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic. J. (Eds). Boston: Butterworth Heinemann

Siegel, G. J. and N. B. Chauhan (2000). "Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain." *Brain Res Brain Res Rev* 33(2-3): 199-227.

Sofroniew, M. V. (2005). "Reactive astrocytes in neural repair and protection." *Neuroscientist* 11(5): 400-7.

Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, et al. (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." *Nature* 388(6645): 839-40.

Staal RGW, Rayport S, Sulzer D. (2007). "Amperometric Detection of Dopamine Exocytosis from Synaptic Terminals, in *Electrochemical Methods for Neuroscience.*" Michael AC, Borland LM (Eds). Taylor & Francis Group, LLC.

Takehima, T., J. M. Johnston, et al. (1994). "Mesencephalic type 1 astrocytes rescue dopaminergic neurons from death induced by serum deprivation." *J Neurosci* 14(8): 4769-79.

Tanaka, J., K. Toku, et al. (1999). "Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species." *Glia* 28(2): 85-96.

Teismann, P. and J. B. Schulz (2004). "Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation." *Cell Tissue Res* 318(1): 149-61.

Thoenen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." *Science* 270(5236): 593-8.

Thoenen, H., Y. A. Barde, et al. (1987). "Neurotrophic factors and neuronal death." *Ciba Found Symp* 126: 82-95.

Thomas, B. (2009). "Parkinson's disease: from molecular pathways in disease to therapeutic approaches." *Antioxid Redox Signal* 11(9): 2077-82.

Tucker, K. L., M. Meyer, et al. (2001). "Neurotrophins are required for nerve growth during development." *Nat Neurosci* 4(1): 29-37.

Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." *Eur J Pharmacol* 5(1): 107-10.

Vila, M., V. Jackson-Lewis, et al. (2001). "The role of glial cells in Parkinson's disease." *Curr Opin Neurol* 14(4): 483-9.

Vincent, V. A., F. J. Tilders, et al. (1997). "Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta." *Glia* 19(3): 190-8.

Vincent, V. A., A. M. Van Dam, et al. (1996). "Gradual inhibition of inducible nitric oxide synthase but not of interleukin-1 beta production in rat microglial cells of endotoxin-treated mixed glial cell cultures." *Glia* 17(2): 94-102.

Wang, F., T. Yasuhara, et al. (2010) "Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha." *BMC Neurosci* 11: 52.

Wang, Y., S. Chen, et al. (2007). "Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease." *J Neuroimmune Pharmacol* 2(3): 243-50.

Zigmond, M. J., T. W. Berger, et al. (1989). "Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury. Studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of parkinsonism." *Mol Chem Neuropathol* 10(3): 185-200.