

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

EFEITOS DA INJEÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA NO HIPOCAMPO DE RATAS *WISTAR*

PATRÍCIA BENCKE GRUDZINSKI

ORIENTADOR

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2013

*“A diferença entre o possível e o impossível
está na vontade humana.”*

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Christianne Salbego pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade;

À Ana Paula Horn, minha orientadora, amiga e para sempre exemplo; pela paciência, por todos ensinamentos, pela ajuda, pela confiança e por plantar em mim a curiosidade e a felicidade da vida científica;

À minha amiga, colega e exemplo de pesquisadora Mariana Maier Gaelzer pela ajuda essencial nos experimentos, pelas conversas, pelas discussões de resultados e principalmente pela amizade;

Aos amigos do laboratório 23: Aline, Thaline, Daniéli, Elisa, Fabrício, André e Leon, em especial ao Rudimar Frozza e à Juliana Bender Hoppe por estarem sempre prontos a me ajudar quando precisei;

À minha bolsista de Iniciação Científica Alice Hoffman de Quadros pela ajuda nos experimentos e pela amizade conquistada;

Às minhas amigas e companheiras de mestrado Camila Rossetti e Fabiana Galland, pelas discussões sobre mestrado, ciência e pelo exemplo de pesquisadoras que são;

À Cléia por sempre me ajudar a resolver inúmeros problemas;

À Michele, Andreza e Júlia que estiveram sempre me apoiando e me segurando nos tropeços;

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado, apoiando e incentivando; meu exemplo de persistência, mãe e mulher;

Ao meu pai, meu exemplo acima de tudo, pelo apoio, pela compreensão e pelo incentivo;

Ao meu irmão, pelos momentos de descontração e pelo apoio;

À Cristiane Matté, minha relatora, pela ajuda e ensinamentos;

Às Dr^a Melissa Camassola e Dr^a Vanessa Schein por aceitarem participar da minha Banca Examinadora;

À CAPES pela bolsa de mestrado;

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	2
Lista de abreviaturas	3
INTRODUÇÃO	5
1. Doenças que afetam o Sistema Nervoso Central	5
2. Como o Sistema Nervoso Central reage a doenças neurodegenerativas	6
2.1. Morte neuronal, hipocampo e memória	6
2.2. Astrócitos, astrogliose reativa e neuroinflamação	9
2.3. Neurogênese	11
3. As células tronco	13
3.1. As células tronco mesenquimais e suas características	12
3.2. Efeitos das células tronco mesenquimais em doenças neurodegenerativas	15
3.3. Efeitos adversos das CTM	16
OBJETIVOS	
1. Objetivo geral	19
2. Objetivo específico	19
RESULTADOS	
CAPÍTULO I	20
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO	

Resumo

As doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e isquemia cerebral afetam uma grande parte da população e, na maioria das vezes, apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis. Essas doenças causam neuroinflamação, morte neuronal e afetam a vida cotidiana desses enfermos. Na última década, as células tronco mesenquimais surgiram como uma alternativa no tratamento dessas doenças. As células tronco mesenquimais são células indiferenciadas e imunoprivilegiadas, que contribuem na regeneração de lesões pela secreção de várias citocinas e fatores de crescimento. Vários estudos comprovam o efeito benéfico das células tronco mesenquimais em modelos *in vitro* e *in vivo* de doenças neurodegenerativas, porém até hoje não se conhece exatamente o mecanismo de ação dessas células. Estudos incipientes reportam um possível efeito adverso da terapia utilizando células tronco mesenquimais. Para entender melhor como essas células interagem com o tecido nervoso, o objetivo desse estudo foi administrar células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea no hipocampo de ratas *Wistar* e analisar marcadores específicos e o comportamento desses animais. Nossos resultados mostraram que as células tronco mesenquimais aumentam o imunoconteúdo de GFAP tanto no hipocampo ipsilateral quanto no contralateral à injeção. Sete dias após o procedimento cirúrgico, os níveis de GFAP retornam a níveis controle. Além disso, três dias após a injeção os níveis de beta-tubulina 3 diminuíram cerca de 25%, retornando a níveis de controle após sete dias, enquanto que o imunoconteúdo de NeuN, avaliado também três dias após a injeção das células tronco mesenquimais, não mostrou diferença do controle. Ainda, o imunoconteúdo de *doublecortin* também não foi diferente do controle. O teste comportamental de reconhecimento de objetos mostrou que ratas injetadas com células tronco mesenquimais apresentaram déficits de memória de curta e longa duração. Em conjunto, nossos resultados mostraram que a injeção de células tronco mesenquimais, derivadas de medula óssea no hipocampo de ratas *Wistar*, causou ativação astrocitária após três dias. Além disso, a presença de células tronco mesenquimais no hipocampo de ratas parece causar retração neuronal e déficit de memória e, no modelo e tempo utilizados neste trabalho, não ativou a neurogênese. Esses resultados sugerem um possível efeito adverso destas células, adicionando uma nota de cautela na utilização das mesmas.

Abstract

Neurodegenerative diseases as Alzheimer, Parkinson and stroke affect a large number of the population and only symptomatic treatments are available. These diseases cause neuroinflammation, neuronal death and affect everyday life of these patients. Therewith, bone marrow-derived mesenchymal stem cells emerged as an alternative to treatment of these diseases. Mesenchymal stem cells are undifferentiated and immunoprivileged cells which secrete many cytokines and growth factors that help the site of the lesion. Many *in vitro* and *in vivo* studies prove a benefic action of mesenchymal stem cells in models of neurodegenerative diseases, but, until today, the mechanism of action of these cells remains unclear. Recent studies reported a possible adverse effect of the treatment using mesenchymal stem cells. In order to understand how these cells interact with the neural tissue, the aim of this study was evaluate the effect of mesenchymal stem cells injection into hippocampus of *Wistar* rats and to analyze morphological and behavioral changes. Our results show that three days after the injection of mesenchymal stem cells, the immunoccontent of GFAP increases in both ipsilateral and contralateral hippocampus. After seven days of injection, GFAP immunoccontent returned to control levels. Furthermore, the immunoccontent of b-tubulin 3 in rats that received mesenchymal stem cells decreases 25% compared to the controls, returning to normal seven days latter. NeuN and Doublecortin immunoccontent, however, shows no differences from controls. In the novel object recognition task rats that received mesenchymal stem cells show deficit in short and long-term memory. Together, our results shown that mesenchymal stem cells in rats hippocampus causes astrocytic activation after three days. Also the presence of mesenchymal stem cells in hippocampus appear to cause neuronal cytoskeleton retraction. Our data suggest that the presence of this cells cause impairment on short and long-term memory, and do not activate neurogenesis in our model. These results suggest that a topic intratissue administration of mesenchymal stem cells might have possible side effects, adding a note of caution in utilization of these cells.

Lista de abreviaturas

AMPA: ácido alfa amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Brain Derived Neurothophic Factor*)

BHE: barreira hemato-encefálica

bFGF: fator de crescimento básico de fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor*)

BrdU: Bromodeoxiuridina

CA: corno de Ammon (*Cornus Ammonis*)

CDC: *Center for Disease Control and prevention*

CTM: células tronco mesenquimais

CTN: células tronco neurais

DCX: *doublecortin*

DG: giro denteado (*Dentate Girus*)

DMSO: dimetil sulfóxido

EGF: fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor*)

FGF: fator de crescimento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)

GDNF: fator neurotrófico derivado da glia (*Glial Derived Neurotrophic Factor*)

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (*Glial Fibrillary Acid Protein*)

HGF: fator de crescimento de hepatócitos (*Hepatocyte Growth Factor*)

IFN γ : interferon gama

IGF-1: fator de crescimento de insulina 1 (*Insulin Growth Factor 1*)

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

iPSs: células pluripotentes induzidas

MHC: complexo de histocompatibilidade principal (*Major Histocompatibility Complex*)

NK: células Natural Killer (*Natural Killer*)

NO: óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

NGF: fator de crescimento de nervos (*Nerve Growth Factor*)

NMDA: **N-Metil-D-Aspartato**

SCF: fator de célula tronco (*Stem Cell Factor*)

SNC: sistema nervoso central

VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

TGF β : fator de crescimento tumoral beta (*Tumor Growth Factor beta*)

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

ZSG: zona subgranular

ZSV: zona subventricular

INTRODUÇÃO

1. Doenças que afetam o Sistema Nervoso Central:

As doenças neurodegenerativas afetam diretamente as características que tornam a vida do ser humano tão especial, tais como a memória, a fala, a personalidade e os movimentos especializados. Dentre as desordens que afetam do Sistema Nervoso Central (SNC), podemos destacar, dentre outras, as desordens cerebrovasculares, a epilepsia, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla. Em conjunto, essas doenças afetam um grande segmento da população e, na maioria dos casos, levam à incapacidade física e/ou mental (Price, 1999).

Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) as doenças cerebrovasculares, como a isquemia, estão na quarta posição entre as maiores causas de morte na América do Norte, totalizando quase 129 mil mortes em 2011. A doença de Alzheimer está na sexta posição com quase 85 mil mortes, e a doença de Parkinson se encontra na posição 14 das maiores causas de óbito (CDC, 2011).

No Brasil, as doenças cerebrovasculares são responsáveis por 10% das mortes segundo pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde, com um número de óbitos ultrapassando os 90.000, correspondendo a 10% da mortalidade no país. Outro dado importante é que as doenças circulatórias (aqui incluídas a isquemia cerebral e a isquemia cardíaca) são a principal causa de morte em

todas as regiões brasileiras, tanto para homens quanto para mulheres acima dos 40 anos (Ministério da Saúde, 2008).

Cada uma dessas patologias tem suas próprias características, afetando diferentes populações de neurônios em diferentes locais do SNC. Um ponto em comum nessas doenças parece ser a presença do componente neurodegenerativo e inflamatório, que na maioria das vezes contribui para acelerar a degeneração (Floden et al., 2005; Mosley et al., 2006; Sriran e O'Callaghan, 2007; Wang et al., 2007a).

Para cada uma dessas doenças a cura está longe de ser uma possibilidade e apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis. Pela dificuldade de tratamento ainda hoje enfrentada, novas estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas. Nesse contexto a terapia celular utilizando células tronco surge como uma alternativa para doenças que acometem o SNC.

2. Como o Sistema Nervoso Central reage a doenças neurodegenerativas:

Cada uma das doenças listadas acima, apesar de afetar diferentes regiões do SNC e apresentar mecanismos próprios, converge para pontos comuns tais como a morte neuronal e a inflamação.

2.1. Morte neuronal, hipocampo e memória:

Os neurônios são células diferenciadas, altamente especializadas e que não se dividem. O entendimento dos mecanismos que levam à disfunção e à morte neuronal é a chave para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a isquemia cerebral e o Alzheimer.

A isquemia cerebral é o resultado de uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo ao cérebro. O tipo mais freqüente é a isquemia focal onde o fluxo sanguíneo é interrompido apenas para uma parte do cérebro. Na isquemia global, ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo para todo o cérebro, o que ocorre durante uma parada cardíaca por exemplo. A resposta fisiopatológica que ocorre na isquemia é altamente complexa e envolve mecanismos como excitotoxicidade, formação de espécies reativas e inflamação, levando a disfunção e morte neuronal (Xing et al., 2012). A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral pode gerar sequelas, como dano cerebral permanente, que resulta em disfunção cognitiva e motora (Gabryel et al., 2012).

O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva relacionada ao envelhecimento, sendo caracterizada pelo declínio cognitivo progressivo, associado com perda de memória, desorientação espacial e dificuldades na realização de atividades diárias. A fisiopatologia dessa doença está ligada à deposição extracelular do peptídeo β -amiloide em placas senis e aos emaranhados neurofibrilares causados pela hiperfosforilação da proteína tau, que finalmente levam a morte neuronal progressiva (Frozza et al., 2013).

Tanto na isquemia cerebral global como na doença de Alzheimer a morte neuronal é significativa principalmente no hipocampo (Min et al., 2012). O hipocampo é uma estrutura cerebral complexa e altamente organizada, que está envolvida na codificação, armazenamento, resgate e aplicação de informações, estando assim associado com aprendizado e memória. O hipocampo recebe aferências vindas de outras estruturas cerebrais e a informação recebida é analisada e processada através de processos

moleculares específicos e mecanismos sinápticos estruturais e funcionais (Maras e Baram, 2012; Yassa e Stark, 2012). Essa estrutura é dividida em duas sub-regiões: O giro dentado (DG), onde encontramos neurônios granulares, e o Corno de Amom (CA)1, CA2 e CA3, que são compostos por neurônios piramidais (Song et al., 2012).

O hipocampo é uma das regiões mais sensíveis do cérebro aos efeitos da isquemia global e as distintas sub-regiões mostram vulnerabilidades diferentes. A morte neuronal é mais significativa na região CA1, enquanto a região do DG mostra-se mais resistente (Horn et al., 2005; Min et al., 2012). A perda de memória e a deficiência de funções cognitivas são sinais clássicos observados em pacientes com a doença de Alzheimer, e se devem, também, à morte neuronal acentuada que ocorre no hipocampo (Mu e Cage, 2011; Frozza et al., 2013).

A formação da memória é um processo altamente dinâmico. A consolidação da memória é determinante na preservação de um aprendizado, ela determinará se a memória será preservada após a codificação (Nadel et al., 2012). A característica principal da disfunção da memória após um dano hipocampal é a falta de habilidade em lembrar eventos, e o hipocampo parece ser necessário para a inicial formação e consolidação de memórias (Stella et al., 2012).

Lesões hipocampais podem afetar memória de curto e longo prazo. Danos no hipocampo levam à prejuízo em memória de curto prazo, que é relacionada com retenção de memórias de estímulos visuais envolvendo novos objetos e padrões. A memória de longa duração refere-se ao que pode ser resgatado de um aprendizado ou situação vivida no passado e também pode

ser prejudicada em danos hipocampais (Jeneson e Squire, 2011). Para a avaliação dessas memórias, testes comportamentais como o labirinto aquático de Morris, a esQUIVA inibitória e o reconhecimento de objetos são amplamente utilizados em modelos animais (Oliveira et al., 2008; Sutherland et al., 2010; Lee et al., 2012).

Pela relevância do dano hipocampal, principalmente pela formação e armazenamento da memória que é prejudicada em doenças neurodegenerativas, o hipocampo foi o alvo do nosso estudo.

2.2. Astrócitos, astrogliose reativa e neuroinflamação:

Os astrócitos são células gliais especializadas e as mais abundantes no SNC. Atuam regulando o fluxo sanguíneo para o cérebro; por meio da barreira hemato-encefálica (BHE), fornecendo metabólitos energéticos para os neurônios, participando da função sináptica de neurotransmissores, da plasticidade neuronal e da homeostase metabólica e de neurotransmissores (Chvátal et al., 2008; Sofroniew, 2009). Expressam numerosos receptores, o que os capacita a responder a praticamente todos os compostos neuroativos, como neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento, citocinas e toxinas (Liberto et al., 2004).

Em patologias do SNC, ocorre o que chamamos de astrogliose reativa, que é caracterizada por mudanças moleculares e morfológicas dos astrócitos, podendo ser acompanhada por respostas inflamatórias, dano neuronal e formação de cicatriz glial (Kang e Hébert, 2011).

Na astrogliose reativa vemos a hipertrofia dos corpos e processos celulares, a proliferação dos astrócitos, e o aumento na expressão de proteínas

como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e vimentina. Essas mudanças morfológicas e moleculares podem resultar em uma reorganização permanente da arquitetura do tecido neuronal. Em casos onde a ativação glial é mais severa, podemos ter a formação de uma cicatriz glial, caracterizada pela sobreposição dos processos astrocitários, por uma proliferação celular acentuada, e pela formação de uma densa, estreita e compacta cicatriz no tecido (Sofroniew e Vinters, 2010).

Juntamente com a microglia, os astrócitos participam da inflamação no SNC e a astrogliose reativa pode ser tanto benéfica como prejudicial. Funções benéficas dos astrócitos incluem o reparo da BHE, a proteção dos neurônios frente ao dano e a restrição do avanço da neuroinflamação. Por outro lado, os astrócitos podem exacerbar a inflamação pela produção de citocinas, produzir e liberar espécies reativas de oxigênio, intensificar a excitotoxicidade glutamatérgica e comprometer a BHE (Sofroniew, 2009).

A neuroinflamação é um complexo e dinâmico processo, que combina a ativação de células como a microglia e astrócitos, envolvendo sinais químicos e rotas de sinalização. É uma resposta adaptativa para restaurar a homeostase do tecido neural (Jacobs et al., 2012). Mesmo o SNC sendo um órgão considerado imunoprivilegiado, graças à permeabilidade seletiva da BHE, em casos de inflamação há a ruptura dessa barreira levando à infiltração de células do sistema imune periférico, principalmente de leucócitos (Erickson et al., 2012). A inflamação pode ser benéfica e contribuir para o reparo e regeneração do tecido, porém quando é excessiva ou persistente pode ser prejudicial.

Para cada uma dessas doenças neurodegenerativas a inflamação tem um rota indutora diferente, porém a ativação de células imunes inatas do SNC,

como a microglia e os astrócitos é o componente universal da neuroinflamação. Independente do estímulo, uma vez induzida a inflamação e perpetuada, essa rota leva à amplificação de respostas inflamatórias, neurotoxicidade e morte neuronal como exemplificado na figura 1 (Glass et al., 2010).

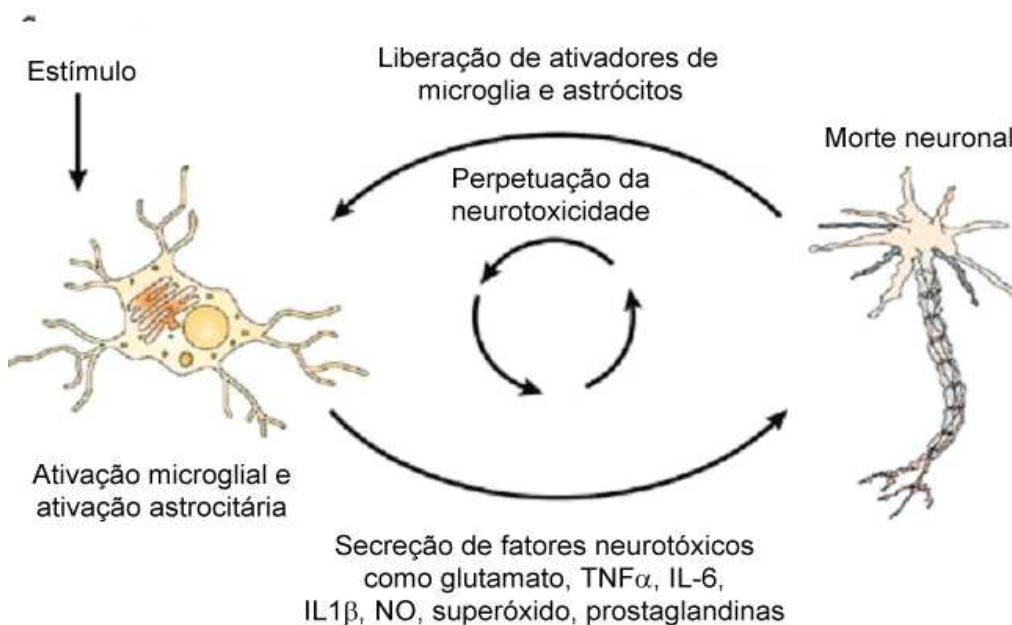


Figura 1: Participação da ativação glial na morte neuronal. Adaptada de Block e colaboradores (2007). $TNF-\alpha$: fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL1 β : interleucina 1 beta; NO: óxido nítrico.

2.3. Neurogênese:

Durante muitos anos, a vulnerabilidade do SNC a qualquer tipo de lesão foi atribuída à falta de fontes que pudessem repor as células mortas. Porém, muitos pesquisadores mostraram, ao longo dos últimos anos, que células tronco neurais (CTN), bem como células progenitoras neurais, persistem no organismo de mamíferos adultos, surgindo assim uma nova esperança no tratamento de doenças que afetam o SNC (Ohiri et al., 2006).

A neurogênese no cérebro adulto ocorre na zona subgranular (ZSG) do DG no hipocampo, e na zona subventricular (ZSV) (Xiong et al., 2010). É um processo bem orquestrado com múltiplos passos como a proliferação, diferenciação e maturação de CTN encontradas nas regiões listadas acima, resultando na formação de novos neurônios (Maltman et al., 2011; Jhaveri et al., 2012). Sabe-se que a neurogênese é uma resposta natural do cérebro que sofre uma lesão, numa tentativa de regeneração, porém evidências médicas sugerem que o baixo nível de neurogênese que ocorre em adultos não é funcionalmente relevante para a recuperação do tecido lesionado (Uccelli et al., 2011).

Para a detecção de neurogênese usualmente utiliza-se a injeção de bromodeoxiuridina (BrdU), que é um nucleosídeo sintético análogo da timina, que se intercala ao DNA quando uma célula se divide (Li et al., 2013). Outra maneira é com a avaliação do imunoconteúdo de doublecortina (DCX), que é uma proteína associada à microtúbulos expressa em precursores neurais e neurônios imaturos (Nodari et al., 2010). Estudos mostram que na doença de Alzheimer há uma diminuição da neurogênese em modelos animais, e que depois de um episódio isquêmico parece haver um aumento na neurogênese na ZSV e na ZSG do hipocampo (Thompson et al., 2008).

3. As células tronco:

As células tronco podem ser definidas como células com capacidade de auto renovação e capazes de originar um descendente diferenciado (da Silva Meirelles et al., 2006). Dentre as células tronco mais estudadas e candidatas a

uma futura utilização clínica estão: (1) as *células tronco embrionárias*, que podem gerar teratomas quando administradas *in vivo*, além de carregar consigo problemas éticos e religiosos (Blum e Benvenisty, 2008); (2) as *células pluripotentes induzidas* (iPSs) que, embora promissoras, ainda necessitam vetores virais para sua geração e nessas condições têm sua utilização na clínica bastante questionada (Nishikava et al., 2008); (3) e as *células tronco adultas*, sendo representadas pelas CTNs, hematopoiéticas e CTMs, dentre outras (Mimeault e Batra, 2006). Essas apresentam-se, no momento, como as mais promissoras.

3.1. As células tronco mesenquimais e suas características:

As células tronco mesenquimais (CTM) são definidas como células multipotentes, capazes de originar tecidos de origem mesodérmica como o cartilagenoso, o ósseo, o adiposo e o muscular (Baksh et al., 2004). São encontradas em praticamente todos os órgãos do corpo, como na medula óssea, no tecido adiposo e no cordão umbilical, entre outros (da Silva Meirelles et al., 2006). Acredita-se que estejam situadas no corpo como pericitos, com a função de estabilizar os vasos sanguíneos e contribuir para a homeostase dos tecidos (da Silva Meirelles et al., 2008).

Sua popularidade deve-se ao fato de serem células de fácil obtenção (como pela aspiração da medula óssea ou por um lipoaspirado), são de fácil manutenção, não tem conflitos éticos envolvidos (como as células tronco embrionárias) e tem a possibilidade de transplante autólogo (sem rejeição como na maioria dos transplantes). Sua manutenção em cultura é simples, pois

elas se aderem ao plástico e podem ser facilmente expandidas *in vitro* (Sotiropoulou et al., 2005; Horn et al., 2009).

As CTM secretam várias citocinas como interferon gama (IFN- γ), TNF α , fator de crescimento tumoral beta (TGF β), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 6 (IL-6) (Karnoub et al., 2007). Ainda, secreta fatores de crescimento como fator neurotrófico derivado de linhagem glial (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento de nervos (NGF), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), entre outros (Borlogan et al., 2011). Essa característica das CTM faz com que sejam denominadas “fábricas tróficas”, sendo uma esperança no tratamento de patologias.

Outra vantagem das CTM é que possuem um status imunoprivilegiado. Elas expressam baixos níveis de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e não possuem MHC classe II, não expressando também as moléculas de superfície CD40, CD80 e CD86, o que permite seu transplante em tecidos alogênicos com um risco menor de rejeição. As CTM mostraram efeito supressor sobre células do sistema imune como células T, B e *Natural Killer* (NK), prevenindo a capacidade dessas células de responder a sinais antigênicos (Stagg, 2006; Uccelli et al., 2007; Wong, 2011).

As CTM também são de se transdiferenciar (termo comumente utilizado para descrever a habilidade das células tronco adultas em originarem células de tecidos onde elas não residem ou células de outros folhetos embrionários) (Krabbe et al., 2005). Muitos trabalhos mostraram a trans-diferenciação de CTM em células do SNC como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos

(Woodbury et al., 2000; Suzuki et al., 2004; Nagai et al., 2007; Ying et al., 2012). Porém há muita discussão em torno da real diferenciação das CTM em células de tecidos que não sejam de origem mesodérmica. A transdiferenciação dessas células pode ser devido a mudanças citotóxicas decorrente da utilização do protocolo de transdiferenciação, criando um artefato (Krabbe et al., 2005).

3.2. Efeitos das CTM em doenças neurodegenerativas:

Vários estudos investigam o uso de células tronco como uma alternativa para o tratamento de doenças neurodegenerativas. As CTM mostraram proteger células tronco neurais contra efeitos citotóxicos da 6-hidroxidopamina, em um modelo *in vitro* da doença de Parkinson (Cova et al., 2012). Em um modelo animal da doença de Alzheimer, ajudaram na redução da deposição do peptídeo β -amilóide, no aumento da ativação microglial, na redução dos níveis de estresse oxidativo e na apoptose (Lee et al., 2009; Lee et al., 2010). Em modelos animais de isquemia, a utilização de CTM diminuiu a inflamação e ativação astrocitária, melhorou déficits neurológicos, diminuiu o volume da lesão e aumentou a sobrevivência neuronal (Isele et al., 2007; Keimpema et al., 2009; Perasso et al., 2010).

Estudos mostraram que os efeitos das CTM não são dependentes do contato direto entre as células, sendo a eficácia nesses estudos atribuída aos fatores tróficos que essas células secretam, capazes de estimular mecanismos endógenos de reparo (Sarnowska et al., 2009; Wei et al., 2012; Uccelli et al., 2011). A figura apresenta os principais possíveis efeitos neuroprotetores das CTM.

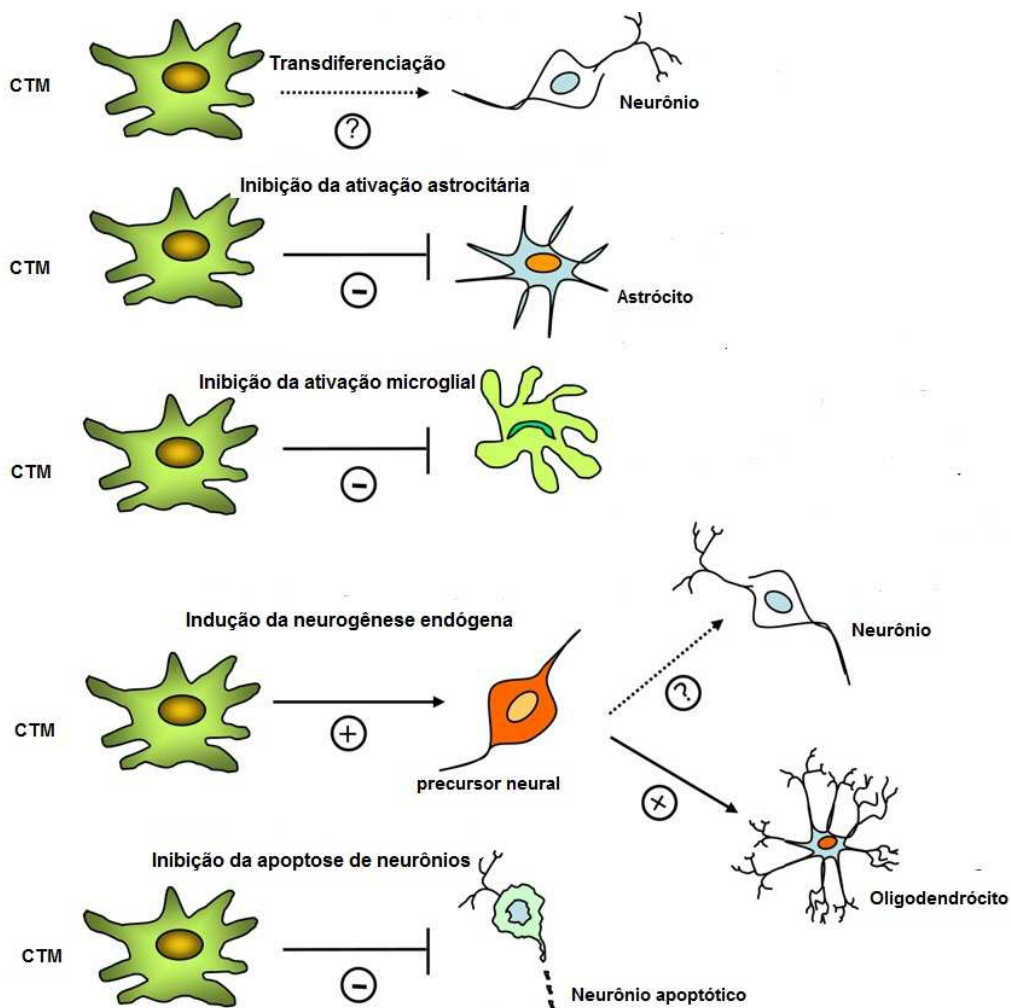


Figura 3: Principais efeitos neuroprotetores das CTM. As linhas pontilhadas indicam a falta de uma forte evidência para o fenômeno. Adaptada de Uccelli e colaboradores (Uccelli et al., 2011).

3.3. Efeitos adversos das CTM:

Apesar de muitos estudos mostrarem o efeito benéfico das CTM, alguns trabalhos descritos na literatura já demonstraram efeitos adversos do uso destas células em modelos animais. Dentre eles temos os estudos realizados por Djouad e colaboradores (2003), onde os autores mostram que a

administração tanto subcutânea quanto intravenosa de CTM em camundongos favoreceu o desenvolvimento de tumor de melanoma, sendo esse efeito atribuído à capacidade imunossupressora sistêmica dessas células (Djouad et al., 2003). Além disso, Karnoub e colaboradores mostraram que CTM humanas aumentam o potencial metastático de células de tumor de mama, provavelmente por seu efeito parácrino nessas células (Karnoub et al., 2007). Ainda, Fazel e colaboradores (2008) mostraram que, apesar de melhorarem a função cardíaca num modelo de infarto do miocárdio, CTMs geneticamente modificadas para aumentarem a expressão de fator de célula tronco (SCF) induziram a formação de fibrosarcomas e de metástases em 4 dos 20 animais injetados (Fazel et al., 2008).

O uso de CTM em modelos animais de doenças neurodegenerativas vem sendo amplamente pesquisado como descrito acima, porém não se conhece o mecanismo molecular do efeito exercido por essas células. Coyne e colaboradores em 2006 publicaram um estudo onde as CTM de medula óssea foram transplantadas no hipocampo ou estriado de animais sem lesão para tentar responder a questões referentes ao efeito das CTM no SNC. Os resultados mostraram que as células foram rejeitadas por resposta inflamatória e que a marcação das CTM com BrdU foi transferida para astrócitos e microglia (Coyne et al., 2006).

Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que fatores secretados por CTM foram tóxicos seletivamente às células das regiões CA1, CA2 e CA3 de culturas organotípicas de hipocampo de ratos. Além disso, esses fatores agravaram a morte celular após privação de oxigênio e glicose, um modelo de lesão *in vitro* para simulação de uma isquemia cerebral global.

Demonstramos também que o mecanismo de morte celular disparado pelas CTM no hipocampo envolve excitotoxicidade via receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e canais de cálcio dependentes de voltagem (Horn et al., 2009). Ainda, nossos resultados mostraram claramente que os fatores secretados pelas CTM induzem neuroinflamação, onde a ativação glial, o aumento no estresse oxidativo e o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias são evidentes (Horn et al., 2011).

OBJETIVOS

1. Objetivo geral:

Investigar o efeito da injeção intra-hipocampal de CTM, obtidas de medula óssea, em ratas *Wistar*, avaliando parâmetros como neuroinflamação, degeneração neuronal e memória.

2. Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o efeito CTM sobre as células do hipocampo, avaliando parâmetros de ativação glial;
- ✓ Avaliar o efeito das CTM sobre as células do hipocampo, avaliando alterações morfológicas e/ou morte neuronal;
- ✓ Investigar se as CTM causam possíveis déficits na memória de curta e longa duração em animais que receberam essas células intra-hipocampalmente por meio de cirurgia estereotáxica.

CAPÍTULO I

Os resultados deste trabalho resultaram em um artigo científico a ser submetido ao periódico Stem Cell Studies.

EFFECTS OF THE INJECTION OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS INTO HIPPOCAMPUS OF *WISTAR* RATS

Patrícia Bencke Grudzinski, Ana Paula Horn, Mariana Maier Gaelzer, Rudimar
Luis Frozza, Alice Hoffman de Quadros e Christianne Salbego

Periódico: Stem Cell Studies

Status: a ser submetido

**Effects of injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into
hippocampus of *Wistar* rats.**

Patrícia Bencke Grudzinski¹, Ana Paula Horn², Mariana Maier Gaelzer¹,
Rudimar Luis Frozza¹, Alice Hoffman de Quadros¹ and Christianne Salbego¹

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Rio Grande, Brazil.

Correspondence: Christianne Salbego, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo I, Laboratório 37, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3308.5548 ; FAX: +55 (51) 3308.5535

E-mail: salbego@terra.com.br

Acknowledgments:

This research was supported by the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Patrícia Bencke Grudzinski received a CAPES master's degree fellowship.

Key words : mesenchymal stem cells, hippocampus

Contributions: PBG, APH, MMG, RLF, AHQ collecting and analyzing data; PBG, manuscript writing; APH, CS manuscript reviewing.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Funding: the work was supported by CNPq and CAPES.

Abstract

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) are a new hope in the treatment of neurodegenerative diseases. Several studies have brought beneficial effects of these cells in animal models of stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, among others disorders. However, the mechanisms that MSC acts are still poorly understood. The aim of this study was to have a better understanding on the interactions between the MSC and the neural tissue. For this purpose, female Wistar rats were injected with MSC into hippocampus. Histological, neurochemical and mnemonic parameters were evaluated. The injection of MSC increase the immunoccontent of GFAP, three days after the surgical procedure, and returned to control levels after seven days. In a similar way, three days after the injection β -tubulin 3 immunoccontent decreased almost 25%, and return to normal after seven days. The immunoccontent of NeuN and doublecortin was not affected by MSC injection. The behavioral test of novel object recognition showed impairment in short and long-term memory. Together, our results suggest that MSC transplanted to rat hippocampus cause reactive astrogliosis, neuronal cytoskeleton alteration and memory deficit to the animals.

Introduction

Neurodegenerative diseases as Parkinson's disease, Alzheimer's disease and cerebrovascular disorders together generated more than 230 thousand deaths in United States in 2011.¹ Unfortunately, only symptomatic treatments are available, which supports the search for new strategies for therapy like stem cells.

Each one of these disorders has different triggers and differs on affected regions of the brain, although they share some characteristics like microglial and astrocytic activation and progressive neuronal death.^{2,3} Inflammation possesses two distinct aspects, may be beneficial promoting tissue regeneration, or otherwise can induce cell damage. The persistent neuroinflammation aggravates the physiopathogenic of the neurodegenerative diseases and appears to be related with massive neuronal death.^{4,5}

Recently, has increased the interest on bone marrow-derived MSC therapy due their self-renewal capacity, trans-differentiation potential, easy to harvest, and the production and secretion of a numerous neurotrophic factors. MSC can release cytokines such as interferon γ , tumor necrosis factor α , tumor necrosis β , interleukin 4 and 6 and growth factors like glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and vascular endothelial growth factors.⁶ Other characteristic of MSC is the immunosuppressive properties, specifically suppressing the function of T and B cells proliferation, inhibiting the capacity of these cells to respond an antigenic signs.⁷

Several studies showed a beneficial effect of MSC *in vivo* and *in vitro* in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and brain ischemia.⁸⁻¹⁰ It has been shown that MSC decreased microglial and astrocytic activation, decreased apoptotic and oxidative stress levels, and increased neuronal survival.^{11,12} The effects of MSC do not appear to be through trans-differentiation of these cells into

neurons, but probably due they ability to release trophic factors and by this way stimulate neurogenesis and endogenous repair mechanism.¹³

Although the literature brings positive results of the use of MSC, little is known about the basic biology and the interaction with neural cells. Some studies showed adverse effects of the MSC, like development of tumors.^{6,14} Coyne et al. reported that MSC transplantation in hippocampus and striatum of rats was rejected by inflammatory response.¹⁵

Previous studies of our lab showed that factors secreted by MSC was selectively toxic to CA1, CA2, and CA3 cells in rat hippocampal organotypic cultures and also these factors aggravate the lesion caused by oxygen and glucose deprivation.¹⁶ Furthermore we showed that MSC conditioned medium triggers neuroinflammation and oxidative stress.¹⁷ In an attempt to understand how MSC interact with neural cells, the aim of this study was to investigate the effect of MSC injection in rat hippocampus on parameters of astrocytic activation, neuron morphology, neurogenesis, and memory.

Materials and Methods

Materials

HEPES, anti-GFAP and Cresyl violet were purchased from Sigma. Culture medium, Hank's balanced solution (HBSS), fungizone, trypsin/EDTA solution and fetal bovine serum (FBS) were from Gibco, gentamicin from Schering-Plough. Anti- β -tubulin 3 and anti-doublecortin were purchased from Cell Signaling, anti-GFAP from Sigma, and anti-NeuN from Millipore. Anti-rabbit and anti-mouse IgG peroxidase conjugated and reagents to detect chemiluminescence (ECL) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech. Hybond-C nitrocellulose membranes were from Hybond™ ECL™ (Hybond™ ECL™ nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences). X-ray films were from Kodak (Kodak X-Omat).

Animals:

Thirty to forty days old female *Wistar* rats were obtained from in-house breeding colonies at the Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brazil). Animals were housed in cages under optimum light, temperature and humidity conditions with food and water provided *ad libitum*. All procedures were approved by the local Ethics Committee on the Use of Animals. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

MSC culture:

MSC cultures were prepared according to the method described by Da Silva Meirelles et al.¹⁸ Briefly, bone marrow was obtained from adult *Wistar* rats, which were anesthetized and killed by cervical dislocation. Bone marrow was flushed out of femurs. After washing by centrifugation at 400g for 10 min and counting viable cells with trypan blue, the cells were suspended in DMEM with 10% FBS and 10mM HEPES in a final concentration of 5×10^6 viable cells/mL. Cells were plated in 6-well tissue culture dishes at 3mL/well and kept in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C for 24h, when non adherent cells were removed by changing the medium. Confluent cultures from MSCs were incubated with 0.25% trypsin solution containing 0.01% EDTA for detachment and maintained in culture by changing the medium every 3–4 days. The cells were used between the 8th to 20th passages.

Surgical procedure:

The animals were anesthetized with ketamin and xilazin (90mg/kg and 6mg/kg respectively) intraperitoneally and placed in a stereotaxic frame. After sterilized using standard procedures, a middle sagittal incision was made in the scalp and a hole was drilled using a dental drill over the right side of the skull. Injection coordinates was chosen according the atlas of Paxinos and Watson: 3,5mm posterior to bregma, 2,0mm

lateral to the sagittal, and 2,7mm beneath the surface of brain.¹⁹ Rats received 3 μ L of MSC (100.000 cells) or 3 μ L of HBSS (control) by a 10 μ L Hamilton syringe made of rate of 1 μ L/min over a period of 3 min. At the end of infusion, the needle was left in place for additional 3 min before being slowly withdraw to allow diffusion from the tip and prevent reflux of the solution. After the injection the scalp was sutured and the animals were allowed to recover from anesthesia before returning to the animal facility.

Western Blotting assay:

In order to evaluate the effect of MSC on neural tissue we performed the Western Blotting assay. Three days after surgical procedure and after finished the behavioral test (7th day), rats were killed by decapitation, the brain was rapidly removed and the hippocampi were dissected. They were homogenized in a lysis buffer, aliquots were taken for protein determination, and b-mercaptoethanol was added. Proteins were resolved (25mg/lane) by 8% or 10% dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis. After, proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer apparatus. Membranes were incubated for 60 min at 4^oC in blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% powdered skim milk and 0,1% Tween-20, pH7.4) and were incubated with primaries antibodies overnight: anti- β -tubulin 3 (1:100), anti-GFAP (1:1000), anti-NeuN (1:1000) and anti-doublecortin (1:1000). After, the membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody for 2h. The chemiluminescence was detected using X-ray films. The films were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packerd Instruments). Data was expressed as percentage of control rats.

Nissl staining

Three and/or seven days after the surgical procedure, the animals were anesthetized with ketamin and xilazin (90mg/kg and 60mg/kg respectively) intraperitonially and were transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde. Brains were

removed, cryopreserved and coronal sections (20 μ m) of the site of injection were made in cryostat and the staining was made with 0,1% Cresyl violet. Photomicrography of the whole hippocampus and CA1, CA2 and CA3 (200 X magnification), were made to evaluate neuronal integrity.

Novel object recognition task:

The object recognition task was performed according to Bevins et al.²⁰ This test is based on the spontaneous tendency of rodents to explore novel objects and was performed in an apparatus made of black wood covered with impermeable Formica (dimensions, 40x50x50). The objects used have similar texture, colors and sizes, but different shapes. Objects were placed near the two corners at either end of one side of the apparatus. In the training session the rats were leaving to the apparatus containing two identical objects (A and A1) and explored it. Three hours later the first testing session to evaluate short-term memory was performed. The rats were allowed to explore the same apparatus but with two dissimilar objects: the familiar object used in the training session and a novel one (A and B respectively). Long-term recognition memory was evaluated 24h after the training and a different pair of dissimilar objects (a familiar and a novel one, A and C, respectively) were used. In all sessions, each rat was always placed in the apparatus facing the wall and allowed to explore the objects for 5 min. Behavior was analyzed using appropriated video-tracking software (ANYmaze®). The percentage of time spent exploring the novel object was calculated as a function of the total amount time spent exploring both objects. A higher percentage of time spent exploring the novel object was considered to be an index of enhanced cognitive performance (recognition index). Active exploration was defined by directing the nose to the object at a distance of no more than 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws. The training session was made after 6 days of the surgical procedure.

Statistical Analysis:

To western blot assay statistical analysis was made by t-test to paired samples and data were expressed as mean±standard deviation. To novel object recognition test was used the Mann Whitney test and the data are represented by median with interquarlite range. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

The injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hippocampus triggers reactive astrogliosis

Three days after the surgical procedure the immunocontent of GFAP (a cytoskeletal protein of astrocytes) increased significantly in the ipsilateral (right) hippocampus, as well as in the contralateral (left) hippocampus of rats that received MSC when compared to the controls (Figure 1A). However, after 7 days of the injection, GFAP immunocontent was similar in both groups, injected or control animals (Figure 1B). These results suggest that the injection of MSC caused a transient reactive astrogliosis in both hippocampi, detected 3 days after the surgical procedure.

The presence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cause neuronal retraction

Three days after injection of MSC into hippocampus, the immunocontent of beta-tubulin 3 (a neuronal cytoskeleton protein) decreased around 25% in the ipsilateral hippocampus when compared to the controls (Figure 2A). Seven days after the procedure, the immunocontent of beta-tubulin 3 was similar to control animals (Figure 2B). In order to evaluate if these results were due to a decrease in the number of neurons, we performed the analysis of NeuN immunocontent (a nuclear protein of

mature neurons). Three days after the injection of MSC, the immunoccontent of NeuN showed no difference compared to control animals (Figure 2C). Also, we perform a Nissl staining of hippocampal slices which showed that the injection of MSC cells did not alter the histopathology of the cells of hippocampus, despite showing reactive gliosis (Figure 3, arrow). These results led us to believe that there were some degree of neuronal cytoskeleton retraction could be happening.

The administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hippocampus do not increase neurogenesis

The immunoccontent of doublecortin (protein present in immature neurons), in the hippocampus of injected animals did not show any difference compared to the controls animals (Figure 4). These results suggest that MSC do not increase neurogenesis in rat hippocampus in this model.

The injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hippocampus induce memory deficit

In order to evaluate if the presence of MSC into hippocampus could induce any effect on rat memory, we performed a behavioral test of novel recognition task six days after the surgical procedure. As we can see in figure 5, rats that received MSC were not able to discriminate between the familiar and novel object in the short-term memory test, showing that treated animals have a low recognition index compared to the control animals (Figure 5A). Similar results were found in the long-term memory test (Figure 5B). These results indicate that rats that received MSC injection have deficit in short and long-term memory.

Discussion

Our results show that MSC injection into hippocampus of *Wistar* rats triggers reactive astroglia three days after the implant and did not alter neuron morphology,

but appears to induce a neuronal cytoskeleton retraction. Also, the presence of MSC did not induce neurogenesis in hippocampus. However, rats that received MSC injection presented impairment in short and long-term memory in a behavioral analysis. Together, these results suggest an adverse effect on presence of MSC into hippocampus.

Even with many studies showing the benefic effect of stem cell transplantation in neurodegenerative diseases, until today, the mechanism of interaction with neural tissue remain poorly understood.^{21,22} Some studies have already demonstrated the adverse effect of MSC utilization.¹⁴⁻¹⁷

The stem cells are known by their immunosuppressive properties and secrete several factors that participated in the modulation of immune system.²³ Several studies have shown that the beneficial effect of MSC is based in the capacity of these cells to decrease inflammatory responses on neurodegenerative diseases.²⁴ In pathological conditions, activated astrocytes triggers reactive gliosis which is observed by the increase of GFAP.¹⁷

Our results showed an increase in the immunocontent of GFAP three days after the MSC transplantation in both hippocampus (Figures 1A and 3, arrow) indicating a global astrocytic activation. The astrocytes release many growth factors and cytokines that depending of the concentration can improve or worsen previous injuries.²⁵ As neurodegenerative diseases already induce active gliosis, the presence of MSC could aggravate this reaction. However, seven days after the MSC injection the levels of GFAP returned to that observed in controls (Figure 1B), suggesting that the active gliosis is evidenced in the first days of the transplantation, or that MSC are rejected by an inflammatory process. Coyne et al., showed that MSC transplanted in to hippocampus of rats were rejected near completely after seven days.¹⁵

The beta-tubulin 3 protein is found in mature neuronal cytoskeleton and is widely used as a neuron marker. Our results showed a significant decrease in the immunocontent of this protein in the ipsilateral hippocampus after three days of MSC

injection, suggesting an important alteration of this neuronal protein (Figure 2A). However, after seven days of the MSC transplantation, the beta-tubulin 3 level was similar to that observed in the control (Figure 2B). To better understand these results, we investigated the NeuN protein, a nuclear neuronal protein that is also used as neuron marker. Three days after the transplantation the immunocontent of NeuN did not showed difference to the controls (Figure 2C). Moreover, the Nissl staining did not show histopathologic changes in hippocampus neurons (Figure 3).

We hypothesized that the reason of the decrease of b-tubulin 3 protein level in three days is due a neuronal cytoskeletal retraction. Many neurodegenerative diseases and injuries to the central nervous system (CNS) cause axonal and dendritic atrophy, and this appears to contribute to clinical symptoms presented by patients and to the first cause of neuronal death.²⁶ In some cases the neuronal retraction could be reverted and some authors have referred to this fact the remodeling neuronal network.²⁷ However, this neuronal remodeling could be detrimental to hippocampus which is closely linked to learning and memory, as we will discuss later.

In the adult CNS there are two major zones rich in neuronal precursors: the subventricular zone and the subgranular zone (SGZ) of dentate girus (DG) of hippocampus. In cases of injury, this areas are responsible for generate new neurons (neurogenesis), but unfortunately the number of neurons generated is not functionally relevant to the recovery of damaged tissue.²⁸ In some studies with MSC transplantation is thought that the factors released by MSC could induce neurogenesis and the improvement observed would be for direct or indirect action of these cells on the generation of new neurons.¹³

The coordinates correspondent to hippocampus used in this work, allowed us to graft the MSC centrally in the hilus of the dorsal DG. Even the local site of the injection being close to the SGZ, our results did not show differences in the immunocontent of doublecortin compared with controls (Figure 4). These results suggest that MSC did not induce neurogenesis in this model. However, we did not know if in the presence of

a lesion, the factors secreted by MSC could induce and/or enhance the generation of new neurons.

In neurodegenerative diseases and global ischemia, the most affected region is the hippocampus. It is well known that an injury in the hippocampus generate an impairment of memory and learning which could be verified by numerous of behavior tests. In our study we used a novel object recognition task which evaluates the recognition memory, which is highly dependent of the hippocampal systems.²⁹ We observed that rats which received MSC injection did not show any difference in the exploration of the familiar and the novel objects, suggesting impairment in short and long-term memory (Figure 5).

Even not occurring a decrease in the number of neurons in this model, the memory deficit could be explained by the neuronal retraction. Our data suggest that the neuronal retraction could be reversed, as observed by the levels of beta-tubulin 3 protein after seven days of the injection (Figure 2B), and this could be detrimental to the memory. The reversal process can lead to abnormal growth and errors in orientation of neuronal process and the neuronal retraction induced in hippocampus could be harmful to learning and memory.³⁰ However, a more specific analysis should be done to endorse this hypothesis.

Together, our results raise a note of caution on the possible adverse effects of the use of MSC in the CNS. More studies should be done to try a better understanding of the mechanism of action of these cells.

References

1. Center of Disease Control and prevention. Deaths: Preliminary Data for 2011. Center of Disease Control and prevention; 2011. Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>.
2. Frozza RL, Bernardi A, Hoppe JB, et al. Neuroprotective effects of Resveratrol against A β administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. *Mol Neurobiol* [in press] 2013.
3. Xing C, Arai K, LO EH, Homel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 2012; 7:378-85.
4. Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp* 2012; 60:251-66.
5. Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2012; 62:2154-68.
6. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449:557-563.
7. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007; 28:219-26.
8. Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett* 2009; 450:136-41.
9. Cova L, Bossolasco P, Armentero MT, et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on neural cultures exposed to 6-hydroxydopamine: implications for reparative therapy in Parkinson's disease. *Apoptosis* 2012; 17:289-304.

10. Gao Q, Li Y, Shen L, Zhang J, et al. Bone marrow stromal cells reduce ischemia-induced astrocytic activation in vitro. *Neuroscience* 2008; 152:646-55.
11. Perasso L, Cogo CE, Giunti D, et al. Systemic administration of mesenchymal stem cells increase neuron survival after global cerebral ischemia in vivo (2VO). *Neural Plast* 2010; 2010:534925, 5 pages.
12. Lee HJ, Lee JK, Lee H, et al. The therapeutic potencial of human umbilicar cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2010; 481:30-5.
13. Uccelli A, Morando S, Bonanno S, et al. Mesenchymal stem cells for multiple sclerosis: does neural differentiation really matter? *Curr Stem Cell Res Ther* 2011; 6:69-72.
14. Fazel SS, Angoulvant D, Butany J, et al. Mesenchymal stem cells engineered to overexpress stem cell factor improve cardiac function but have malignant potential. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 136:1388-1389.
15. Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells*, 24:2483-92.
16. Horn AP, Frozza RL, Grudzinski PB, et al. Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Res* 2009; 63:35-41.
17. Horn AP, Bernardi A, Frozza RL, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium triggers neuroinflammation and reactive species generation in organotypic cultures of rat hippocampus. *Stem Cells Dev* 2011; 20:1171-81.
18. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissue. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-13.
19. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th edition. Elsevier Academic, San Diego, 2005.

20. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 2006; 1:1306-11.
21. Whone AL, Kemp K, Sun M, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neural perikarya and transporter function from oxidative stress by secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain Res* 2012; 1431:86-96.
22. Wang Y, Yang J, Li H, et al. Hypoxia promotes dopaminergic differentiation of mesenchymal stem cells and shows benefits for transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2013; 1431:86-96.
23. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25:2739-49.
24. Lee HJ, Lee JK, Lee H, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol Aging* 2012; 33:588-602.
25. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004; 89:1092-1100.
26. Luo L, O'Leary DDM. Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28:127-156.
27. Girard C, Liu S, Adams D, et al. Axonal regeneration and neuroinflammation: roles for the translocator protein 18 kDa. *J Neuroendocrinol* 2012; 24:71-81.
28. Jhaveri DJ, Taylor CJ, Bartlett PF. Activation of different neural precursor populations in the adult hippocampus: does this lead to new neurons with discrete functions? *Dev Neurobiol* 2012; 72:1044-58.
29. Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and rodent hippocampus. *Learn Mem* 2009; 17:5-11.

30. Emoto K. Signaling mechanisms that coordinate the development and maintenance of dendritic fields. *Curr Opin Neurobiol* 2012; 22:805-11.

Figure legends

Figure 1: MSC injection into hippocampus triggers reactive gliosis three days after the transplantation. [A] Representative image and quantification of GFAP immunocontent three days after MSC transplantation considering control as 100%. [B] Representative image and quantification of GFAP immunocontent presented as percentage of the controls seven days after the surgical procedure. Bars represent the mean \pm S.D., n=6 animals, **p=0.0052, *p=0,0404 (t-test).

Figure 2: The transplantation of MSC into hippocampus causes cytoskeletal alteration. [A] Representative image and quantification of b-tubulin 3 immunocontent three days after MSC transplantation considering control as 100%. n=6 animals, ***p=0.0005. [B] Representative image and quantification of b-tubulin 3 immunocontent seven days after the MSC transplantation considering control as 100%. n=6 animals, p>0.05. [C] Representative image and quantification of Neu N immunocontent presented as percentage of the controls three days after the surgical procedure. n=5 animals, p>0.05. Bars represent the mean \pm S.D., t-test.

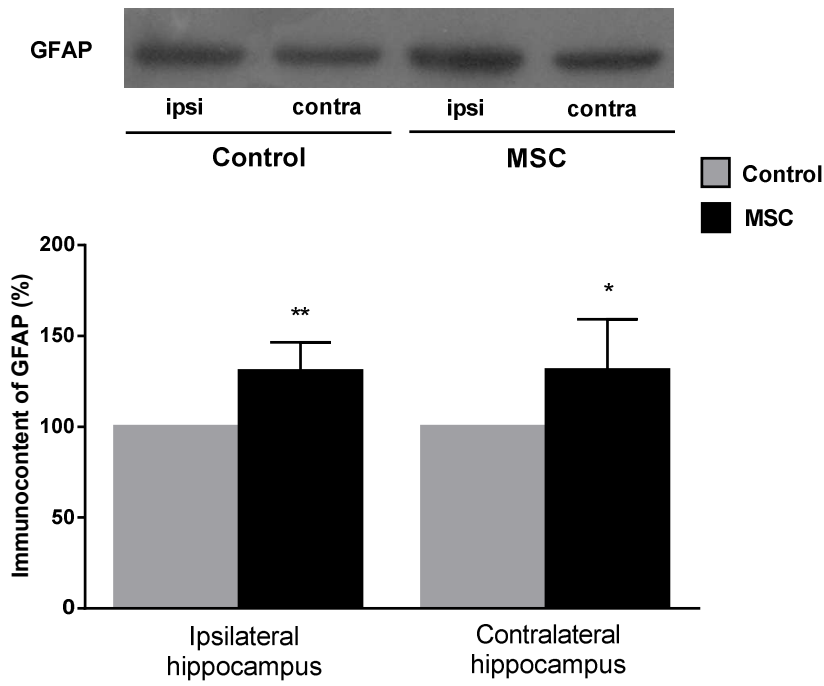
Figure 3: Representative images of ipsilateral hippocampus with Nissl staining. Photomicrography of CA1, CA2 and CA3 regions of hippocampus in the presence or absence of MSC three and seven days after transplantation. The arrow shows the site of reactive gliosis. Magnification: 200X.

Figure 4: MSC into hippocampus did not alter neurogenesis. [A] Representative image and quantification of doublecortin immunocontent three days after MSC transplantation considering control as 100%. [B] Representative image and quantification of GFAP immunocontent seven days after the MSC transplantation considering control as 100%. Bars represent the mean \pm S.D., n=6 animals, p>0.05 (t-test).

Figure 5: MSC transplantation cause deficits in short and long-term memory. [A] Graphic representation of short-term memory test in novel object recognition task. [B] Graphic representation of long-term memory test in novel object recognition task. Bars represent the median with interquartile range, n=7 animals, *p<0.05 (Mann Whitney test).

Figure 1

A



B

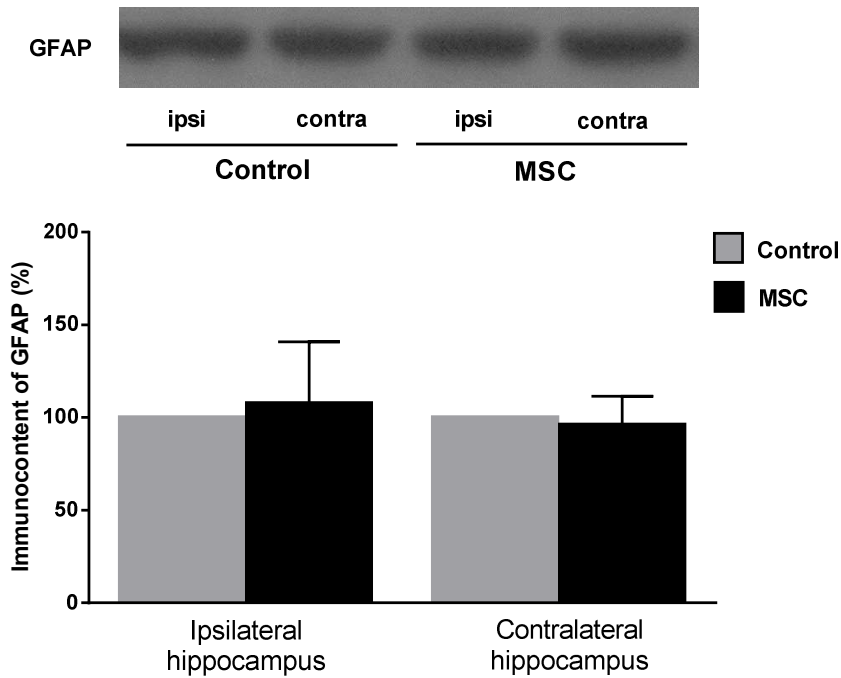
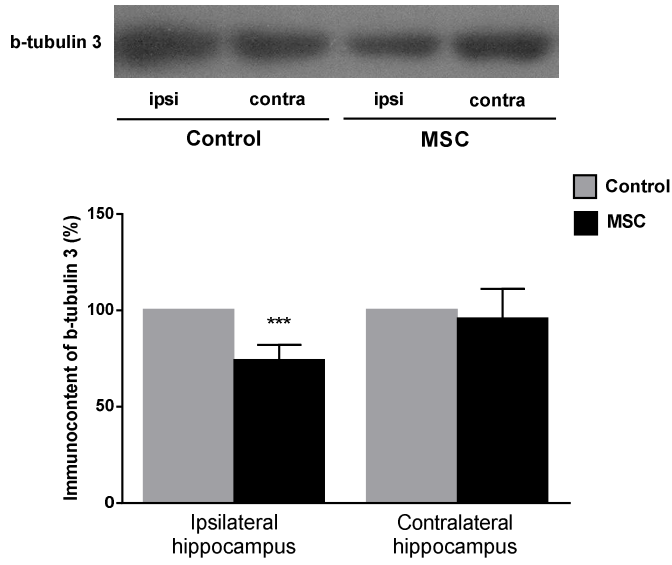
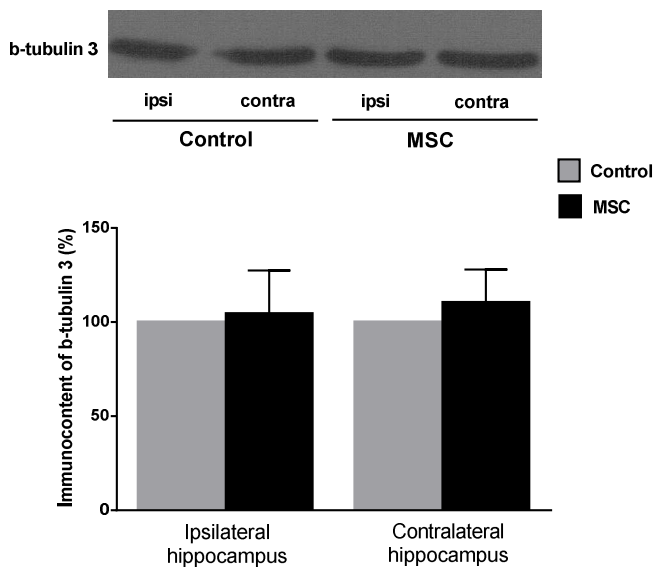


Figure 2:

A



B



C

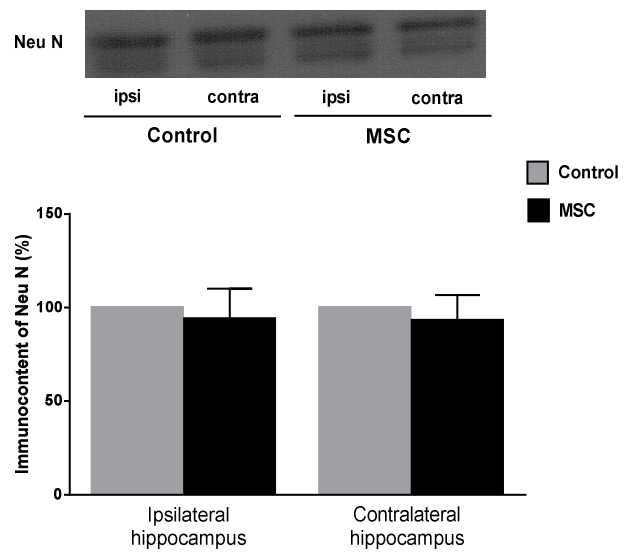


Figure 3:

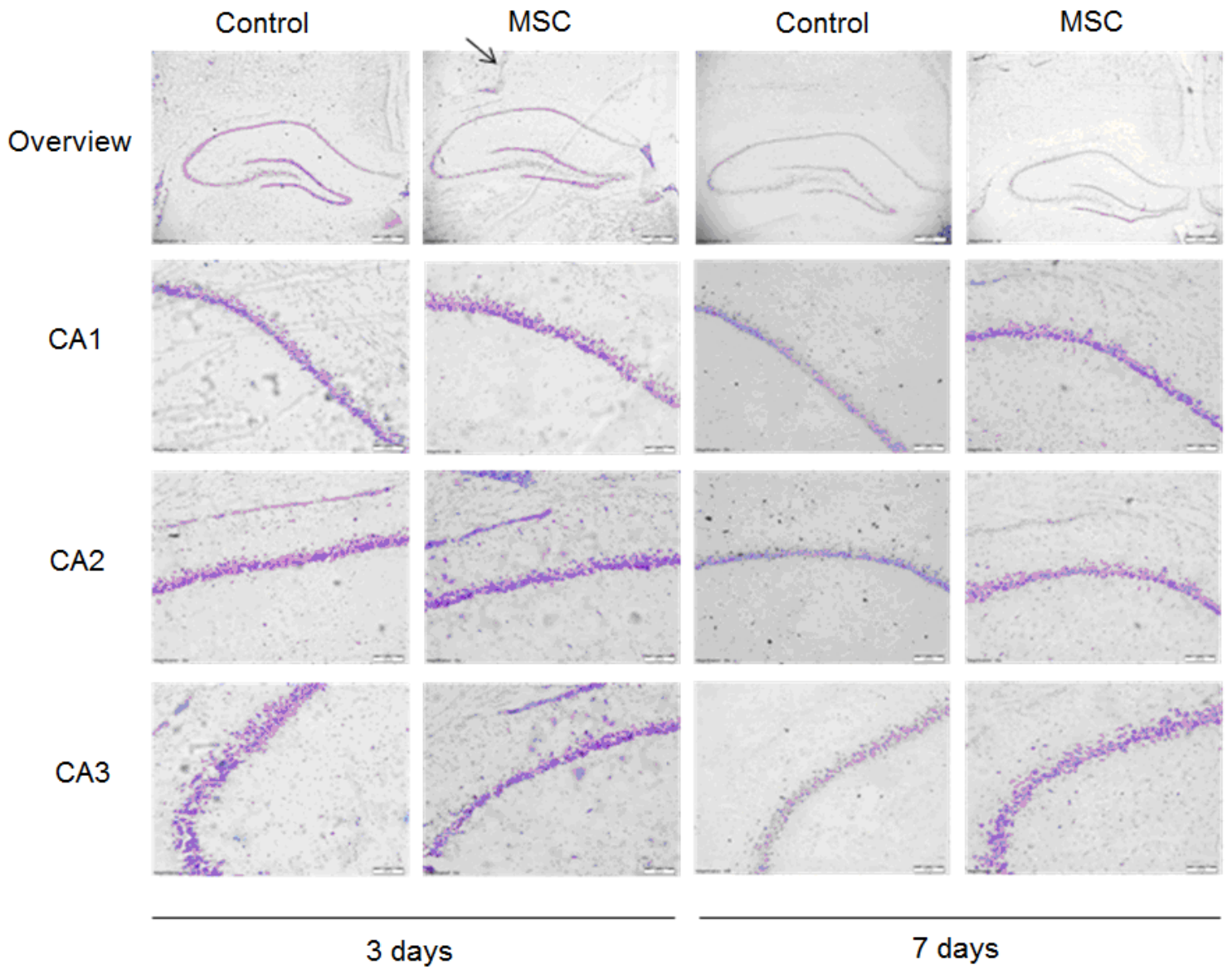
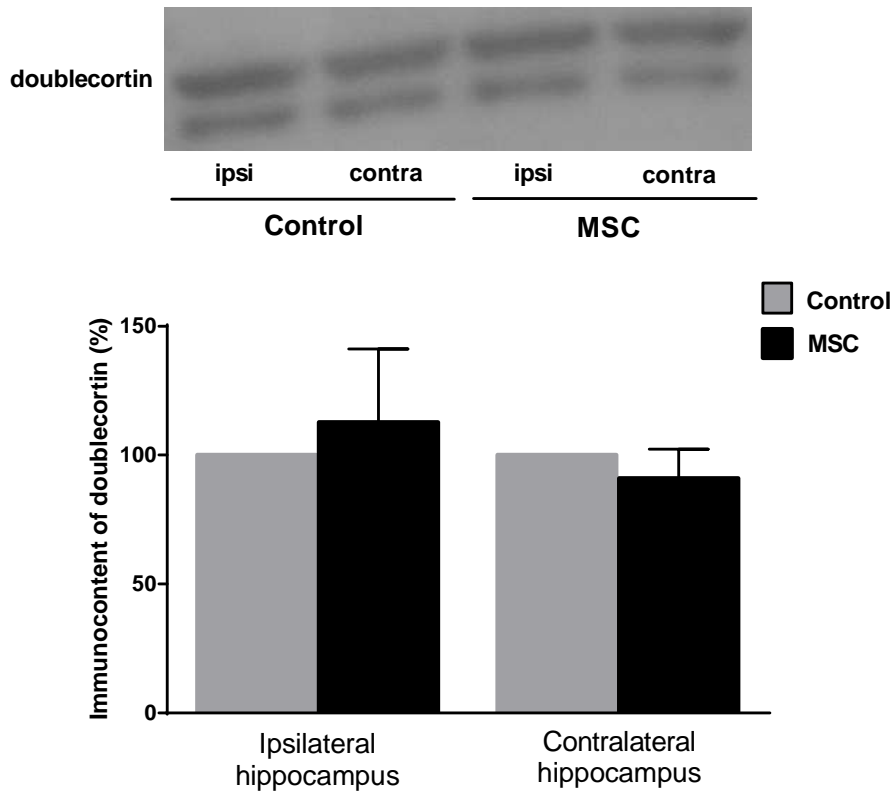


Figure 4:

A



B

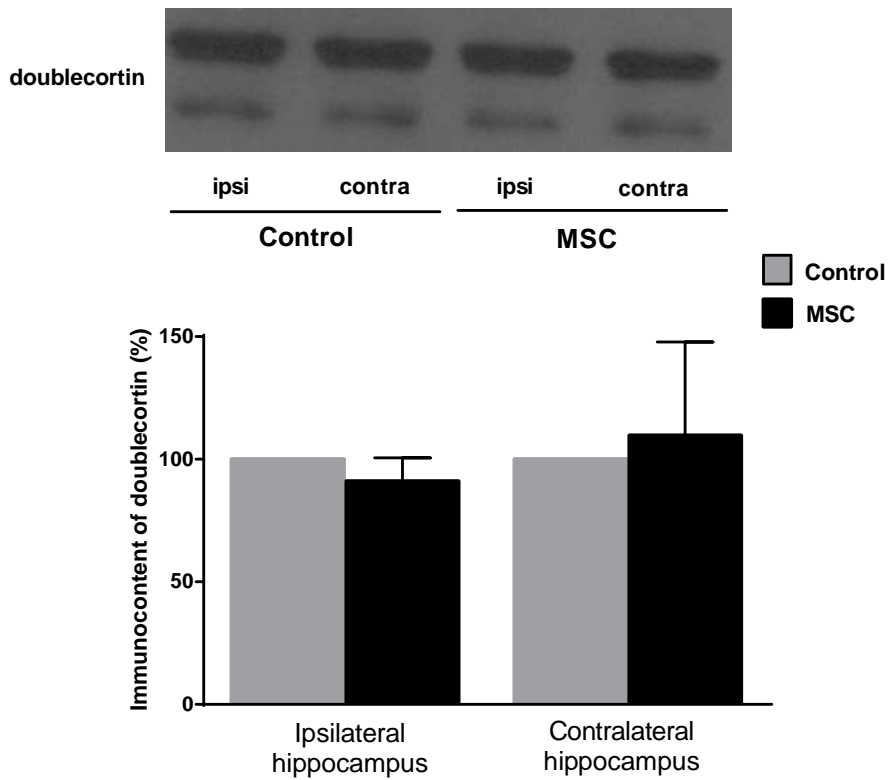
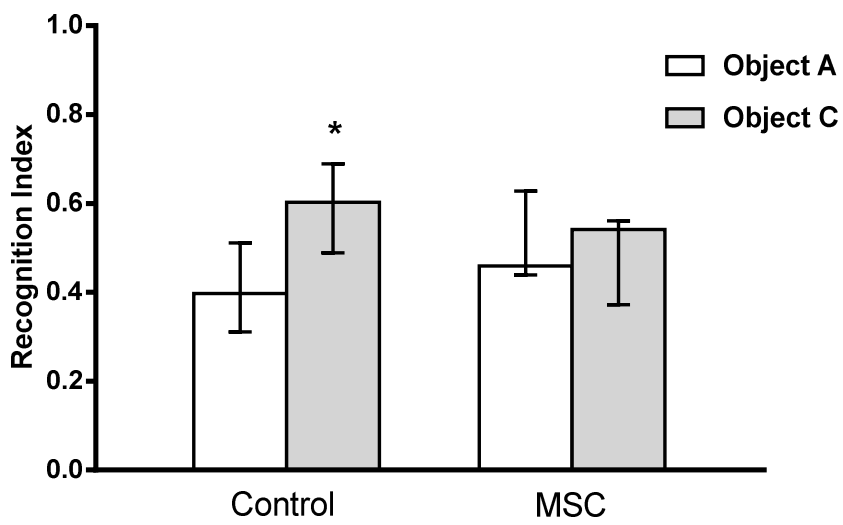
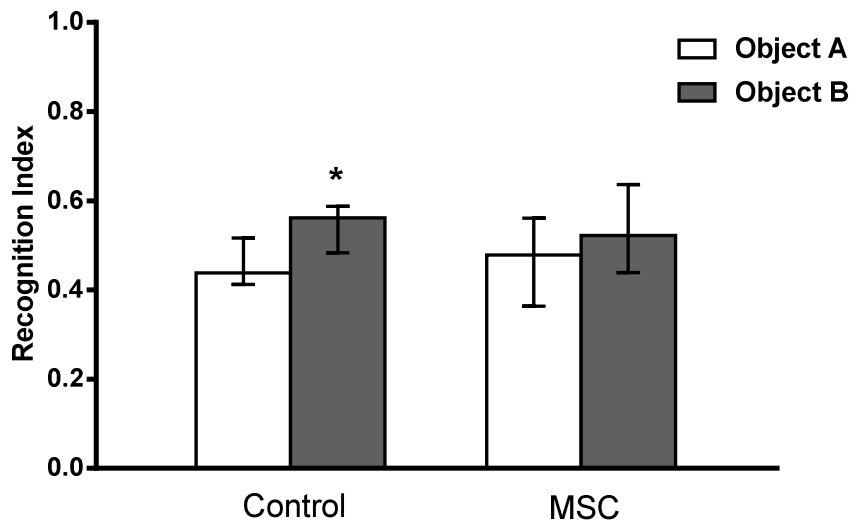


Figure 5:



DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a injeção de CTM isoladas de medula óssea no hipocampo de ratas *Wistar* induz astrogliose reativa três dias após o transplante. Porém sete dias após a injeção não há mais indícios dessa astrogliose. Também mostramos que não há mudanças histopatológicas nos neurônios hipocampais, mas pode estar ocorrendo retração dos processos dessas células após três dias de recuperação. A presença das CTM no hipocampo não parece induzir neurogênese no hipocampo. Ainda, ratas que receberam a injeção de CTM mostraram déficit de memória de curto e longo prazo. Esses resultados sugerem que as CTM possam exercer um efeito adverso no tecido nervoso.

A literatura traz muitos trabalhos que comprovam o efeito benéfico dessas células em modelos *in vitro* (Whone et al., 2012; Kim et al., 2012) e *in vivo* (Lee et al., 2012; Wang et al., 2013; Gutiérrez-Fernandez et al., 2013) de doenças neurodegenerativas, porém, até hoje pouco se sabe sobre o mecanismo de ação das CTM sobre células neurais.

Alguns autores já mostraram possíveis efeitos adversos das CTM. Trabalhos como de Djouad e colaboradores (2003) mostraram que a administração tanto subcutânea quanto intravenosa de CTM em camundongos favoreceu o desenvolvimento de tumor de melanoma, sendo esse efeito atribuído à ação imunossupressora sistêmica dessas células, tornando-as perigosas, uma vez que podem inibir a resposta antitumoral do paciente. Ainda, Fazel e colaboradores (2008) mostraram que, apesar de melhorarem a função cardíaca em modelo de infarto do miocárdio, as CTM geneticamente

modificadas para aumentarem a expressão de SCF induziram a formação de fibrosarcomas e de metástases em 4 dos 20 animais injetados. Acredita-se que a gama de fatores secretados por essas células podem contribuir para a formação de tumores através de efeitos anti-apoptóticos, assim como para sua progressão, metástase e resistência a drogas (Wong et al., 2011).

No SNC, Coyne e colaboradores (2006) mostraram, em um modelo de transplante de CTM no hipocampo de ratas, essas células foram rejeitadas por resposta inflamatória das células microgliais. Ainda trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que fatores secretados pelas CTM foram tóxicos para culturas organotípicas de hipocampo de ratos e agravaram a morte celular após privação de oxigênio e glicose (um modelo *in vitro* de isquemia global). Também demonstramos neste modelo, que as CTM induziram neuroinflamação, ativação glial, aumento no estresse oxidativo e aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (Horn et al., 2009; Horn et al., 2011).

O presente trabalho foi realizado no intuito de melhor entender a interação das CTM com o tecido neural na ausência de lesão. As células tronco foram injetadas sempre entre a 8ª e 20ª passagens para evitar a contaminação de macrófagos ou outras células que residem no estroma da medula óssea e para evitar que as células injetadas fossem usadas em passagens muito avançadas (da Silva Meirelles e Nardi, 2003; da Silva Meirelles et al., 2006). As CTM foram injetadas sempre no hipocampo direito (ipsilateral) de ratas fêmeas e três ou sete dias após o procedimento cirúrgico, realizamos análises para ver a resposta das células neurais à presença das CTM.

As CTM são conhecidas pelas suas propriedades imunossupressoras, modulando a ativação de linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas e células

NK. Elas expressam baixos níveis de complexo MHC classe I e não possuem MHC classe II. Também, as CTM secretam fatores como fator de crescimento de hepatócito, prostaglandina E2, TGF β , interleucina 10 (IL-10) entre outros que participam nessa supressão imune que é mediada por essas células (Bartholomew et al. 2002; Stagg, 2006; Chamberlain et al., 2007).

Muitos estudos que utilizam as CTM mostram que a proteção ao tecido neural que elas exercem é devido à diminuição das respostas inflamatórias presente nas doenças neurodegenerativas (Lee et al., 2012; McGuckin et al., 2013). Juntamente com a microglia, os astrócitos são as células envolvidas com a resposta inflamatória no SNC. Em condições patológicas ou de lesões há o fenômeno que chamamos de astrogliose reativa, onde se observa um aumento na quantidade da proteína de citoesqueleto glial, a GFAP (Liberto et al., 2004; Sofroniew, 2005; Buffo et al., 2008). Trabalhos mostram que os fatores secretados pelas CTM protegem contra a excitotoxicidade glutamatérgica e reduzem a ativação astrocitária decorrente de hipóxia/isquemia (Gao et al. 2008; Wei et al., 2009).

Porém, nossos resultados mostram que há um aumento no imunoconteúdo da proteína de GFAP três dias após a injeção das CTM tanto no hipocampo ipsilateral quanto no contralateral (Figura 1A), sugerindo uma reação global, e não só local, dos astrócitos aos fatores secretados e/ou a presença dessas células. Os astrócitos secretam muitos fatores de crescimento e citocinas que, dependendo da concentração, podem melhorar ou piorar lesões (Liberto et al., 2004), ficando difícil inferir algo sobre a reação astrocítica causada pelas CTM ser benéfica ou não ao animal pós lesão ou que apresente uma doença neurodegenerativa. Como doenças neurodegenerativas já

induzem gliose reativa (Brown, 2007; Rodríguez et al., 2009; Frozza et al., 2013), essa reação somada à reação causada apenas pela presença das CTM poderia ser tamanha que induziria a piora do quadro.

Em quadros de gliose reativa, dependendo da severidade, pode haver a formação de uma cicatriz glial. Após um dano no SNC, há o desencadeamento de uma reação inflamatória e a influência dessa reação ativa dos astrócitos, células microgliais e oligodendrócitos que podem formar uma cicatriz no local da lesão. Três dias após o dano há um aumento significativo de astrócitos ativados ao redor da lesão e sete dias depois esses astrócitos juntamente com células gliais delimitam a cicatriz glial (Kawano et al., 2012).

Porém, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que sete dias após a injeção das CTM o imunoconteúdo da proteína GFAP parece retornar aos níveis encontrados nos animais controle (Figura 1B), sugerindo que a reação astrocitária seria mais evidenciada nos primeiros dias após a cirurgia, normalizando-se em um tempo maior de recuperação. Também, outra explicação poderia ser o fato de que as CTM teriam sido, ou poderiam estar sendo, rejeitadas pelo SNC em sete dias, assim diminuindo seu efeito sobre os astrócitos. Coyne e colaboradores (2006) mostraram que CTM injetadas no hipocampo de ratas foram rejeitadas por resposta inflamatória e que a rejeição dessas células foi quase completa sete dias após o transplante.

A proteína β -tubulina 3 faz parte do citoesqueleto das células neuronais maduras e vem sendo amplamente utilizada na literatura como marcadora de neurônios (Gong et al. 2008; Leonard et al. 2009). Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que houve uma diminuição significativa do imunoconteúdo dessa proteína no hipocampo ipsilateral quando as CTM foram

injetadas nessa estrutura, sugerindo alterações importantes na quantidade dessa proteína neuronal (Figura 2A). Em um período de recuperação de sete dias, a marcação da proteína β -tubulina 3 não apresenta diferenças significativas em relação aos controles (Figura 2B), sugerindo que sua quantidade aumenta novamente nos hipocampos dos animais que receberam as CTMs, retornando aos níveis encontrados nos animais que não receberam as células.

A proteína Neu N é encontrada no núcleo das células neuronais e é também amplamente utilizada na literatura como uma proteína marcadora de neurônios; (Mullen et al. 1992; Ünal- Çevik et al. 2004). Três dias após a injeção das CTM no hipocampo não foi observada nenhuma alteração na quantidade dessa proteína nos hipocampos ipsi e contralateral (Figura 2C). Ainda, a observação da coloração de violeta de cresila não mostrou diferenças histopatológicas nos hipocampos nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo após três ou sete dias de recuperação comparando ratas controles e injetadas com CTM (Figura 3). Esses dados em conjunto sugerem que possivelmente não esteja ocorrendo uma redução no número neuronal, mas nos permitem sugerir que as CTM quando injetadas no hipocampo possam estar causando uma reestruturação nos processos neuronais.

Muitas doenças neurodegenerativas, assim como danos no SNC, causam atrofia de axônios e dendritos. Segundo Luo e O'Leary (2005), esse fenômeno pode ser dividido em dois eventos: (a) um em menor escala onde há eliminação de conexões sinápticas e um corte local na árvore axonal ou dendrítica, geralmente causada por retração; (b) e outro onde há a eliminação de um pedaço significativo do axônio primário, que aparenta ocorrer pela

degeneração da célula. Essas atrofia parecem contribuir significativamente para os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes e podem ser a primeira causa de morte neuronal (Luo e O'Leary, 2005). A perda de função após um dano na medula espinhal é resultado da degeneração da rede neuronal que é causado pela retração axonal, desmielinização e posterior destruição dos neurônios (Yoshimura et al.,2011).

No caso de danos, a retração neuronal pode ser revertida e por esse motivo muitos têm se referido a retração dendrítica como um “remodelamento” (Conrad 2006; Girard et al., 2012). Porém esse remodelamento pode ser prejudicial para uma estrutura como o hipocampo que está intimamente ligada à memória, como veremos a seguir.

No SNC adulto há duas zonas ricas em precursores neuronais: a ZSV e a ZSG do DG do hipocampo. No cérebro adulto normal essas zonas são responsáveis pela geração e reposição de novos neurônios. Após um dano, por si só há um aumento na neurogênese nessas regiões, porém não é funcionalmente relevante para a recuperação do tecido (Jhaveri et al., 2012).

Um dos mecanismos sugeridos para a melhora encontrada em estudos que utilizam CTM seria de que os fatores tróficos liberados por elas induziriam a neurogênese e isso melhoraria a lesão (Chopp e Li, 2002; Xiong et al., 2010). Devido a gama de fatores de crescimento e citocinas secretados pelas CTM, acredita-se que o aumento da neurogênese deve-se à ação direta dessas células sobre precursores locais ou por ação indireta, com a ativação de astrócitos que independentemente ativam a neurogênese (Uccelli et al., 2011).

As coordenadas correspondentes ao hipocampo utilizadas nesse trabalho nos permitiram transplantar as CTM centralmente no hilo dorsal do

DG. Mesmo com o lugar da injeção das células localizando-se perto da ZSG, em nossos resultados não observamos diferenças no imunoconteúdo de doublecortina (Figura 4), o que sugere que não há aumento de neurogênese nos hipocampus das ratas que receberam a injeção das CTM. Contudo, não sabemos se, na presença de uma lesão, a diferenciação das células tronco neurais não será induzida e potencializada pelos fatores secretados pelas CTM.

Tanto na isquemia global como na doença de Alzheimer a região mais afetada é o hipocampo. Na isquemia global ocorre morte seletiva de neurônios hipocampais da região CA1 e déficits cognitivos mostram estar correlacionados com o dano nessa região. Na doença de Alzheimer há uma grande disfunção e morte de neurônios colinérgicos, esses que por sua vez desempenham um papel crítico no aprendizado e memória (Horn et al., 2009; Min et al., 2012). É bem documentado que o dano a neurônios hipocampais produz déficit de memória e aprendizado que podem ser observados em uma variedade de testes comportamentais (Li et al., 2011).

Dentre os testes comportamentais para a avaliação de déficit de memória encontram-se o labirinto aquático de Morris (Lee et al., 2012), a esquivia inibitória (Oliveira et al., 2008) e o reconhecimento de objetos (Frezza et al., 2013). Muitos estudos pré-clínicos com administração de células tronco no SNC sugerem benefícios das CTM baseando-se em melhoras comportamentais (Kurozumi et al., 2005; Kan et al., 2007; Lee et al., 2012; Zhou et al., 2013).

O teste de reconhecimento de objetos utilizado nesse trabalho para avaliação de memória de curto e longo prazo baseia-se na tendência dos

roedores a explorar novos objetos apresentados. Os animais são permitidos em uma sessão de treino a explorar um ambiente onde dois objetos idênticos (objeto A e A1) estão presentes. Para avaliação de memória de curta duração, três horas após a sessão de treinamento, um dos objetos é trocado e um novo é apresentado (objeto B), e para avaliação da memória de longa duração, 24hs após a sessão treino outro objeto é apresentado (objeto C). Animais com deficiência em memória, não recordam do objeto familiar que está presente (objeto A) e tendem a explorar igualmente o objeto familiar e o objeto novo (Bevins e Besheer, 2006).

Nossos resultados mostraram que ratas injetadas com CTM apresentaram déficit de memória tanto de curto quanto de longo prazo no teste comportamental de reconhecimento de objetos. A memória de reconhecimento de objetos é altamente dependente do sistema hipocampal (Broadbent et al., 2010). As ratas que receberam CTM exploraram igualmente os objetos familiar e o novo, enquanto que as ratas controle exploraram mais o objeto novo que havia sido apresentado (Figura 5).

Mesmo não ocorrendo morte neuronal em nosso modelo, o déficit em memória de curto e longo prazo pode ser devido à retração neuronal encontrada. Ainda que o imunoconteúdo da proteína β -tubulina 3 tenha voltado a níveis de controle em sete dias, após a redução observada em três, esse remodelamento pode ser prejudicial. A reversão do processo de retração pode levar ao crescimento anormal de dendritos e erros na orientação desses processos, como acontece após uma isquemia global em neurônios piramidais do CA1 (Emoto, 2012). A retração dos processos neuronais no hipocampo pode prejudicar o aprendizado e a memória (Conrad, 2006). Porém, outras

avaliações deverão ser realizadas para a confirmação desses resultados.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem cautela na administração dessas células. Ainda não sabemos ao certo quais os mecanismos moleculares de ação das CTM nas células do sistema nervoso e se realmente podem ser administradas sem efeitos adversos, ou ainda piorar um dano já presente. Acreditamos sim que as CTM possam ser utilizadas como terapia celular no futuro, porém muito estudo ainda é necessário até que os efeitos benéficos e prejudiciais dessas células sejam melhor esclarecidos.

A necessidade de uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças até agora incuráveis justifica a euforia vivida e a esperança da utilização das células tronco, mas acreditamos que muita cautela e pesquisa serão necessárias para a obtenção de uma terapia segura e eficaz.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nessa tese nos permitem concluir que:

- 1) A administração de CTM, derivadas de medula óssea, no hipocampo de ratas *Wistar* causa astrogliose reativa três dias após a injeção;
- 2) A injeção dessas CTM não parece causar a morte de células neuronais, mas parece acarretar retração neuronal;
- 3) A presença de CTM no hipocampo não ativa a neurogênese no nosso modelo;
- 4) A injeção de CTM no hipocampo de ratas gera déficit de memória de curta e longa duração na tarefa de reconhecimento de objetos;
- 5) É possível que a utilização de CTM para tratamento de doenças que afetam o SNC pode possuir efeitos adversos, sugerindo cautela na utilização dessas células.

PERSPECTIVAS

Como continuação desse trabalho, pretende-se trabalhar com os seguintes objetivos:

- ✓ Investigar a possível ativação microglial pela administração de CTM, pelo método de imunohistoquímica, identificando o marcador CD11b;
- ✓ Avaliar se há formação de cicatriz glial decorrente do transplante de CTM utilizando imunohistoquímica que detecta GFAP;
- ✓ Avaliar a(s) regiões do hipocampo que podem estar sofrendo o processo de retração neuronal;
- ✓ Investigar o comportamento das CTM injetadas na presença de lesão hipocampal em modelos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baksh D, Song L, Tuan RS (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8:301-316.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffmann R (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol.* 30:42-48.
- Bevins RA, Besheer J (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc.* 1:1306-11.
- Block ML, Zecca L, Hong J-S (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8:57-69.
- Blum B, Benvenisty N (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res.* 100:133-158
- Borlongan CV, Glover LE, Tajiri N, Kaneko Y, Freeman TB (2011). The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. *Prog Neurobiol.* 95:213-28.
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE (2009). Object recognition memory and rodent hippocampus. *Learn Mem.* 17:5-11.

- Brown GC (2007). Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans.* 35:1119-1121.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3581-3586.
- Center of Disease Control and prevention (2011). Deaths: Preliminary Data for 2011. Center of Disease Control and prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells* 25:2739-2749.
- Chopp M, Li Y (2002). Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 1:92-100.
- Chvátal A, Anderová M, Neprasová H, Prajerová I, Benesová J, Butenko, O, Verkhatsky A (2008). Pathological potential of astroglia. *Physiol Res.* 57 Suppl 3:S101-10.
- Conrad CD (2006). What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev.* 5:41-60.
- Cova L, Bossolasco P, Armentero MT, Diana V, Zennaro E, Mellone M, Calzarossa C, Cerri S, Delilieri GL, Polli E, Blandini F, Silani V (2012).

Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on neural cultures exposed to 6-hydroxydopamine: implications for reparative therapy in Parkinson's disease. *Apoptosis* 17:289-304.

Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, et al. (2006). Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 24:2483-2492.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008). In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:2287-2299.

Da Silva Meirelles L, Chagastelles P, Nardi NB (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119:2204-2213.

Da Silva Meirelles L, Nardi NB (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 123:702-711.

Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals. *Blood* 102:3837-3844.

Emoto K (2012). Signaling mechanisms that coordinate the development and maintenance of dendritic fields. *Curr Opin Neurobiol.* 22:805-11.

Erickson MA, Dohi K, Banks WA (2012). Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 19:121-30.

Fazel SS, Angoulvant D, Butany J, Weisel RD, Li RK (2008). Mesenchymal stem cells engineered to overexpress stem cell factor improve cardiac function but have malignant potential. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 136:1388-1389.

Floden AM, Shanshan L, Combs CK (2005). β -amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor α and NMDA receptors. *J Neurosci.* 25:2566-2575.

Frezza RL, Bernardi A, Hoppe JB, Menegueti AB, Matté A, Battastini AMO, Polhlmann AR, Guterres SS, Salbego C (2013). Neuroprotective effects of Resveratrol against A β administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. *Mol Neurobiol* [in press].

Gabryel B, Kost A, Kasprowska D (2012) Neuronal autophagy in cerebral ischemia– a potential target for neuroprotective strategies? *Pharmacol Rep.* 64:1-15.

Gao Q, Li Y, Shen L, Zhang J, Zhang J, Zheng X, Qu R, Liu Z, Chopp M (2008). Bone marrow stromal cells reduce ischemia-induced astrocytic activation in vitro. *Neuroscience* 152:646-55.

Girard C, Liu S, Adams D, Lacroix C, Sinéus M, Boucher C, Papadopoulos V, Rupprecht R, Schumacher M, Groyer G (2012). Axonal regeneration and

neuroinflammation: roles for the translocator protein 18 kDa. *J Neuroendocrinol.* 24:71-81.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 140:918-34.

Gong J, Sagiv O, Cai H, Tsang SH, Del Priore LV (2008). Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res.* 86:957-65.

Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Teresa Vallejo-Cremades M, Fuentes B, Cerdán S, Díez-Tejedor E (2013). Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther.* 4:11, 12 páginas.

Horn AP, Frozza RL, Grudzinski PB, Gerhardt D, Hoppe JB, Bruno AN, Chagastelles P, Nardi NB, Lenz G, Salbego CG (2009). Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Res.* 63:35-41.

Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego C (2005). Cellular death in hippocampus in response to PI3-K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res.* 30:355-361.

Horn AP, Bernardi A, Frozza RL, Grudzinski PB, Hoppe JB, de Souza LF, Chagastelles P, de Souza Wyse AT, Bernard EA, Battastini AM, Campos MM, Lenz G, Nardi NB, Salbego C (2011). Mesenchymal stem cell-conditioned medium triggers neuroinflammation and reactive species generation in organotypic cultures of rat hippocampus. *Stem Cells Dev.* 20:1171-81.

Isele NB, Lee HS, Landshamer S, Straube A, Padovan CS, Presnilla N, Culmsee C (2007). Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons. *Neurochem Int.* 50:243-50.

Jacobs AH, Tavitian B; INMiND consortium (2012). *J Cereb Blood Flow Metab.* 32:1393-415.

Jeneson A, Squire LR (2011). Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learn Mem.* 19:15-25.

Jhaveri DJ, Taylor CJ, Bartlett PF (2012). Activation of different neural precursor populations in the adult hippocampus: does this lead to new neurons with discrete functions? *Dev Neurobiol.* 72:1044-58.

Kan I, Melamed E, Offen D (2007). Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 180:219-242.

Kang W, Hébert JM (2011). Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol.* 43:147-54.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449:557-563.

Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G (2012). Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 349:169-80.

Keimpema E, Fokkens MR, Nagy Z, Agoston V, Luiten PG, Nyakas C, Boddeke HW, Copray JC (2009). Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischaemia in adult rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 35:89-102.

Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW (2012). Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- β plaques. *Cell Death Differ.* 19:680-91.

Krabbe, C, Zimmer, J, Meyer M (2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. *APMIS* 113:831-844.

Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H (2005). Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther.* 11:96-104.

- Lee HJ, Lee JK, Lee H, Carter JE, Chang JW, Oh W, Yang YS, Suh JG, Lee BH, Jin HK, Bae JS (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol Aging*. 33:588-602.
- Lee HJ, Lee JK, Lee H, Shin JW, Carter JE, Sakamoto T, Jin HK, Bae JS (2010). The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 481:30-5.
- Lee JK, Jin HK, Bae JS (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett*. 450:136-41.
- Leonard BW, Mastroeni D, Grover A, Liu Q, Yang K, Gao M, Wu J, Pootrakul D, van den Berge SA, Hol EM, Rogers J (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol*. 2009 Jul 20;515(3):269-94.
- Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T, Kojima M, Park S (2013). Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory. *Endocr J*. [in press].
- Li LX, Cheng YF, Lin HB, Wang C, Xu JP, Zhang HT (2011). Prevention of cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats. *Metab Brain Dis*. 26:37-47.

- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 89:1092-1100.
- Luo L, O'Leary DDM (2005). Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28:127-156
- Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA (2011). Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int.* 59:347-56.
- Maras PM, Baram TZ (2012). Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci.* 35:315-24.
- McGuckin CP, Jurga M, Miller AM, Sarnowska A, Wiedner M, Boyle NT, Lynch MA, Jablonska A, Drela K, Lukomska B, Domanska-Janik K, Kenner L, Moriggl R, Degoul O, Perruisseau-Carrier C, Forraz N (2013). Ischemic brain injury: A consortium analysis of key factors involved in mesenchymal stem cell-mediated inflammatory reduction. *Arch Biochem Biophys.* [in press].
- Mimeault M e Batra SK (2006). Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24:2319-2345.
- Min D, Mao X, Wu K, Cao Y, Guo F, Zhu S, Xie N, Wang L, Chen T, Shaw C, Cai J (2012). Donepezil attenuates hippocampal neuronal damage and cognitive deficits after global cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 510:29-33.

Ministério da Saúde Brasil (2008). Saúde Brasil 2007 - Uma análise da situação da Saúde: Perfil da mortalidade do brasileiro. Brasília, 06 de novembro de 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletivasaude061008.pdf>>.

Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE (2006). Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin Neurosci Res.* 6:261-281.

Mu Y, Gage FH (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 6:85.

Müllen, RJ, Buck C, Smith A (1992). Neu N, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.

Nadel L, Hupbach A, Gomez R, Newman-Smith K (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:1640-5.

Nagai A, Kim WK, Lee HJ, Jeong HS, Kim KS, Hong SH, Park IH, Kim SU (2007). Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow. *PLoS One* 12:e1272.

Nishikava S, Goldstein RA, Nierras CR (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:725-729.

Ohiri Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamaamoto N, Nakamura K, Nakafuku M (2006) Growth factor treatment and genetic manipulation

stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured spinal cord. *J Neurosci.* 26:11948-11960.

Perasso L, Cogo CE, Giunti D, Gandolfo C, Ruggeri P, Uccelli A, Balestrino M (2010). Systemic administration of mesenchymal stem cells increases neuron survival after global cerebral ischemia in vivo (2VO). *Neural Plast.* 2010:534925, 5 páginas.

Price D (1999). New order from neurological disorders. *Nature* 399:A3-A5.

Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A (2009). Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 16:378-85.

Sarnowska A, Braun H, Sauerzweig S, Reymann KG (2009). The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. *Exp Neurol.* 215:317-27.

Sofroniew MV (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32:638-47.

Sofroniew MV, Vinters HV (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119:7-35.

Song J, Christian KM, Ming GL, Song H (2012). Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol.* 72:1032-43.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M (2005). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:462-71.

- Sriram K, O'Callaghan JP (2007). Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2:140-53.
- Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J (2006). Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 107:2570-7.
- Stella F, Cerasti E, Si B, Jezek K, Treves A (2012). Self-organization of multiple spatial and context memories in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:1609-25.
- Sutherland RJ, Sparks FT, Lehmann H (2010). Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia* 48:2357-69.
- Suzuki H, Tagushi T, Tanaka H, Kataoka H, Li Z, Muramatsu K, Gondo T, Kawai S (2004). Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neurons, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 322:918-22.
- Thompson A, Boekhoorn K, Van Dam AM, Lucassen PJ (2008). Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav.* 7 Suppl 1:28-42.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 36:2566-73.

- Uccelli A, Morando S, Bonanno S, Bonanni I, Leonardi A, Mancardi G (2011). Mesenchymal stem cells for multiple sclerosis: does neural differentiation really matter? *Curr Stem Cell Res Ther.* 6:69-72.
- Ünal- Çevik I, Kiliç M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 1015:169-74.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007a). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 184:53-68
- Wang Y, Yang J, Li H, Wang X, Zhu L, Fan M, Wang X (2013). Hypoxia promotes dopaminergic differentiation of mesenchymal stem cells and shows benefits for transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* 1431:86-96.
- Wei L, Fraser JL, Lu ZY, Hu X, Yu SP (2012). Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis.* 46:635-45.
- Whone AL, Kemp K, Sun M, Wilkins A, Scolding NJ (2012). Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neural perikarya and transporter function from oxidative stress by secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain Res.*1431:86-96.

- Wong RS (2011). Mesenchymal stem cells: angels or demons? J Biomed Biotechnol. 2011:459510, 8 páginas.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res. 61:364-70.
- Xing C, Arai K, LO EH, Homel M (2012). Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. Int J Stroke. 7:378-85.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2010). Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. Curr Opin Investig Drugs. 11:298-308.
- Yassa MA, Stark CE (2011). Pattern separation in the hippocampus. Trends Neurosci. 34:515-25.
- Ying C, Hu W, Cheng B, Zheng X, Li S (2012). Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells *in vitro*. Cell Mol Neurobiol. 32:1255-63.
- Yoshimura K, Ueno M, Lee S, Nakamura Y, Sato A, Yoshimura K, Kishima H, Yoshimine T, Yamashita T (2011). c-Jun N-terminal kinase induces axonal degeneration and limits motor recovery after spinal cord injury in mice. Neurosci Res. 71:266-77.
- Zhou Y, Sun M, Li H, Yan M, He Z, Wang W, Wang W, Lu S (2013). Recovery of behavioral symptoms in hemi-parkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. Cytotherapy. 15:467-80.