



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MARCELO AUGUSTO MELONI SANTOS

CARACTERIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DE CULTURA DE
ASTRÓCITOS MURINOS CONGELADAS.

RIO DE JANEIRO

2017



MARCELO AUGUSTO MELONI SANTOS

CARACTERIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DE CULTURA DE
ASTRÓCITOS MURINOS CONGELADAS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadoras: Professora Flávia Carvalho Alcantara Gomes

Professora Joice Stipursky Silva

RIO DE JANEIRO

2017

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DE CULTURA DE ASTRÓCITOS
MURINOS CONGELADAS**

MARCELO AUGUSTO MELONI SANTOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

Aprovada por:

Prof. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (IBCCF – COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA - UFRJ)

Profa. FLAVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES (ICB – UFRJ)
ORIENTADORA

Profa. JOICE STIPURSKY SILVA (ICB – UFRJ) - ORIENTADORA

Profa. DANIELA UZIEL (ICB – UFRJ) - REVISORA E SUPLENTE

Profa. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (IBCCF – UFRJ) -
EXAMINADORA

Dra. TÂNIA CRISTINA LEITE DE SAMPAIO E SPOHR (IECPN) -
EXAMINADORA

DR. FÁBIO JORGE MOREIRA DA SILVA (ICB – UFRJ) - EXAMINADOR

DEDICATÓRIA

A Edson, Ana, Felipe, Bruna e Maria Carolina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido o dom da vida e por me guiar em todos os momentos, sendo um refúgio fiel nos momentos de incertezas e dificuldades, nunca me deixando desamparado. Na reta final dessa dissertação quando tudo parecia perdido, me deste calma, sabedoria e tenacidade. Agradeço também à poderosa intercessão da Santíssima Virgem Maria!!

Agradeço a minha mãe Ana, por ter me carregado no ventre e por ser minha melhor amiga (junto com minha esposa), pessoa com que pude e posso partilhar absolutamente tudo!!! Jamais esquecerei todos os sacrifícios feitos por você e por meu pai para dar a mim a meu irmão uma educação escolar de qualidade e por ter formado dois homens de caráter. Amo você!!

Agradeço a meu pai Edson, por todo incentivo dado durante minha trajetória e por ser exemplo de caráter, responsabilidade, ética e profissionalismo. Quero ser para Maria um pouco do que o senhor foi para mim.

Agradeço a meu irmão Felipe, por ser companheiro de todas as horas e grande amigo e incentivador dessa jornada!!

Agradeço a minha esposa Bruna, por me fazer um homem feliz e realizado, por estar ao meu lado em todos os momentos, bons ou ruins, por entender (quase sempre) minha ausência e por me amar tanto, que junto com Deus me deu meu melhor e maior presente, MARIA!! Te amo demais!!

Minha filha amada, agradeço a você por ter iluminado minha vida com um amor jamais sentido, por ter despertado em mim sentimentos tão bons!! Se hoje consigo defender essa dissertação, saiba que isso foi por você e para você!!!!

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Neurobiologia Celular, Lívia, Vinícius, Alexandre, Anne, Laís, Michele, Isadora, Luan, Sheila, Luciana, Bruno, Carol e Sr. Severino, que me ajudaram de diversas formas ao longo desse trabalho. Agradeço de modo especial ao meu amigo Matheus por ter me ajudado diretamente na realização dos experimentos.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Joice Stipursky, por ser grande parceira, e pela paciência, atenção e carinho, não só durante esse mestrado, mas desde que cheguei ao laboratório. Tenho grande admiração e respeito por você.

Agradeço imensamente a minha chefe e orientadora, Profa. Flávia Gomes, por ser exemplo de profissional, por me incentivar e por criar oportunidades para que eu pudesse crescer profissionalmente. Agradeço por não ter me deixado desistir quando as dificuldades apareceram e me julguei incapaz de prosseguir, agradeço por confiar em mim e, principalmente, agradeço por ter tido tanto cuidado e carinho comigo nessa reta final. Quando Maria crescer, quero que ela possua alguns predicados que admiro em você!!!

Agradeço a meus pares do mestrado profissional por serem parceiros, incentivadores e amigos, espero que nossa amizade possa ser longa e duradoura.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram comigo durante essa caminhada; não citarei nomes para não ser traído pela memória; suas orações e conversas foram fundamentais pra mim!! Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram ao longo desse mestrado!!!

“Combati o bom combate,

Terminei a minha carreira,

Guardei a fé”

Apóstolo Paulo

RESUMO

SANTOS, Marcelo Augusto Meloni. Caracterização morfo-funcional de cultura de astrócitos murinos congeladas.

Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O sistema nervoso central (SNC) é formado por diferentes tipos celulares que desempenham funções especializadas, como os neurônios e as células gliais, mais especificamente, os astrócitos, tema de estudo dessa dissertação. Historicamente descritos como células de suporte dos neurônios, o entendimento sobre o papel dos astrócitos tem sido alterado nas últimas décadas: de uma simples célula com papel coadjuvante frente aos neurônios, a célula astrocitária passou a ser protagonista, com a descrição de sua atuação na fisiologia do SNC e em desordens neurológicas e neurodegenerativas. A principal abordagem metodológica que permitiu o conhecimento sobre as funções desenvolvidas pelos astrócitos foi a cultura de células, sendo possível o isolamento e estudo deste tipo celular a partir do tecido encefálico proveniente de animais experimentais. O custo para a criação de animais em pesquisa e as normas de biossegurança para o uso de cobaias tornaram o processo de congelamento celular e o advento dos bancos de células como uma alternativa importante para a otimização do uso de animais em pesquisa. Nesta dissertação, foram caracterizados morfofuncionalmente astrócitos secundários murinos submetidos ao processo de congelamento/descongelamento (CAC) em comparação com aqueles que não foram submetidos a esse ciclo (CANC). Analisou-se a expressão de marcadores clássicos da célula astrocitária, como GFAP (proteína acídica fibrilar glial) e Aldh1L1 (enzima aldeído desidrogenase L1), e marcadores de outros tipos celulares, como F480 (marcador de micróglia) e β -tubulina III (marcador de neurônios), traçando assim um perfil populacional das culturas que foram utilizadas nesse trabalho. Adicionalmente, CANC e CAC foram

avaliados funcionalmente, através de ensaios de sobrevivência e maturação neuronais e indução e formação de sinapses. Para isso, culturas neuronais foram tratadas com o meio condicionado derivado destes astrócitos e analisados para sobrevivência neuronal (número de núcleos viáveis de neurônios β -tubIII positivos), maturação (arborização e formação de neuritos) e formação de sinapses (marcação para as proteínas sinápticas, sinaptofisina e PSD 95). Não houve diferenças significativas entre CANC e CAC no que diz respeito à morfologia das células em cultura, tempo de confluência, número de células e perfil populacional dos diferentes marcadores de células neurais utilizados. Funcionalmente, não foram observadas diferenças na capacidade de suporte trófico de CANC e CAC aos neurônios, capacidade induzir maturação neuronal através da neuritogênese e capacidade de induzir sinapses. Esses resultados sugerem que os astrócitos murinos congelados mantêm as características morfofuncionais dos astrócitos primários, apresentando-se como uma boa ferramenta para o estudo de astrócitos *in vitro*, e permitindo a otimização e redução do uso de animais em pesquisa.

Descritores: Astrócitos, Congelamento, Sistema nervosa central

ABSTRACT

SANTOS, Marcelo Augusto Meloni. Caracterização morfo-funcional de cultura de astrócitos murinos congeladas. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The central nervous system (CNS) is composed by different cell types which exert specialized functions, such as neurons and glial cells, more specifically the astrocytes, the focus of this work. Astrocytes have been historically described as neuronal supporting cells. More recently, however, it has been shown that these cells play critical roles in the establishment and development of CNS and in neurological and neurodegenerative disorders. The main methodological approach that allowed the gain of knowledge about astrocyte physiology and function is the cell culture technique, which allows isolation of this cell type from brain tissue of experimental animals. Regarding increasing financial costs and the rigid biosafety and ethics rules to use animal models, freezing techniques and the creation of cell banks emerged as procedures that may optimize the use of experimental animals. In this work, murine secondary astrocyte cultures submitted to freezing/thawing procedures (CAC) were morpho-functionally characterized and compared by comparing with astrocytes cultures not submitted to these procedures (CANC). Expression of typical astrocyte markers GFAP (glial fibrillary acidic protein) and Aldh1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1), microglia marker F480 and neuronal marker β -tubulin II) were analyzed to obtain a cellular profile of the cultures. In addition, functional characteristics of CANC and CAC were analyzed by measuring neuronal survival (number viable β -tubIII positive neurons), maturation (arborization and neurite formation) and synapse formation (labeling for synaptic proteins synaptophysin and PSD-95) in neuronal cultures treated with conditioned medium from CANC and CAC. Morphological characterization of CANC and CAC did not reveal significant differences on astrocyte morphology, confluence time, cell numbers and population profile between

them. Functionally, CANC and CAC also did not reveal differences in the ability to support neuronal survival, maturation, neuritogenesis and synapses. Our results suggest that frozen murine astrocytes are able to maintain morphological and functional characteristics when compared with astrocytes not submitted to a freezing protocol. Thus his methodological approach is a valuable tool for *in vitro* research, and allows experiment optimization and reduction of animal use.

Keywords: Astrocyte, Freezing, Central nervous system

LISTA DE SIGLAS

- Aldh1L1** - Enzima aldeído desidrogenase L1, do inglês *aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1*
- β-Tub III** - Beta tubulina III
- CaCl₂** - Cloreto de cálcio
- CAC** - Cultura secundária derivada de astrócito congelado
- CANC** - Cultura secundária derivada de astrócito não congelado
- CCS** - Centro de ciências da saúde
- CEUA** - Comissão de ética no uso de animais
- CONCEA** - Conselho nacional de controle de experimentação animal
- DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato, do inglês *4',6-diamidino-2-phenyindole, dilactate*
- DIV** - Dias *in vitro*
- DMEM** - Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's modified Eagle medium*
- DMSO** - Dimetil sulfóxido
- EAAT1 e 2** - Transportador do aminoácido excitatório (glutamato) 1 e 2, do inglês *Excitatory amino acid transport*
- GFAP** - Proteína acídica fibrilar glial, do inglês *glial fibrillary acidic protein*
- iPS** - célula-tronco de pluripotência induzida, do inglês *induced pluripotence stem cell*
- KCl** - Cloreto de sódio
- KH₂PO₄** - Fosfato de potássio dibásico
- MCA** - Meio condicionado de astrócito
- MCAC** - Meio condicionado de astrócito congelado
- MCANC** - Meio condicionado de astrócito não congelado

MCS - Meio com soro

MgCL₂ - Cloreto de magnésio

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

MSS - Meio sem soro

NaCl - Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato de sódio monobásico

NGS - Soro normal de cabra, do inglês *normal goat serum*

PBS - Tampão fosfato, do inglês *phosphate buffer solution*

pH - Potencial hidrogeno-iônico

QSP - Quantidade suficiente para

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

S-100 β - Proteína ligadora de cálcio tipo beta

UFRJ - Universidade federal do Rio de Janeiro

3D - Três dimensões

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características morfológicas de astrócitos humanos e murinos *in vivo* e *in vitro*.

Figura 2 – Participação dos astrócitos nas sinapses.

Figura 3 – Metodologia de contagem de neuritos.

Figura 4 - Resumo das etapas experimentais.

Figura 5 – Morfologia de CANC e CAC não varia.

Figura 6 - O processo de congelamento, não afeta o número de células totais em monocamadas confluentes em CANC e CAC.

Figura 7 - CANC e CAC possuem mesmo perfil de marcação para GFAP.

Figura 8 - CANC e CAC possuem mesmo perfil de marcação para Aldh1L1.

Figura 9 - População de células duplamente marcadas para GFAP e Aldh1L1 não varia entre as populações analisadas.

Figura 10 - População de células neuronais e microgliais em CANC e CAC não varia.

Figura 11- CANC e CAC possuem mesmo perfil populacional.

Figura 12 - MCANC e MCAC são capazes de suportar sobrevida neuronal por 3 horas da forma similar.

Figura 13 - MCANC e MCAC possuem discreta diferença na capacidade de suportar sobrevida neuronal por 24 horas.

Figura 14 - MCANC e MCAC são capazes de induzir a arborização neuronal de forma similar.

Figura 15 - MCANC e MCAC possuem potencial sinaptogênico semelhante.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para ensaios de imunocitoquímica.

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados para ensaios de imunocitoquímica.

Tabela 3: Dinâmica de crescimento de CANC e CAC.

Tabela 4: Número de neuritos.

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1) Advento da cultura de células: histórico, relevância e tipos de cultura..	18
1.2) Importância do congelamento de células e dos bancos de células: aspectos de biossegurança.....	20
1.3) Biotérios e otimização do uso de animais em pesquisa.....	21
1.4) Astrócitos e suas funções	24
1.5) Métodos de estudo da função dos astrócitos.....	29
1.6) Justificativa	31
2. Objetivos.....	34
2.1) Objetivo geral	34
2.2) Objetivos específicos	34
3. Metodologia	35
3.1) Animais.....	35
3.2) Cultura primária de astrócitos corticais.....	35
3.3) Cultura secundária de astrócitos corticais.....	35
3.4) Cultura primária de neurônios corticais.....	36
3.5) Congelamento de células	37
3.6) Descongelamento de células	37
3.7) Imunocitoquímica	37
3.8) Quantificação da imunocitoquímica.....	39
3.9) Preparo de meio condicionado de astrócitos.....	39
3.10) Ensaio de indução de formação de sinapses neuronais por astrócitos.....	40
3.11) Ensaio de arborização neuronal induzida por MCA.....	40
3.12) Análise morfológica através de microscopia de contraste de fase.....	42
3.13) Testes estatísticos.....	43

3.14) Resumo das etapas metodológicas.....	43
4. Resultados	44
4.1) Análise do perfil de crescimento e morfologia celular de CANC e CAC.....	44
4.2) Caracterização da composição celular de CANC e CAC.....	47
4.3) Caracterização funcional de CANC e CAC.....	54
5. Discussão.....	62
5.1) Aspectos gerais.....	62
5.2) Características astrocitárias.....	63
5.3) Interação neurônio – astrócito.....	66
5.4) Diferentes protocolos e otimização do uso de animais.....	69
6. Conclusão.....	71
7. Referências bibliográficas.....	72
8. Apêndices.....	79
8.1) Apêndice 1 – Protocolo dos tampões e soluções.....	79
9. Anexo	82
9.1) Anexo – Aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde (CEUA - CCS).....	82

1. Introdução

1.1) Advento da cultura de células: histórico, relevância e tipos de cultura

A técnica de cultura celular consiste na remoção das células de seu tecido de origem, animal ou vegetal, e seu subsequente crescimento em um ambiente artificial favorável. Existem diferentes tipos de cultura: culturas primárias, onde as células de interesse são retiradas de um determinado tecido através de dissociação enzimática e/ou mecânica e mantidas em condições controladas para seu crescimento e proliferação; culturas secundárias, em que as células são derivadas de culturas primárias a partir do subcultivo (MOLINARO, 2010, BARBOSA ET AL., 2015).

Desde finais do século XIX, cientistas empenham esforços na tentativa de manter células isoladas de diferentes tecidos animais e humanos com o objetivo de melhor entender o papel dessas células em diferentes contextos. Um dos pioneiros nesse estudo, o cientista alemão, Wilhelm Roux (1850-1924), cultivou tecido medular de aves em solução fisiológica (BACELLAR et al., 2004). Já no início do século XX, o pesquisador J. Jolly fez observações acerca da sobrevivência e divisão celular a partir de leucócitos de salamandra (*Salamandra salamandra*)(UNCHERN, 1999). Em 1907, Ross Harrison (1870-1959), anatomista norte-americano, estudando a dinâmica de desenvolvimento do tecido nervoso, dissecou o tubo medular de um embrião de sapo (*Bufo bufo*) e o cultivou em sua linfa (MOLINARO, 2010). As observações de Harrison foram de tão grande impacto que, a partir desse estudo, foram lançadas as bases da técnica de cultivo de células (ASSIS ET AL., 2007).

Outro nome de destaque nesse contexto do surgimento da técnica de cultivo de células foi o clínico francês, Alex Carrel (1873-1944), que, usando como modelo de estudo células cardíacas de embrião de galinha (*Gallus gallus*), percebeu a importância da assepsia e do fornecimento de novos nutrientes para que as células permanecessem em cultura por mais tempo (BARBOSA ET AL., 2015). Fato curioso é que o cientista Albert Ebeling afirmou que continuou fazendo divisões do explante original de Carrel por 34 anos

(BARBOSA ET AL., 2015). Isso foi explicado anos mais tarde pelo fato das células serem mantidas em cultura com o uso de extrato de embriões, o que permitia que novas células fossem adicionadas à cultura já existente (UNCHERN, 1999).

Outro avanço de destaque aconteceu no ano de 1916, quando Peyton Rous (1879-1970) e Fred Jones fizeram uso de tripsina para liberar as células da matriz do tecido, desenvolvendo o método de subcultivo celular (UNCHERN, 1999; BARBOSA ET AL., 2015). No ano de 1947, o cientista em biologia do desenvolvimento, Johannes Holtfreter (1901-1992) propôs um aparato que diminuiu o contato da célula com seu substrato, surgindo assim as culturas de células em 3D, que são culturas que diminuem a interação das células com o substrato, permitindo assim uma maior interação das células com o ambiente e entre as próprias células (AMARAL ET AL., 2011). Em 1961, Leonard Hayflick e Paul Moorhead, inovaram com a utilização de antibióticos para prevenir contaminações que eram comumente observadas (BARBOSA ET AL., 2015). Outras ferramentas utilizadas para conter o problema das contaminações foi o uso de cabines de fluxo de ar, que minimizavam a contaminação de microorganismos oriundos do ar e a substituição da fonte de nutrientes, com a utilização de meios quimicamente definidos em detrimento aos extratos biológicos (UNCHERN, 1999).

Entre as décadas de 1950 e 1970, muitas descobertas alavancaram ainda mais a técnica de cultivo de células, como os estudos de Aron Moscona (1921-2009), que identificou que células de órgãos diferentes não se misturavam, enquanto que células provenientes de um mesmo tecido permaneciam unidas (AMARAL ET AL., 2011). Outro avanço que ocorreu durante essa janela temporal foi o estabelecimento de diversas linhagens celulares, como por exemplo, a HeLa (nome da paciente Henrietta Lacks), primeira linhagem imortal de células humanas, obtidas a partir de uma paciente diagnosticada com câncer cervical (BARBOSA ET AL., 2015). Nas décadas de 1980 e 1990, novos avanços aconteceram como o cultivo de células-tronco pluripotentes de embrião de camundongos e de células-tronco embrionárias humanas (BARBOSA ET AL., 2015).

Desde sua descrição no século passado, a técnica de cultura de células a partir de culturas primárias, ou linhagens celulares, vem se consolidando como uma ferramenta importante nos mais diversos campos das Ciências da Saúde. Essa metodologia permite estudar o funcionamento das células em situações controladas, como por exemplo, em mecanismos fisiológicos, e em contextos de doenças e lesões. Além disso, contribui para a elaboração de estratégias terapêuticas de medicina regenerativa e personalizada. Com esta finalidade, centros de pesquisas investem cada vez mais no estabelecimento e manutenção de instalações apropriadas para produção, armazenagem e distribuição de inúmeras linhagens celulares.

1.2) Importância do congelamento de células e dos bancos de células: aspectos de biossegurança

Bancos de Células são descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como serviços que oferecem procedimentos de coleta, processamento, teste de controle de qualidade, armazenamento e liberação de células humanas, especialmente células tronco para fins de pesquisa ou terapêuticos (MARAFIGA, 2016). Essa definição pode ser aplicada, não só a células humanas, mas também a serviços que utilizam células animais.

Com o largo uso de linhagens de células nas abordagens metodológicas nos diferentes ramos da pesquisa científica, começaram a surgir os bancos de células, que se caracterizam por apresentarem instalações especializadas e com altos padrões de qualidade na distribuição de linhagens celulares. Porém, nem sempre tais linhagens são obtidas a partir de um banco de células; elas podem ser produzidas em diversos laboratórios que não sejam necessariamente voltados para a formação de uma ampla coleção celular. Mais importante do que a origem das células, é a garantia de que a linhagem seja autêntica e livre de contaminação, especialmente de micoplasma e de outros contaminantes (GERAGHTY ET AL., 2014).

Outros aspectos também estão envolvidos na produção em larga escala de linhagens de células e na formação de uma ampla coleção, como o rigor na regulamentação. Desta forma, vários países possuem legislação própria e

códigos de práticas para uso de amostras de tecidos humanos e animais em pesquisa, incluindo a forma como as células serão congeladas, estocadas e transportadas (GERAGHTY ET AL., 2014). A possibilidade de ter acesso rápido a células de interesse é a principal vantagem oferecida pelos bancos de células. Ter em mãos uma cultura com autenticação de qualidade para o uso em laboratórios torna mais ágil a prática científica.

Criopreservação é uma técnica que utiliza temperaturas muito baixas para preservação intacta de células e tecidos vivos (ZHAO ET AL., 2017). O congelamento de células com a criopreservação bem-sucedida tem ganhado espaço e vem aumentando nos últimos anos com o uso de crioprotetores e de equipamentos que controlam a temperatura (JANG ET AL., 2017). Atualmente, existem basicamente dois métodos de protocolos de criopreservação: o método convencional de congelamento lento, e a criopreservação livre de gelo ou vitrificação. No congelamento lento, as amostras são congeladas na faixa de 1°C à 2°C por minuto, seguido de rápido descongelamento, enquanto na vitrificação, ocorre o uso de uma solução que solidifica rapidamente a célula, sem a formação de cristais de gelo (CHATTERJEE ET AL., 2016).

Com diferentes aplicabilidades como, na medicina reprodutiva assistida, tecnologias de células-tronco, terapias celulares, engenharia de tecidos, desenvolvimento e triagem *in vitro* de medicamentos anticancerígenos, farmacologia e pesquisa científica básica (ZHAO ET AL., 2017), o congelamento de células e tecidos têm sido ferramenta valiosa no entendimento de diversas questões de diferentes áreas de conhecimento.

1.3) Biotérios e otimização do uso de animais em pesquisa

Outro ponto essencial a ser considerado quando se fala na utilização de células obtidas a partir de banco de células, é a redução no uso de animais em pesquisa. A possibilidade de se congelar células isoladas a partir de um tecido animal representa um melhor aproveitamento da amostra animal utilizada, gerando, tanto economia de tempo como economia financeira, haja visto que manter um biotério em funcionamento demanda grande aporte financeiro e de mão de obra. Embora sejam grandes as vantagens de se adquirir células

comercialmente disponíveis em bancos, ou mantê-las congeladas em seu próprio laboratório, este fato não elimina a necessidade da manutenção de biotérios.

A utilização de animais em pesquisa não é privilégio da modernidade. Relatos de antes de Cristo apontam que Hipócrates na Grécia antiga (450 a.C.) comparava aspectos de órgãos humanos doentes com órgãos de animais, e que Galeno em Roma (200 d.C.) realizou procedimentos experimentais utilizando animais (ACRA ET AL., 2007). Porém o uso de animais como modelo experimental sempre foi controverso, desde a Grécia antiga com Pitágoras que defendia que a amabilidade com todas as criaturas não humanas era um dever e mais modernamente, no século XVII quando o filósofo René Descartes afirmou que os animais não sentem dor porque não possuem alma (MAGALHÃES ET AL., 2006). Essa discussão persiste até os dias atuais entre sociedades que são estritamente contra o uso de animais em pesquisa, e grupos que defendem que a experimentação animal é o melhor modelo para o desenvolvimento da ciência, sobretudo da pesquisa biomédica (DANIELSKI ET AL., 2011).

Mas antes de aprofundar questões acerca dos cuidados no manejo de animais e de suas instalações, faz-se necessário entender melhor o que é um biotério e como eles surgiram. Definido por Antenor Andrade (ANDRADE ET AL., 2002) como:

Uma instalação dotada de características próprias, que atende às exigências dos animais onde são criados ou mantidos, proporcionando-lhes bem-estar e saúde para que possam se desenvolver e reproduzir, bem como para responder satisfatoriamente aos testes neles realizados (Andrade, A apud Andrade et al., 2002).

Tendo como objetivo o aprimoramento do padrão científico dos experimentos, foi entendido pelos pesquisadores que melhorar a qualidade dos animais com os quais trabalhavam era fundamental do ponto de vista de confiabilidade e reprodutibilidade dos dados. Antes vistos como um simples instrumento de trabalho, os animais passaram a ter papel crucial na prática científica, com maior preocupação e investimento no seu trato (ANDRADE ET AL., 2002; KO ET AL., 2010).

Antes adquiridos de fornecedores, os animais passaram a ser criados nos próprios centros de pesquisa, para assim se ter um maior controle e maior investigação a respeito de questões como, alimentação, ciclo de vida, reprodutibilidade, comportamento, doenças, entre outros (KO ET AL., 2010). Com o aumento da exigência da qualidade genética e sanitária dos animais, uma vez que são entendidos como reagentes biológicos e que sua qualidade afeta diretamente os resultados obtidos, esses indivíduos passaram de simples elemento do processo científico para alvo do processo científico, com o surgimento das Ciências dos Animais de Laboratório (ANDRADE ET AL., 2002; KO ET AL., 2010).

No universo de animais utilizados na experimentação, ratos e camundongos compreendem algo em torno de 90%, porém, qualquer animal pode ser utilizado, respeitando-se modelos que sejam adequados e viáveis ao que se deseja estudar. Remonta ao século XVIII o uso de animais domesticados com propósitos científicos, como o *Rattus norvegicus*, oriundo da Ásia e que chegou à Europa e aos Estados Unidos ao longo do século XVIII. Esses animais trazidos aos Estados Unidos da Suíça deram origem à bem conhecida linhagem Wistar, utilizada até os dias atuais na prática científica. Com relação aos camundongos, a espécie mais utilizada é o *Mus musculus*, especialmente da cepa suíça, levado à pesquisa por fornecedores chineses e japoneses. Existem registros do uso de camundongos na pesquisa de inícios do século XVII na Inglaterra, porém seu uso sistemático é datado das primeiras décadas do século XX (ANDRADE ET AL., 2002; KO ET AL., 2010).

Com o uso de forma rotineira dos animais na prática científica, a discussão a respeito da regulamentação, da ética e da biossegurança ganhou espaço nos ambientes acadêmicos e não acadêmicos. Talvez o mais conhecido estudo a respeito das boas práticas no uso de animais seja o princípio dos 3Rs, que influencia a Ciência de Animais de laboratório até hoje. Tal princípio ganhou notoriedade em finais da década de 50, quando o trabalho dos cientistas ingleses, William Russell (1925-2006) e Rex Burch (1926-1996), foi apresentado na reunião anual da Associação Americana para Ciências de Animais de Laboratórios. Nesse trabalho, a pesquisa com animais foi enxergada sob alguns aspectos: o primeiro deles trata da humanidade versus

desumanidade no trato com animais, esse aspecto foi medido usando como critério a dor, foi também analisado o ambiente em que os animais eram criados e verificou-se que se tratavam de ambientes artificiais e focados mais no êxito experimental do que no conforto e necessidade dos animais (KO ET AL., 2010).

Em relação a definição dos princípios, temos o primeiro R que vem da palavra *Replacement*, que significa substituir, baseado em qualquer ação que vise substituir o uso de animais em pesquisa por materiais sem sensibilidade (KO ET AL., 2010). O segundo R vem da palavra *Reduction*, que significa reduzir, conceito no qual ocorre a tentativa de se usar o menor número possível de animais sem abrir mão da qualidade da informação obtida e da confiabilidade estatística dos resultados. (KO ET AL., 2010). O terceiro e último R vem da palavra *Refinement*, que significa refinar, que consiste em modificações feitas em protocolos que visem diminuir a dor, o desconforto e o medo do animal (KO ET AL., 2010) na tentativa de aperfeiçoar o processo da experimentação animal.

Percebe-se que desde a antiguidade o uso de animais em pesquisa é por muitas vezes controverso e que ao longo dos séculos muitos países foram criando instituições e leis com o intuito de controlar e legislar o uso. O Brasil, desde a década de 40, tem se preocupado com a questão do bem-estar animal. Atualmente, a lei que vigora, no sentido de regular a criação e o uso de animais para a pesquisa e o ensino, é a Lei Arouca (Lei 11.794) de 2008 (KO ET AL., 2010). Existe também um órgão governamental, CONCEA, que regula e controla a experimentação animal.

1.4) Astrócitos e suas funções

A evolução da técnica de cultura de células e o posterior surgimento dos bancos de células possibilitaram o avanço do conhecimento acerca do comportamento de variados tipos celulares. Nesse contexto, o sistema nervoso central (SNC) tem sido alvo crescente de estudos nos últimos anos, seja para esclarecer mecanismos fisiológicos dos diferentes tipos celulares que o

constituem, ou para investigar os diferentes tipos de doenças que acometem esse sistema.

Basicamente, o SNC é constituído por dois grandes grupos de tipos celulares, os neurônios e as células gliais, podendo estas últimas serem subdividas em microglia e macroglia. A macroglia é composta por oligodendrócitos, ependimócitos, astrócitos, dentre outros. Astrócitos e microglia são as células gliais mais abundantes do SNC e ocupam mais da metade do volume do encéfalo humano (EROGLU ET AL., 2010).

A microglia corresponde a 5-20% das células gliais de roedores, e são caracterizadas como macrófagos especializados do SNC, respondendo rapidamente a infecções e estímulos traumáticos. Nesse contexto, adquirem um fenótipo ativado e liberam diversos mediadores pró-inflamatórios (SAIJO ET AL., 2011, CARDONA ET AL., 2006). Os oligodendrócitos possuem como principal função a produção e formação da bainha de mielina que envolve os axônios, fundamental na maquinaria de propagação dos potenciais de ação pelos neurônios (SHERMAN ET AL., 2005).

Nas últimas décadas, os astrócitos têm tido seu papel reconhecido cada vez mais nas Neurociências por conta da mudança de paradigma que traz à tona as células gliais como elementos ativos na fisiologia e nas desordens do SNC. Porém, mesmo com toda atenção voltada a esse tipo celular, inúmeras questões ainda continuam sem repostas ou são respondidas apenas superficialmente. Abaixo, abordaremos alguns tópicos específicos referentes a esse tipo celular, tais como: função, tipos de marcadores e características gerais.

Os astrócitos são formados no período final da embriogênese e nas primeiras semanas pós-natais (RUSNAKOVA ET AL., 2013) e são as células da glia mais abundantes no cérebro, podendo ser divididos em duas classes, levando em consideração a sua morfo-fisiologia: astrócitos protoplasmáticos e astrócitos fibrosos. Astrócitos protoplasmáticos (localizados na substância cinzenta do tecido nervoso) participam das atividades sinápticas e estão em contato com os vasos sanguíneos, além de serem mais complexos e ocuparem um maior volume no tecido cerebral. Já os astrócitos fibrosos (localizados na substância branca) são as células em contato com os nódulos de Ranvier, que

são os espaços existentes entre as bainhas de mielina. O número de astrócitos no SNC varia de acordo com a espécie, e dentro de cada espécie encontra-se uma grande diversidade de astrócitos, dependendo da região do encéfalo e do período do desenvolvimento. Outra constatação é que astrócitos humanos são mais complexos morfo-funcionalmente do que astrócitos de roedores (MATYASH ET AL., 2009; EROGLU ET AL., 2010).

A heterogeneidade astrocitária não se limita à morfologia, se estende à sinalização de íons de cálcio, junções comunicantes, receptores e transportadores de glutamato, além da expressão de proteínas de membrana (RUSNAKOVA ET AL., 2013).

Existem marcadores clássicos que caracterizam as células astrocitárias, como por exemplo: a proteína ácida fibrilar glial (GFAP); a proteína S-100 beta, os transportadores do aminoácido excitatório (glutamato) 1 e 2 (EAAT1 e 2), e a proteína aldeído desidrogenase (ALDH1L1) (RUSNAKOVA ET AL., 2013). Na Figura 1, pode-se observar células astrocitárias em modelos murinos e humanos e *in vitro* e *in vivo*. Percebe-se que astrócitos humanos são mais complexos que astrócitos murinos: é possível observar muitos mais prolongamentos nos astrócitos humanos que em astrócitos murinos, também pode-se observar diferenças entre os modelos *in vivo* e *in vitro*. Na imagem dos modelos *in vivo*, percebe-se que as células possuem morfologia mais estrelada quando comparadas as células do modelo *in vitro*.

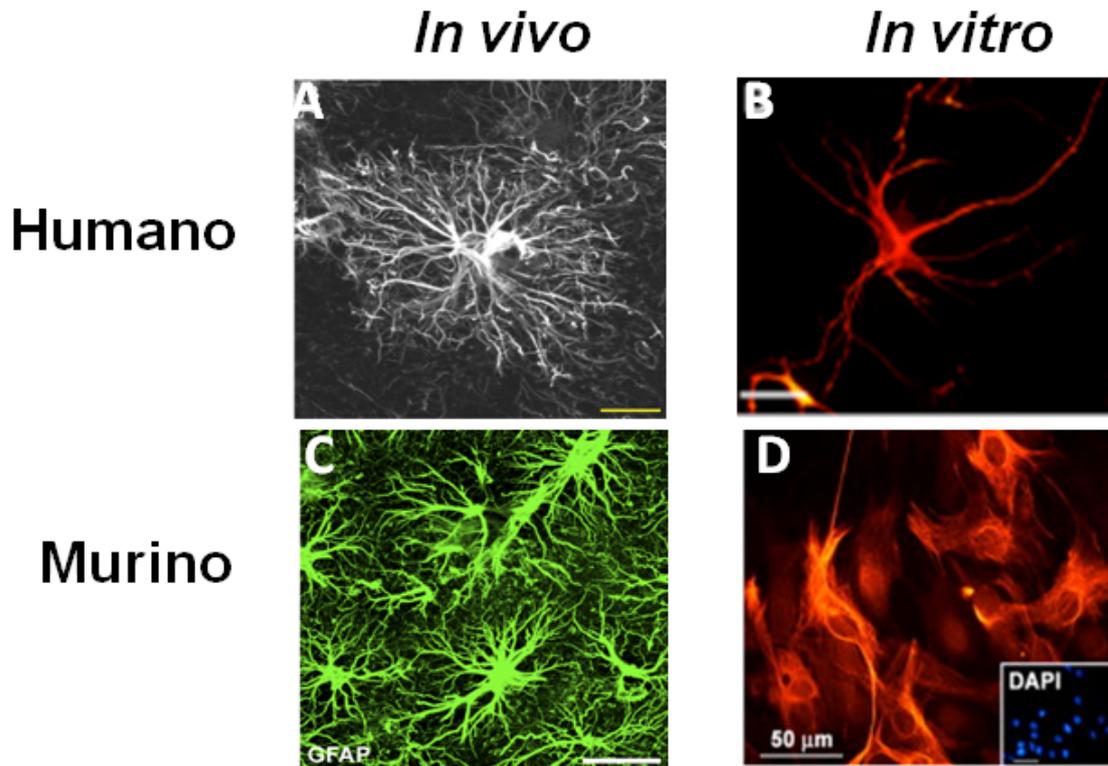


Figura 1: Características morfológicas de astrócitos humanos e murinos *in vivo* (A, C) e *in vitro* (B, D) imunomarcados para GFAP. (A) Astrócito protoplasmático humano *in vivo* (adaptado de Oberheim et al., 2009); (B) Astrócito oriundo de tecido do lobo temporal humano derivado de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia (adaptado de Diniz et al., 2012); (C) Astrócito murino *in vivo* da região do giro denteado do hipocampo (adaptado de Pekny et al., 2014). ; (D) Astrócito murino de córtex cerebral *in vitro* (adaptado de Dezone et al., 2009). Barras de calibração 20 µm (A); 25 µm (C); 50 µm (B, D).

Os astrócitos apresentam uma gama de funções, como regulação metabólica, homeostase iônica e de água, defesa imunológica, remoção de espécies reativas de oxigênio, e liberação de fatores tróficos (OBERHEIM ET AL., 2012; SCHITINE ET AL., 2015). Outra função importante dos astrócitos é a interação com os vasos sanguíneos, no acoplamento neurovascular, regulando o diâmetro dos vasos, e por consequência o fluxo sanguíneo, o que repercute na atividade do sistema nervoso (HOWARTH, 2014).

Mais recentemente, os astrócitos têm sido relacionados a diversos mecanismos sinaptogênicos, desde a formação das sinapses até a eliminação destas (EROGLU ET AL., 2010, DINIZ ET AL., 2012; 2014). É conhecido como sinapse, a região situada entre um neurônio pré-sináptico com um neurônio

pós-sináptico, onde o neurônio pré-sináptico libera neurotransmissores, que se ligam a seus receptores presentes no terminal pós-sináptico da membrana da célula. Esse fenômeno é a base de toda geração de respostas químicas e elétricas e consequente transferência da informação neural (PYKA ET AL., 2011). Algumas proteínas exercem funções importantes no terminal pré-sináptico como, por exemplo, sinaptofisina, que é um glicoproteína integral de membrana presente em vesículas do terminal pré-sináptico (WIEDENMANN ET AL., 1986).

A transmissão sináptica baseia-se em quatro etapas: síntese e armazenamento do transmissor, liberação do transmissor, interação do transmissor com receptores da membrana pós-sináptica e remoção do transmissor da fenda sináptica. (KANDEL ET AL, 2014).

Durante muito tempo, no campo das Neurociências vigorou a ideia de que o processo sináptico era exclusivo de células neuronais pré- e pós-sinápticas. Porém, na década de 90, evidências surgiram mostrando a participação ativa dos astrócitos nesse contexto, dando origem ao conceito de sinapse tripartite, formada pelos neurônios pré- e pós-sinápticos e pelos prolongamentos das células astrocitárias (ARAQUE ET AL., 2004; 2009) (Figura 2). Estudos recentes mostram que os astrócitos atuam na formação, função, plasticidade e eliminação sináptica (EROGLU ET AL., 2010). Os astrócitos possuem papel importante no controle dos níveis e remoção de neurotransmissores, como por exemplo o glutamato da fenda sináptica, impedindo que altos níveis de glutamato sejam tóxicos aos neurônios (MCKENNA, 2013). Além disso, evidências apontam que o contato astrocitário (com os neurônios), bem como fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular secretadas por estas células, são determinantes para formação e funcionamento das sinapses (DINIZ ET AL., 2012; 2014; CLARKE ET AL., 2013).

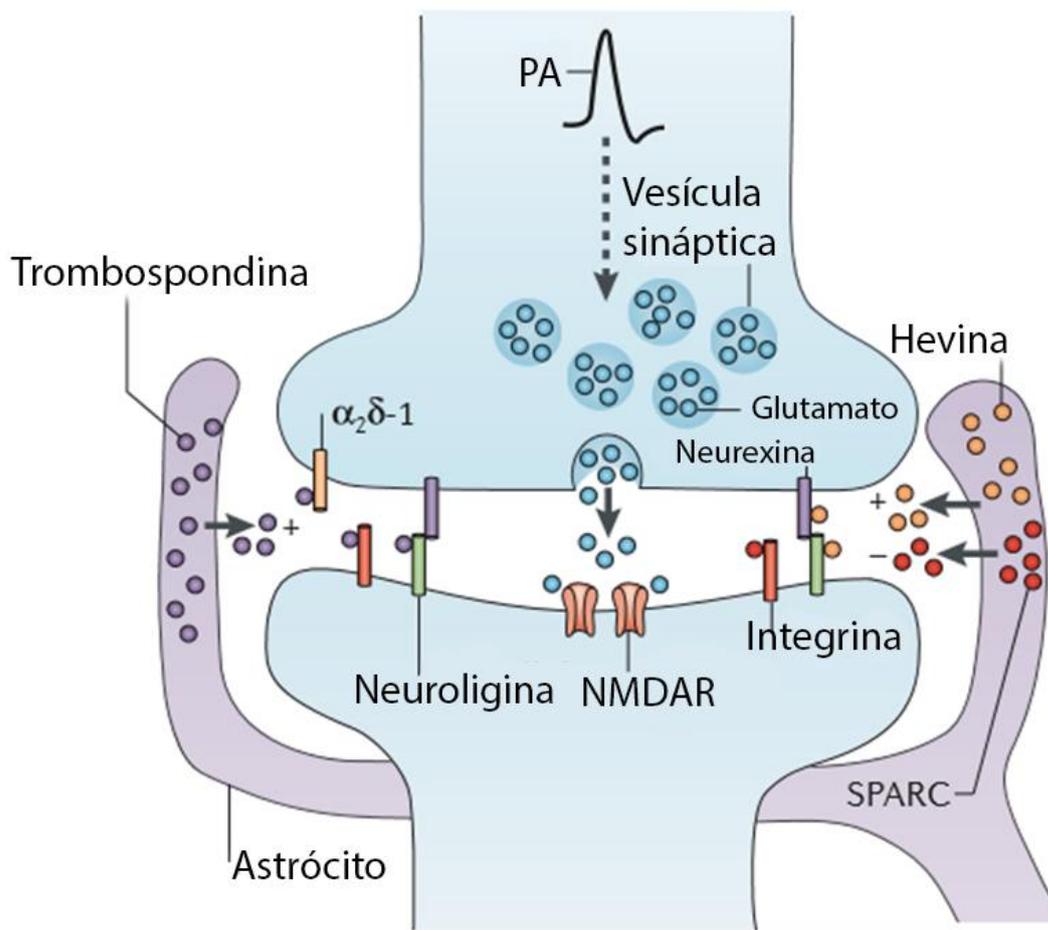


Figura 2: Participação dos astrócitos nas sinapses: astrócitos são capazes de secretar moléculas como trombospondina, Sparc, Hevina, entre outras, que atuam modulando as sinapses (adaptado de CLARKE ET AL., 2013). Processo sináptico entre neurônio pré-sináptico e neurônio pós-sináptico sendo modulado pela célula astrocitária.

1.5) Métodos de estudo da função dos astrócitos

Atualmente existem diversos modelos que são utilizados como ferramentas no estudo das células astrocitárias, como por exemplo, modelos *in vitro*, e modelos *in vivo*. Foram percebidas nos modelos *in vivo* algumas limitações, como a falta de técnicas sofisticadas para avaliar o efeito causado por distintos grupos de células. Dessa forma os modelos *in vitro* surgem como razoável alternativa para se estudar o comportamento específico dos mecanismos das células astrocitárias (LANGE ET AL, 2012).

Porém temos que destacar que o modelo *in vitro* também possui algumas limitações. As principais críticas aos modelos *in vitro* surgem a partir da perda de contato das células astrocíticas com seu meio extracelular, uma vez que a interação de astrócitos com vasos sanguíneos e com os fatores secretados pelo meio extracelular, são responsáveis por funções importantes da célula astrocítica, e isso não é possível quando a célula é cultivada isoladamente (LANGE ET AL, 2012).

No que diz respeito a abordagens metodológicas utilizadas no estudo da célula astrocítica *in vitro*, temos algumas possibilidades, como: cultura primária de astrócito, cultura secundária de astrócitos, astrócitos derivados a partir de células-tronco de pluripotência induzida (iPS) e linhagens imortalizadas de células astrocítica. Abordo abaixo brevemente cada um desses modelos.

Culturas primária e secundária de astrócitos são obtidas diretamente de diferentes partes do encéfalo de animais experimentais ou de humanos (fragmentos cirúrgicos) a partir de protocolos bem definidos que resultarão na célula de interesse isolada e pronta para o crescimento em condições artificiais. Os protocolos para obtenção de culturas astrocíticas podem variar no que tange composição do meio utilizado, tipo de substrato utilizado, métodos de subcultivo, tempo de cultura, entre outros. Essas variáveis podem desempenhar papel importante na morfologia e expressão de genes das células em cultura (LANGE ET AL, 2012; DEZONNE ET AL., 2017).

Células iPS são células troncos pluripotentes, e astrócitos humanos derivados a partir de células tronco pluripotentes abrem grandes perspectivas no estudo de doenças neurológicas *in vitro* (CHANDRASEKARAN ET AL., 2016). Recentemente nosso grupo desenvolveu um protocolo capaz de gerar astrócitos humanos a partir de organoides cerebrais oriundos de células iPS. Essas células responderam morfológicamente e funcionalmente como astrócitos (DEZONNE ET AL., 2017).

Outra ferramenta bastante utilizada para se estudar astrócitos, são as linhagens imortalizadas. Células imortalizadas são estabelecidas a partir da perda do controle das vias do ciclo celular, tendo a introdução de telomerase papel chave nesse processo. Com o aumento dos telômeros tem-se uma maior estabilidade dos cromossomos, tornado assim as células imortais.

Alternativamente, é feita a inativação de p53 e pRB, proteínas controladores do ciclo celular (IRFAN-MAQSOOD ET AL., 2013). Temos como exemplos de linhagens imortalizadas de astrócitos, H-2K^b-tsA58, uma linhagem estabelecida a partir de camundongos H-2K^b-tsA58 (LANGLEY ET AL., 2009), a linhagem U-373, um astrocitoma de glioblastoma humano (Public Health England¹) e a linhagem astrocitária C6, obtida a partir de um tumor glial de rato (ATCC²).

1.6) Justificativa

O uso de animais experimentais tem se mostrado uma excelente ferramenta e modelo para a investigação científica sobre o funcionamento do sistema nervoso normal e patológico. Na direção que aponta para um uso mais crítico e controlado dos animais em pesquisa, e em acordo com a legislação e as necessidades econômicas, tem-se buscado alternativas para otimizar o uso destes animais. Dentre essas, as linhagens celulares e o uso de células congeladas tem chamado a atenção dos pesquisadores. A economia financeira, a agilidade e a legislação no que se refere à bioética são fatores que devem ser levados em consideração ao adotar tais alternativas.

O laboratório de Neurobiologia Celular, supervisionado pela Dra. Flávia Gomes, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, possui como temática central compreender os mecanismos envolvidos nas interações celulares do SNC em condições normais e patológicas em diferentes regiões do encéfalo, para isso, embora faça o uso de material humano e de linhagens celulares imortalizadas em alguns de seus projetos, usa majoritariamente animais experimentais (ratos e camundongos) para responder às questões científicas. Para a maior parte dos estudos *in vitro*, utilizam-se culturas primárias e secundárias de astrócitos derivados de camundongos recém-nascidos. Embora essa metodologia seja bem estabelecida há mais de uma década nesse grupo, algumas limitações podem restringir o andamento dos projetos. Abaixo, algumas linhas de pesquisa desenvolvidas no laboratório de neurobiologia celular.

¹ www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=08061901&collection=ecacc_gc

² www.atcc.org/Products/All/CCL-107.aspx#characteristics

Papel dos astrócitos na formação de sinapses: esse projeto consiste em entender a formação e o funcionamento das sinapses, lançando um olhar aprofundado nas células envolvidas nesse contexto, nos mecanismos pelos quais as sinapses são formadas e, principalmente, quais moléculas fazem parte dessa complexa maquinaria. Dentro dessa perspectiva, foram desvendados alguns dos mecanismos pelos quais os astrócitos induzem a formação de sinapses no córtex cerebral, identificando fatores de crescimento secretados por astrócitos que induzem a formação de sinapses excitatórias e inibitórias (DINIZ ET AL., 2012 , 2014).

Estudo das disfunções glias em patologias do SNC: o papel ativo das células glias em diversos eventos funcionais do SNC, principalmente nos processos sinaptogênicos, faz com que essas células tenham grande importância também nos estudos das patologias que acometem esse sistema, como autismo, epilepsia, esquizofrenia, encefalopatia séptica e doenças neurodegenerativas. Atualmente, estudamos como disfunções glias podem impactar o funcionamento neural em algumas dessas condições patológicas, como encefalopatia séptica (MORAES ET AL., 2014), a doença de Parkinson, mal de Alzheimer (DINIZ ET AL., 2017).

Efeitos de compostos naturais no SNC: com a descoberta de que compostos naturais modulam o funcionamento do SNC, e a possibilidade desses compostos atuarem diretamente em células glias e neurônios, temos investigado o papel dos flavonoides nesse contexto. Demonstramos, recentemente, o caráter neuroprotetor, sinaptogênico e na cognição, do flavonóide hesperidina (MATIAS ET AL., 2014, 2017).

Diferenciação de células-troncos neurais: busca-se entender os mecanismos genéticos e epigenéticos de diferenciação de células-tronco neurais em astrócitos do córtex cerebral (STIPURSKY ET AL., 2007, 2012, 2014). Mais recentemente, desenvolvemos um novo protocolo de derivação de astrócitos humanos a partir de organoides de células-tronco embrionárias humanas (DEZONNE ET AL., 2017).

Interações neurovasculares no córtex cerebral: essa linha de pesquisa, liderada pela Dra. Joice Stipursky, tem como objetivo compreender a interação entre células-tronco neurais, astrócitos e neurônios com os vasos sanguíneos

durante a formação da vasculatura cerebral e da barreira hematoencefálica durante o desenvolvimento embrionário do córtex cerebral, e em contextos patológicos como na síndrome alcoólica fetal. Recentemente, o grupo demonstrou que as células de glia radial, progenitores neurais, controlam o a migração e diferenciação das células endoteliais em momentos precoces do desenvolvimento da vasculatura cerebral (SIQUEIRA ET AL., 2017).

Para o desenvolvimento desses projetos, temos utilizado abordagens *in vivo* (modelos animais) e *in vitro* (culturas de astrócitos murinos e humanos).

Nem sempre se tem em mãos os animais necessários para o preparo das culturas; ora não se tem a quantidade necessária, ora não se tem no momento em que se precisa, o que atrasa, até certo ponto, o desenvolvimento de alguns projetos. A possibilidade de ter células à disposição, no momento em que se precisa, certamente representaria uma otimização de tempo na execução dos experimentos e obtenção dos resultados. Uma alternativa seria a utilização de linhagens astrocitárias imortalizadas, porém células derivadas de culturas primárias congeladas apresentariam características mais próximas as que se encontram *in vivo* do que uma linhagem imortalizada.

Assim sendo, esta dissertação de mestrado consistiu em comparar morfológica e funcionalmente culturas de astrócitos murinos submetidos a procedimento de congelamento/descongelamento com culturas de astrócitos que não foram submetidas a estas condições. As atividades realizadas nessa dissertação constituem a implementação de uma nova abordagem metodológica para o estudo dos astrócitos e poderá, a médio prazo, contribuir para a criação de um banco de astrócitos plenamente viáveis para uso. Assim como serem incluídos como um método alternativo no uso de animais em experimentação.

2. Objetivos

2.1) Objetivo geral:

Caracterizar e comparar morfofuncionalmente culturas secundárias de astrócitos derivados do córtex cerebral murino, cujas culturas primárias foram submetidas ou não ao processo de congelamento/descongelamento. Oferecer ao experimentador fácil acesso a células de interesse e otimizar o uso de animais em pesquisa, além da formação de um estoque de células congeladas.

2.2) Objetivos específicos:

- Caracterizar morfológicamente astrócitos derivados do córtex cerebral de camundongos suíços pós-natos, CANC (cultura secundária derivada de astrócito **não congelado**) e CAC (cultura secundária derivada de astrócito **congelado**), por microscopia em contraste de fase;
- Comparar o número de células e o tempo de confluência em CANC e CAC;
- Caracterizar o perfil de heterogeneidade celular em culturas de CAC e CANC, avaliando a distribuição/quantidade de células que expressam as proteínas específicas astrocitárias;
- Avaliar o grau de pureza das culturas, identificando a presença de outros tipos celulares em CANC e CAC;
- Caracterizar funcionalmente os astrócitos que foram submetidos ao congelamento, através da avaliação da sua capacidade de suporte de sobrevivência e arborização neuronal, e ensaios de formação de sinapses.

3. Metodologia

3.1) Animais

Foram utilizados aproximadamente 30 camundongos suíços (*Mus musculus*), fêmeas com idade gestacional entre 14-16 dias e neonatos até o terceiro dia, do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do CCS da UFRJ (CEUA 004-16; Anexo 1).

3.2) Cultura primária de astrócitos corticais

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas conforme descrito por nosso grupo (DINIZ ET AL., 2012) a partir do córtex cerebral de camundongos suíços neonatos (P0-P2). Após a decapitação dos camundongos, aproximadamente 20 animais, os encéfalos foram retirados, mantidos em tampão Gey's, e as meninges retiradas. O córtex cerebral foi dissecado e as células mecanicamente dissociadas com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. As células foram plaqueadas (3 milhões de células por garrafa) em garrafas com área de crescimento de 25 cm² previamente tratadas com poli-L-lisina (50 µg/mL, Sigma). As culturas foram mantidas em meio com soro (MCS), constituído de meio de Eagle modificado por Dulbecco/F12 (DMEM, Invitrogen), contendo 1 mM de glutamina (Gibco-Invitrogen), 0,1% de penicilina/estreptomicina e fungizona (Invitrogen), suplementado com F-12 e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) por, aproximadamente, 9 dias na incubadora à 37°C, a 5% de CO₂. O meio de cultura foi totalmente trocado a cada 2 dias.

3.3) Cultura secundária de astrócitos corticais

As culturas secundárias de astrócitos foram obtidas a partir de culturas primárias de astrócitos (descritas acima), submetidas à uma passagem enzimática. Para isso, retiramos o meio de cultura das garrafas e incubamos as células com 2 mL de tripsina (0,25%, SIGMA) durante 5 minutos. A ação da

tripsina foi neutralizada com adição de 2 mL de MCS 10% e as células foram centrifugadas a 200 g durante 5 minutos à 25°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em MCS 10% e as células foram plaqueadas em novas garrafas com área de crescimento de 25 cm² ou placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro de 13mm (Knitell Glass), previamente tratadas com poli-L-lisina (50 µg/mL, Sigma). A densidade de plaqueamento foi de aproximadamente 500.000 células para as garrafas e 100.000 células para as placas de 24 poços (por poço). As culturas foram mantidas em MCS 10% por aproximadamente 7 dias, na incubadora à 37°C, a 5% de CO₂. O meio de cultura foi totalmente trocado a cada 2 dias.

3.4) Cultura primária de neurônios corticais

As culturas primárias neuronais foram preparadas a partir do córtex cerebral de camundongos suíços com 14-16 dias embrionários. Após anestesia, isoflurano por inalação (5%), e deslocamento cervical da fêmea grávida, os embriões foram retirados, dissecados e os encéfalos mantidos em tampão Gey`s (vide apêndice). O córtex foi separado, a meninge removida e o tecido cortical dissociado. Após a dissociação, as células foram plaqueadas nas seguintes densidades: 75.000 células, para os ensaios de atividade sinaptogênica e análise de núcleos picnóticos, ou 50.000 células, para os ensaios de suporte de sobrevivência neuronal e arborização neuronal, em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm (Knitell Glass) previamente tratadas com poli-L-lisina (50 µg/mL, Sigma). As culturas foram mantidas em meio Neurobasal (Invitrogen, catálogo 21103-049) suplementado com 1% de glutamina, 0,1% de penicilina/estreptomicina e fungizona (Invitrogen), 2% de B27 (Invitrogen) e 0,065 % de ARA-C (SIGMA), e mantidas na incubadora à 37°C, a 5% de CO₂. Após 7 dias *in vitro* (DIV), um terço (em relação ao volume inicial) de meio Neurobasal foi adicionado às culturas. As culturas de neurônios foram mantidas por aproximadamente 12 dias.

3.5) Congelamento de células

Após a confluência das culturas primárias de astrócitos corticais, foi retirado o meio de cultura das garrafas e as células incubadas com 2 mL de tripsina (0,25%, SIGMA) durante 5 minutos. A ação da tripsina foi neutralizada com adição de MCS e as células foram centrifugadas a 200 g durante 5 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 900 μ L de SFB e o número de células determinado (em média 1×10^6 células) com o auxílio de câmara de Neubauer. Após a contagem, foram adicionados 100 μ L de DMSO (SIGMA) e as células foram congeladas e mantidas em criotubos (Corning ou TPP). Inicialmente, as células foram congeladas em um aparato próprio para congelamento de criotubos (*Mr. Frosty, Thermo-Fischer*), em freezer -80°C por em média 24 horas para congelamento, e posteriormente, mantidas em cilindro contendo nitrogênio líquido a -196°C até sua utilização.

3.6) Descongelamento de células

Criotubos contendo astrócitos congelados (a -196°C) por, aproximadamente, 30 dias foram colocados em banho maria à 37°C por cerca de 1 minuto. Logo após, a suspensão celular foi transferida para um tubo tipo falcon com capacidade de 15 mL contendo o dobro do volume de MCS, 2 mL. As células foram centrifugadas a 400X g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas em MCS e plaqueadas em garrafas com área de crescimento de 25 cm^2 ou placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm (Knutell Glass), como descrito no item 3.3. As culturas foram mantidas em MCS por, aproximadamente, 7 dias na incubadora à 37°C , a 5% de CO_2 . O meio de cultura foi totalmente trocado a cada 2 dias.

3.7) Imunocitoquímica

Após atingirem a confluência em placas de 24 poços, as culturas secundárias de astrócitos foram fixadas com paraformaldeído (VETEC) 4% por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato (PBS, vide apêndice), por 5 minutos cada lavagem. Para bloquear ligações inespecíficas, as células foram incubadas com uma solução de

bloqueio (Vide apêndice) por 1 hora. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários por, aproximadamente, 12 horas à 4°C, diluídos na própria solução de bloqueio. Após o período de incubação, as células foram lavadas 5 vezes de 5 minutos com PBS, e incubadas com anticorpos secundários, diluídos em solução de bloqueio por, aproximadamente, 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos primários e secundários específicos (Tabela 1), as células foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com PBS e, em seguida, incubadas por 5 minutos com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; SIGMA), corante específico de núcleo. Após a incubação com DAPI, as células foram lavadas 3 vezes de 1 minuto com PBS e as lamínulas foram montadas com auxílio do meio de montagem Aquamount (DAKO). Para cada ensaio realizado, foram feitas duplas marcações de GFAP com os demais marcadores e todas as lamínulas foram incubadas com DAPI. As marcações foram visualizadas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse TE-2000S. Os ensaios foram pareados, ou seja, tanto CANC quanto as CAC foram analisadas ao mesmo tempo.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunocitoquímica:

Anticorpo primário	Feito em	Diluição	Fabricante
Anti-GFAP	Coelho	1:500	Abcam
Anti-Aldh1L1	Camundongo	1:200	Millipore
Anti-F4/80	Rato	1:100	AbD Serotec
Anti- β -Tub III	Camundongo	1:500	Promega
Anti-Sinaptofisina	Camundongo	1:500	Millipore
Anti-PSD95	Coelho	1:100	Cell Signaling

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunocitoquímica:

Anticorpo secundário	Feito em	Diluição	Fabricante
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Coelho	1:400	Life Technologies
Anti-Mouse Alexa Fluor 546	Camundongo	1:1000	Life Technologies

3.8) Quantificação da imunocitoquímica

As imagens foram obtidas a partir do microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 2000-S. Foram utilizadas lentes objetivas com diferentes magnificações, dependendo do antígeno a ser analisado: 40X (GFAP, β -Tub III e F4/80) e 60X (Aldh1L1 e GFAP). Após a captura das imagens (em média 10 campos por lamínula), as fotomicrografias foram quantificadas com auxílio do programa Photoshop. A proporção de células imunomarcadas para cada antígeno foi normalizada de acordo com o número total de células, avaliado pela marcação com DAPI.

3.9) Preparo de meio condicionado de astrócitos

Para obtenção do meio condicionado astrocitário, de CANC e CAC, após as monocamadas astrocitárias atingirem a confluência, o MCS foi removido, as células foram lavadas 3 vezes com tampão Gey's e, em seguida, adicionados 3 mL de meio sem soro (MSS) por 4 horas. Posteriormente, o MSS foi retirado e as células foram mantidas por 24 horas em presença de 2 mL de novo MSS para condicionamento. Em seguida, o meio condicionado astrocitário foi centrifugado a 1500X g por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi recolhido e imediatamente armazenado em criotubos à -196°C, para uso posterior.

3.10) Ensaio de indução de formação de sinapses neuronais por meio condicionado de astrócitos

Para realizar o ensaio de formação de sinapses, culturas de neurônios com 12 DIV, densidade de plaqueamento de 75.000 células, foram incubadas em diferentes meios, por 3 horas: MSS, meio Neurobasal, meio condicionado de células CANC (MCANC) e meio condicionado de células CAC (MCAC). Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos e a formação de sinapses foi analisada por imunocitoquímica para as proteínas sinápticas, sinaptofisina e PSD-95. Foram consideradas sinapses estruturalmente formadas quando ocorreu a sobreposição de marcação da proteína pré-sináptica, sinaptofisina, e da proteína pós-sináptica, PSD-95, formando um puncta de colocalização. Foram realizados três experimentos e analisados aproximadamente 20 campos de cada condição por experimento com auxílio do programa *ImageJ* (NIH).

3.11) Ensaio de arborização neuronal induzida por meio condicionado astrocitário

As culturas primárias neuronais foram preparadas, de acordo com o item 3.4 a partir do córtex cerebral de camundongos suíços com 14-16 dias embrionários. Após anestesia e deslocamento cervical da fêmea grávida, os embriões foram retirados, dissecados e os encéfalos mantidos em tampão Gey's. O córtex foi separado, a meninge removida e o tecido cortical dissociado. Após a dissociação, 50.000 células foram plaqueadas em placas de 24 poços (50 mil células/poço) e as culturas foram mantidas em meio Neurobasal por 24 horas, em incubadora à 37°C, a 5% de CO₂. Após esse período de 24 horas, o meio Neurobasal foi retirado e as culturas foram mantidas por 24 horas nas seguintes condições: MSS, meio Neurobasal, MCANC e MCAC. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos.

Para identificação dos neuritos e arborização neuronal, foram realizados ensaios de imunocitoquímica para β -Tub III, marcador de célula neuronal (Tabela 1). Posteriormente, a aquisição das imagens, as células marcadas

positivamente foram analisadas com auxílio do programa Photoshop onde o número de neuritos de cada célula foi determinado, traçando assim um perfil de arborização dos neurônios a partir dos diferentes tratamentos aos quais foram expostos. (SPOHR ET AL., 2012). Foram contadas somente as projeções primárias, aquelas que saem diretamente do corpo celular do neurônio, as projeções secundárias, que se originam nas projeções primárias, não foram levadas em consideração, conforme a Figura 3. Foram realizados dois experimentos e analisados aproximadamente 25 campos de cada condição por experimento.



Figura 3: Metodologia de contagem de neuritos. Para a medida de arborização foram determinados o número de projeções que são provenientes do corpo celular do neurônio. Os círculo em vermelho indicam exemplos de projeções que foram consideradas durante análise dos dados.

3.12) Análise morfológica através de microscopia de contraste de fase

Tanto para CANC quanto para CAC, as imagens foram adquiridas com o auxílio de Microscópio Nikon Eclipse TE 2000-S através de objetivas com aumento de 10X e 20X, em contraste de fase. As fotomicrografias obtidas foram analisadas com o propósito de se comparar a morfologia e a dinâmica de crescimento dos astrócitos, em ambas as condições.

3.13) Testes estatísticos

Foram realizados dois tipos de testes estatísticos: teste t de Student e Anova, utilizando-se o software GraphPrism 5.0. Para os experimentos onde foram comparadas duas condições, CANC e CAC, foi utilizado teste t não pareado. Para os ensaios onde foram comparadas três ou mais variáveis, caso dos ensaios com meio sem soro, meio Neurobasal, MCANC e MCAC, foi utilizado teste estatístico Anova, com pós teste de Tukey.

3.14) Resumo das etapas metodológicas

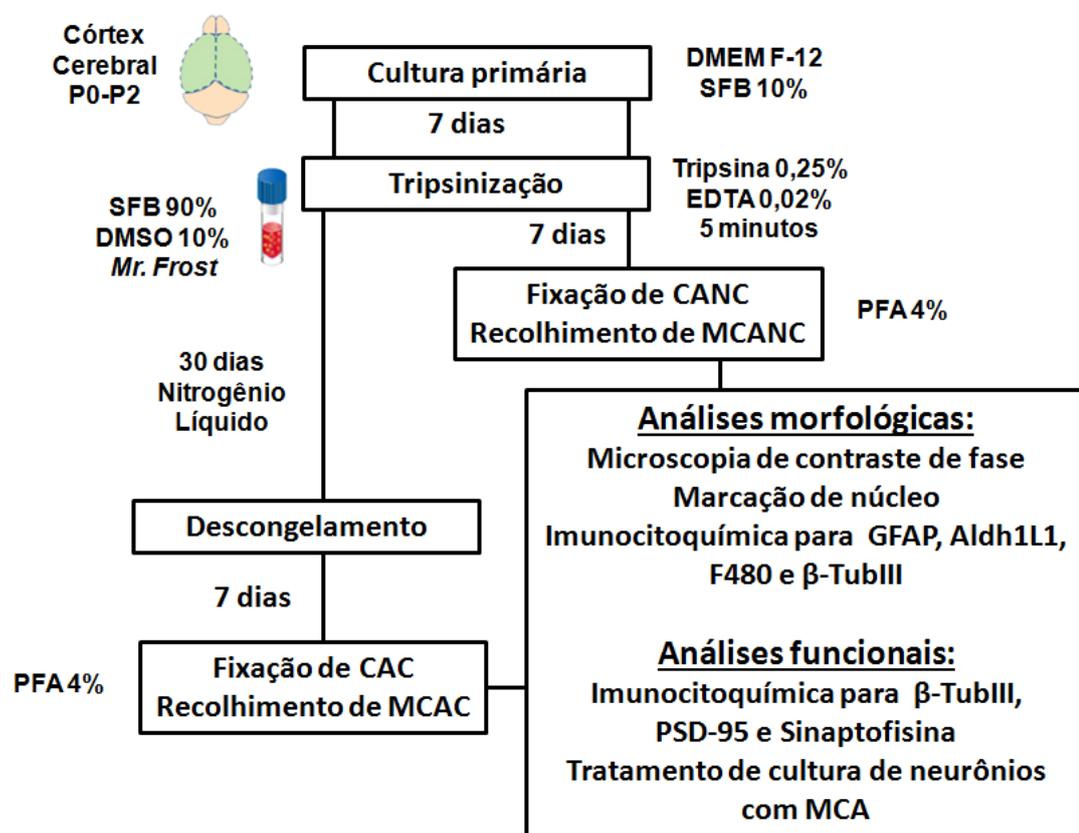


Figura 4: Resumo das etapas experimentais. Esquema mostrando a preparação de CANC e CAC e os ensaios realizados para caracterização das duas populações.

4. Resultados

4.1) Análise do perfil de crescimento e morfologia celular de CANC e CAC

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas e quando atingiram confluência foram subcultivadas, parte foi congelada por aproximadamente 30 dias (CAC) e parte foi plaqueada diretamente em placa de 24 poços e em garrafa com área de crescimento de 25 cm² (CANC). Após 30 dias, as CAC foram descongeladas e plaqueadas, e ambas, CAC e CANC, foram analisadas quanto ao seu perfil de crescimento e morfologia, por microscopia em contraste de fase.

Como observado na Figura 5, após atingirem a confluência, astrócitos derivados de CANC (Figura 5F) e CAC (Figura 5E) apresentaram morfologia protoplasmática formando monocamadas bem definidas, características de astrócitos em cultura. Na Figura 5A-D, percebemos a evolução da cultura ao longo dos dias (CANC). Dessa forma, não conseguimos identificar características morfológicas distintas entre as duas populações.

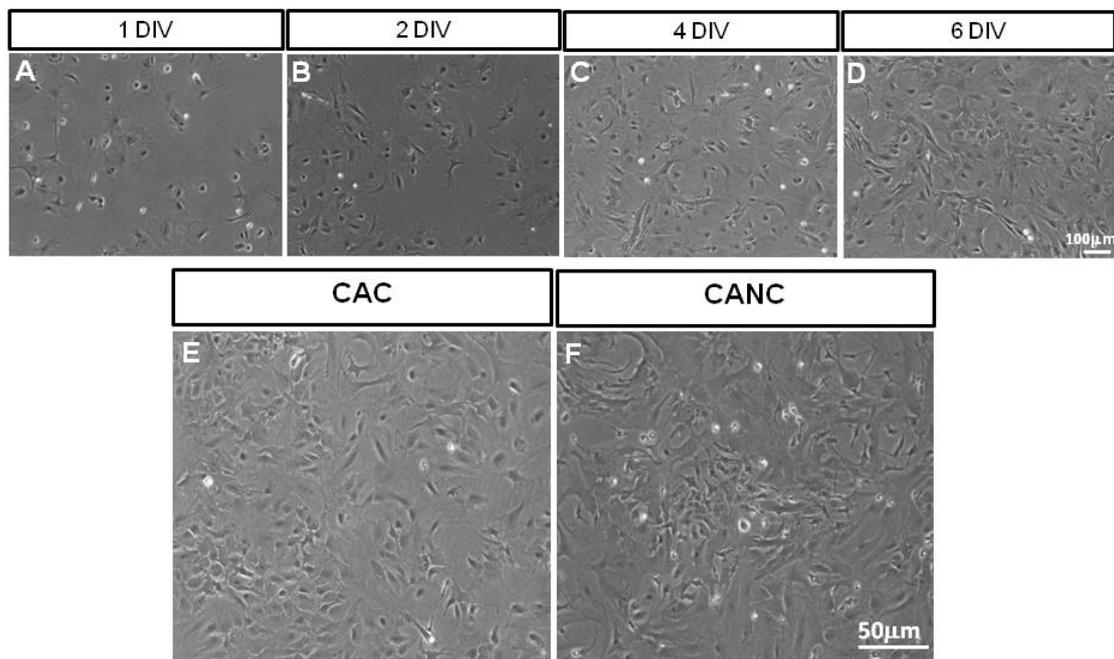


Figura 5: Morfologia de CANC e CAC não varia. Fotomicrografias em contraste de fase de CANC e CAC mostram a evolução da cultura após (A) 1, (B) 2, (C) 4 e (D) 6 DIV. Em (E) e (F) observa-se que não há variação morfológica entre as populações após aproximadamente 7 dias. Em (A,B,C,D) (CANC), percebemos a evolução da cultura ao longo dos DIV. Barras de calibração de 50 μm e 100 μm .

Como mostrado da Tabela 3, o tempo de crescimento até a confluência de CANC e CAC, após serem submetidas ao processo de tripsinização, foi de aproximadamente 7 dias quando plaqueadas em placas de 24 poços. Desta forma, não foram observadas diferenças significativas na dinâmica de crescimento dos dois tipos de cultura, uma vez que CANC e CAC levaram aproximadamente o mesmo tempo (7dias) para atingirem confluência (Tabela 2).

Tabela 3: Dinâmica de crescimento de CANC e CAC.

Experimento	Confluência (CANC)	Confluência (CAC)
Cultura 1	7 dias (placa)	6 dias (placa)
Cultura 2	7 dias (placa)	8 dias (placa)
Cultura 3	8 dias (placa)	7 dias (placa)
Média	7,3 dias	7 dias

Para analisar o número de células em CANS e CAC, após atingirem a confluência, as culturas foram imunomarcadas para GFAP, proteína de filamento intermediário marcadora de astrócito, e coradas pelo marcador nuclear, DAPI. Após a quantificação das células marcadas, observamos que monocamadas confluentes de CANS e CAC possuem, em média, números semelhantes de células (Figura 6).

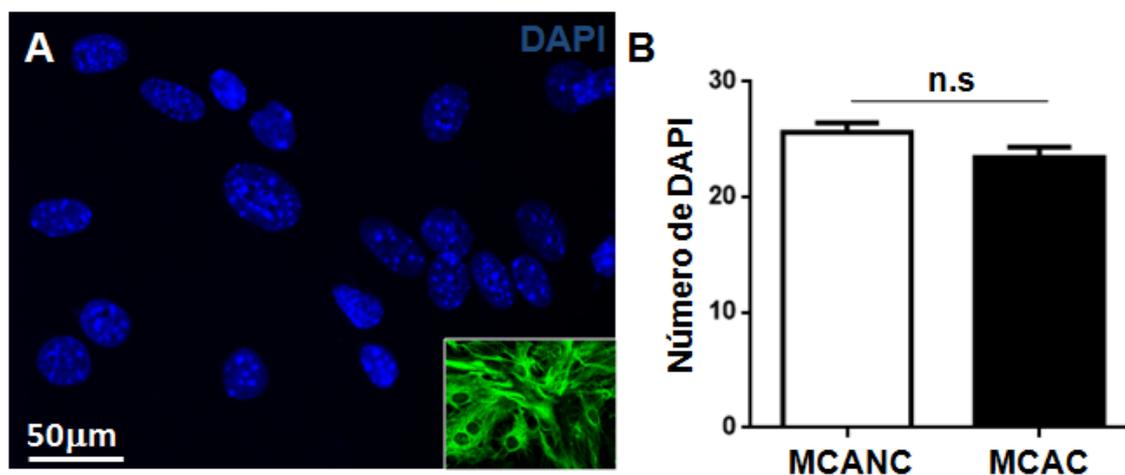


Figura 6: O processo de congelamento não afeta o número de células totais em monocamadas confluentes de CANS e CAC. Após atingirem a confluência, as culturas foram imunomarcadas para GFAP, marcador astrocitário e marcadas com o corante nuclear, DAPI. O número de núcleos marcados para DAPI foi utilizado para quantificação do número de células nas monocamadas. Observa-se em (B) que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. $p=0,08$, $n=4$. Barra de calibração de 50 μm.

4.2) Caracterização da composição celular de CANS e CAC

Com o objetivo de determinar se o processo de congelamento e descongelamento afetaria o perfil populacional das células congeladas em comparação com as células não congeladas, foi feita a caracterização da composição celular das culturas nas diferentes condições analisadas.

A análise do número de células marcadas para a proteína típica astrocitária GFAP (proteína ácida fibrilar glial) demonstrou que 74,99% das células foram positivas para GFAP em CANS, e 72,79% em CAC, sem diferenças estatísticas significativas entre as condições analisadas (Figura 7).

Como podemos observar, em ambas as condições, identificamos a marcação fibrilar típica desta proteína, distribuindo-se desde a região perinuclear (Figura 7C, F) até as extremidades das células, evidenciando a morfologia protoplasmática dos astrócitos em ambas as culturas.

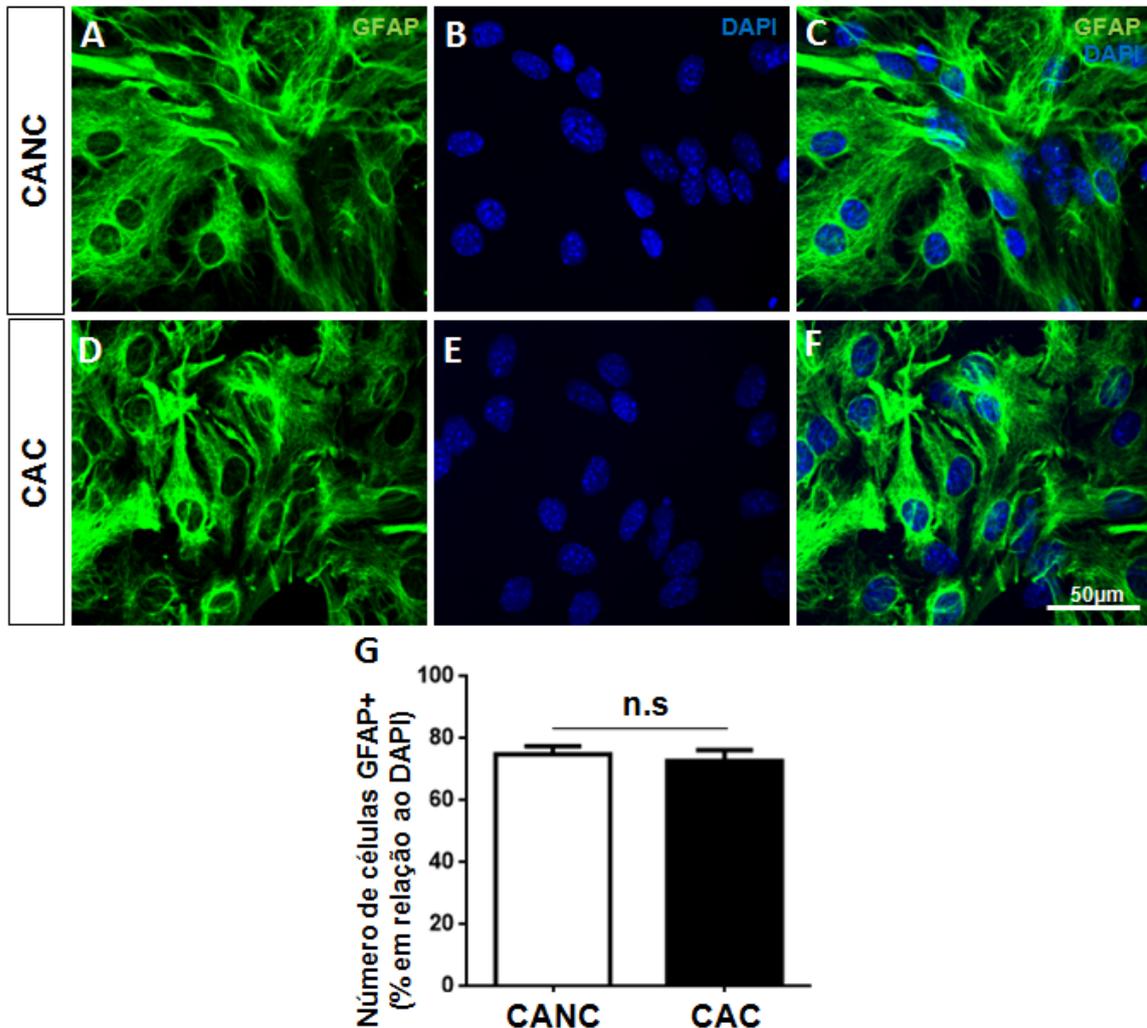


Figura 7: CANC e CAC possuem mesmo perfil de marcação para GFAP. Após a confluência, CANC e CAC foram submetidas a ensaio de imunocitoquímica para GFAP, (A, D), os núcleos foram corados com DAPI (B, E) e as imagens sobrepostas (C, F). Notar a organização característica dos filamentos de GFAP ao longo do citoplasma. A quantificação do número de células (G) não revelou diferenças na proporção de células GFAP+ nas diferentes culturas. $p=0,6201$, $n=3$. Barra de calibração de 50µm.

Adicionalmente, utilizamos outro marcador astrocitário, Aldh1L1 (enzima aldeído desidrogenase), para comparar CANC e CAC por imunocitoquímica. Observamos que 86,99% das células eram positivas para Aldh1L1 em CANC e 81,77% em CAC, não sendo identificadas diferenças estatísticas significativas nas condições analisadas (Figura 8). Podemos perceber que algumas células possuíam intensidade de marcação distintas (Figura 8, G).

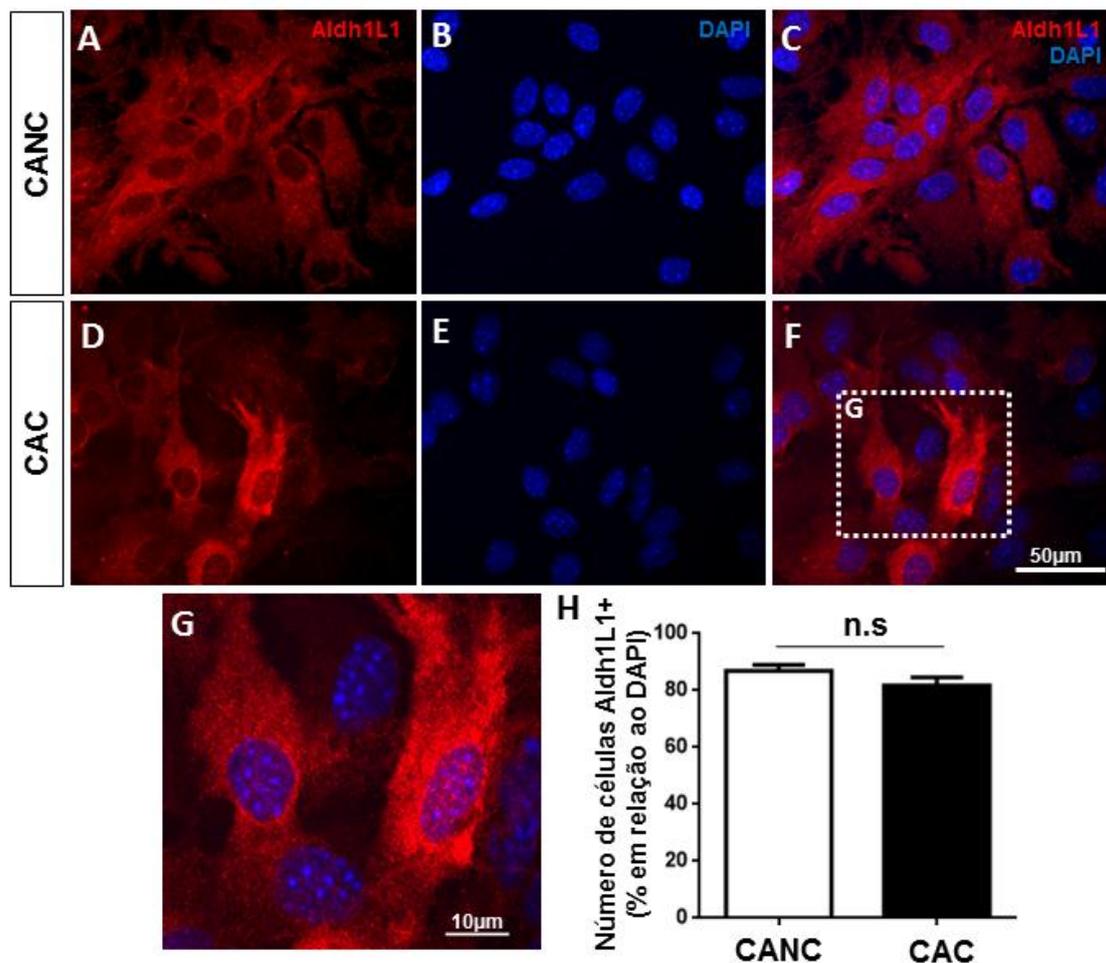


Figura 8: CANC e CAC possuem mesmo perfil de marcação para Aldh1L1. Após a confluência, CANC e CAC foram submetidas a ensaio de imunocitoquímica para Aldh1L1 (A, D). Os núcleos foram corados com DAPI (B, E) e as imagens sobrepostas (C, F, G). Notar em (G) a marcação punctada característica da distribuição desta enzima ao longo do citoplasma. A quantificação do número de células (H) não revelou diferenças na proporção de células Aldh1L1+ nas diferentes culturas. $p=0,1537$. $n=3$. Barra de calibração de $50\mu\text{m}$ e $10\mu\text{m}$.

A identificação de múltiplos marcadores de diferenciação em uma mesma célula, contribui para garantir a identidade de determinado tipo celular. Para tanto, comparamos CANC e CAC com relação à presença simultânea de Aldh1L1 e GFAP por imunocitoquímica. Após análise e quantificação das células duplamente marcadas, observamos que em CANC, 71,07% das células eram Aldh1L1+/GFAP+, e em CAC, 68,03% (não foram identificadas diferenças estatísticas significativas dos marcadores em questão nas condições analisadas) (Figura 9). Nota-se, em ambas as culturas, a presença de células que marcam apenas para uma das proteínas analisadas, além de células com intensidades distintas de imunomarcação.

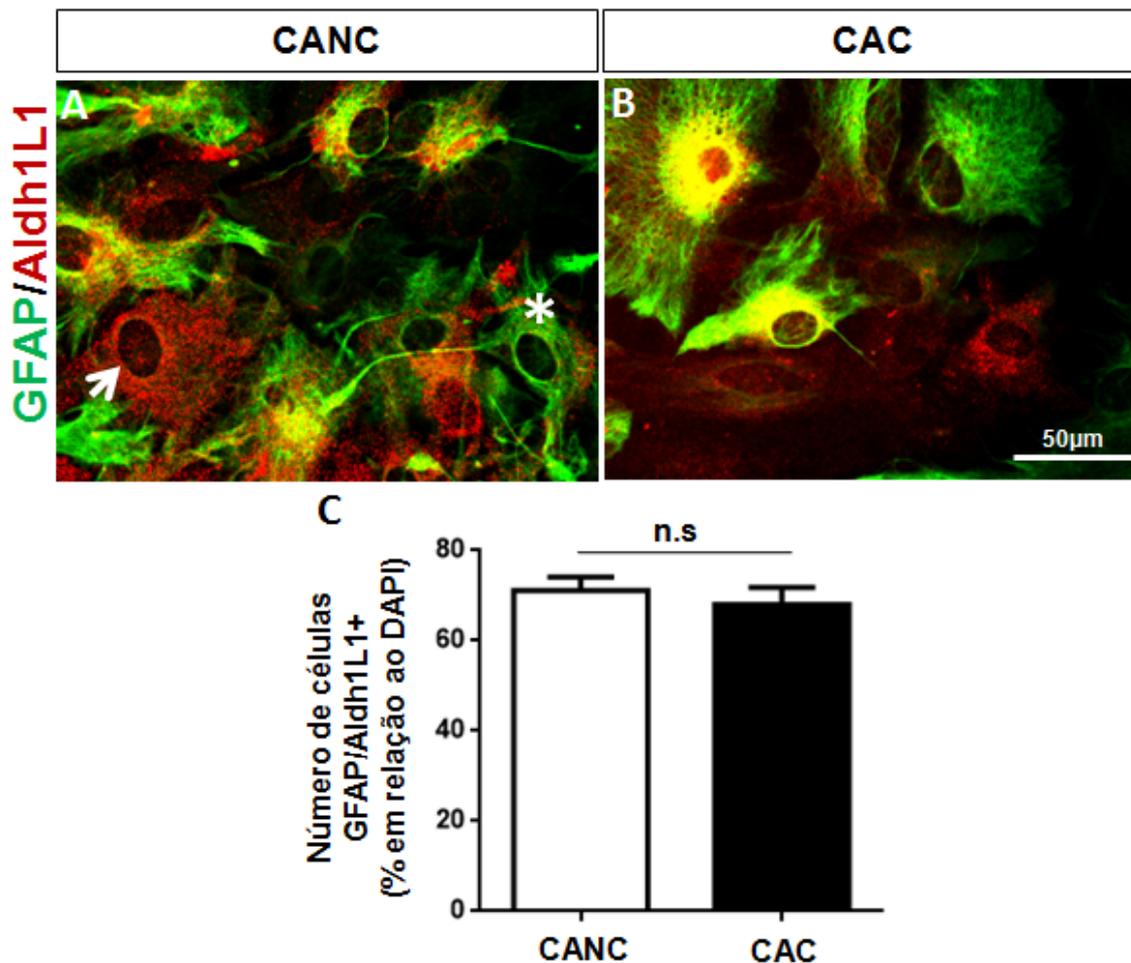


Figura 9: População de células duplamente marcadas para GFAP e Aldh1L1 não varia entre as populações analisadas. Nota-se a presença de células duplamente marcadas para GFAP e Aldh1L1, assim como células que apresentam apenas um dos marcadores. A seta indica célula marcada só para Aldh1L1 e o asterisco uma célula marcada somente para GFAP (A, B). A quantificação do número de células não revelou diferenças na proporção de células Aldh1L1/GFAP+ nas diferentes culturas (C). $p=0,5442$, $n=3$. Barra de calibração de 50µm.

Além da caracterização morfológica e molecular das CANC e CAC, uma importante questão a se considerar é a pureza destas culturas com relação a presença de outros tipos celulares nas condições estudadas. Para tanto, ensaios de imunocitoquímica para β -Tub III, proteína do citoesqueleto neuronal, e F4/80, proteína típica de células microgliais, foram realizados. Foi observado que a porcentagem de células marcadas positivamente para β -Tub III em

CANC foi de 1,39%, e em CAC foi de 0,73% (Figura 10, A-C). Para o marcador microglial F4/80, a porcentagem de células marcadas positivamente foi 3,85% e 4,48%, respectivamente em CANC e CAC (Figura 10, D-F). Em ambos os casos, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre as diferentes condições analisadas.

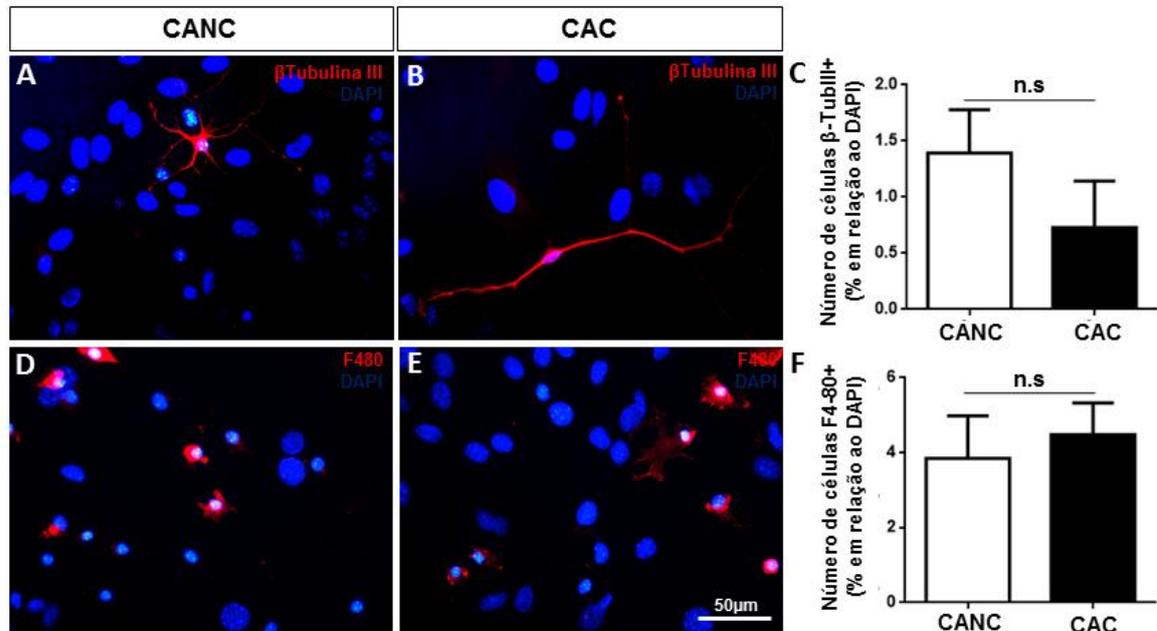


Figura 10: População de células neuronais e microgliais em CANC e CAC não varia. Após a confluência, CANC e CAC foram submetidas a ensaio de imunocitoquímica para β -Tub III e F4/80, para identificação de neurônios (A, B) e microglia (D, E), respectivamente. O número de células β -Tub III e F4/80 em CANC e CAC não é estatisticamente diferente (C, F). $p=0,65$, $n=3$. Barra de calibração de $50\mu\text{m}$.

Percebemos que quando comparamos o perfil populacional das CANC e CAC através do marcador GFAP não foram percebidas diferenças estatísticas significativas no percentual dos marcadores (Figura 11 A, D). Como já descrito no item 4.2, Figura 7.

Ao compararmos o perfil populacional das CANC e CAC tendo como referência o marcador Aldh1L1, também não foram identificadas diferenças estatísticas significativas no percentual dos marcadores (Figura 11 B, E). Como já descrito no item 4.2, Figura 8.

Mais uma vez não foram observadas diferenças estatísticas significativas no percentual dos marcadores em CAC e CAC, quando levamos em consideração as células duplamente marcadas para Aldh1L1 e GFAP (Figura 11 C, F). Como já descrito no item 4.2, Figura 9.

Em conjunto, esses dados demonstram que a composição celular das duas culturas é semelhante (Figura 11).

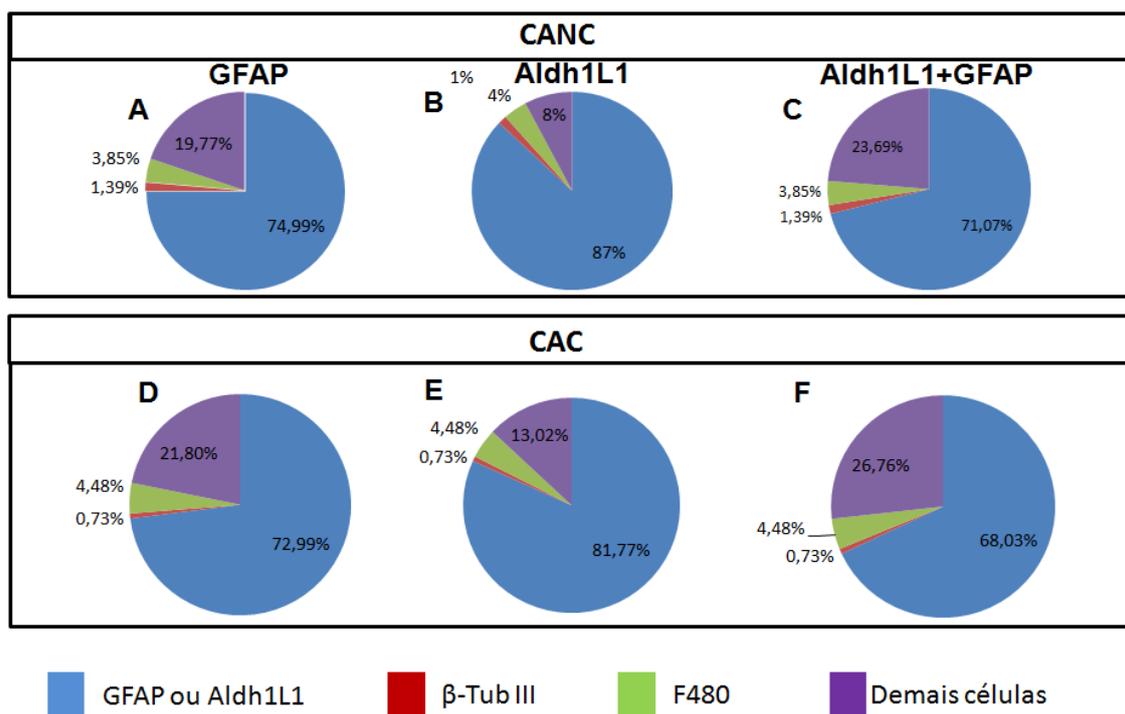


Figura 11: CAC e CAC possuem mesmo perfil populacional. Gráficos A e D mostram perfil populacional de CAC e CAC quando comparadas pelo marcador GFAP. Gráficos B e E mostram perfil populacional de CAC e CAC quando comparadas em relação ao marcador Aldh1L1. Gráficos C e F mostram perfil populacional de CAC e CAC quando foram comparadas células duplamente marcadas para GFAP e Aldh1L1. Todas as comparações apresentam populações de CAC e CAC com mesmo perfil.

4.3) Caracterização funcional de CANC e CAC

Para comparar o potencial funcional de CANC e CAC, tratamos culturas de neurônio de 12 DIV com diferentes tipos de meio por um período de 3 horas e avaliamos o número de núcleos viáveis (Figura 12B'). Como observado na Figura 12, em presença de Neurobasal, um meio mais rico em nutrientes, o percentual de núcleos viáveis foi de aproximadamente 57% maior em comparação ao tratamento com o MSS; (Figura 12C). Em presença de MCANC e MCAC, verificamos que os tratamentos aumentaram em aproximadamente 70% e 79%, respectivamente, o número de núcleos viáveis em relação ao MSS (Figura 12A, B e C).

Desta forma, nossos resultados sugerem que MCANC e MCAC são capazes de suportar a sobrevivência neuronal de forma mais efetiva que o MSS, e o fazem de forma similar, pois não foram percebidas diferenças estatísticas significativas entre os meios oriundos de CANC e CAC (Figura 12C).

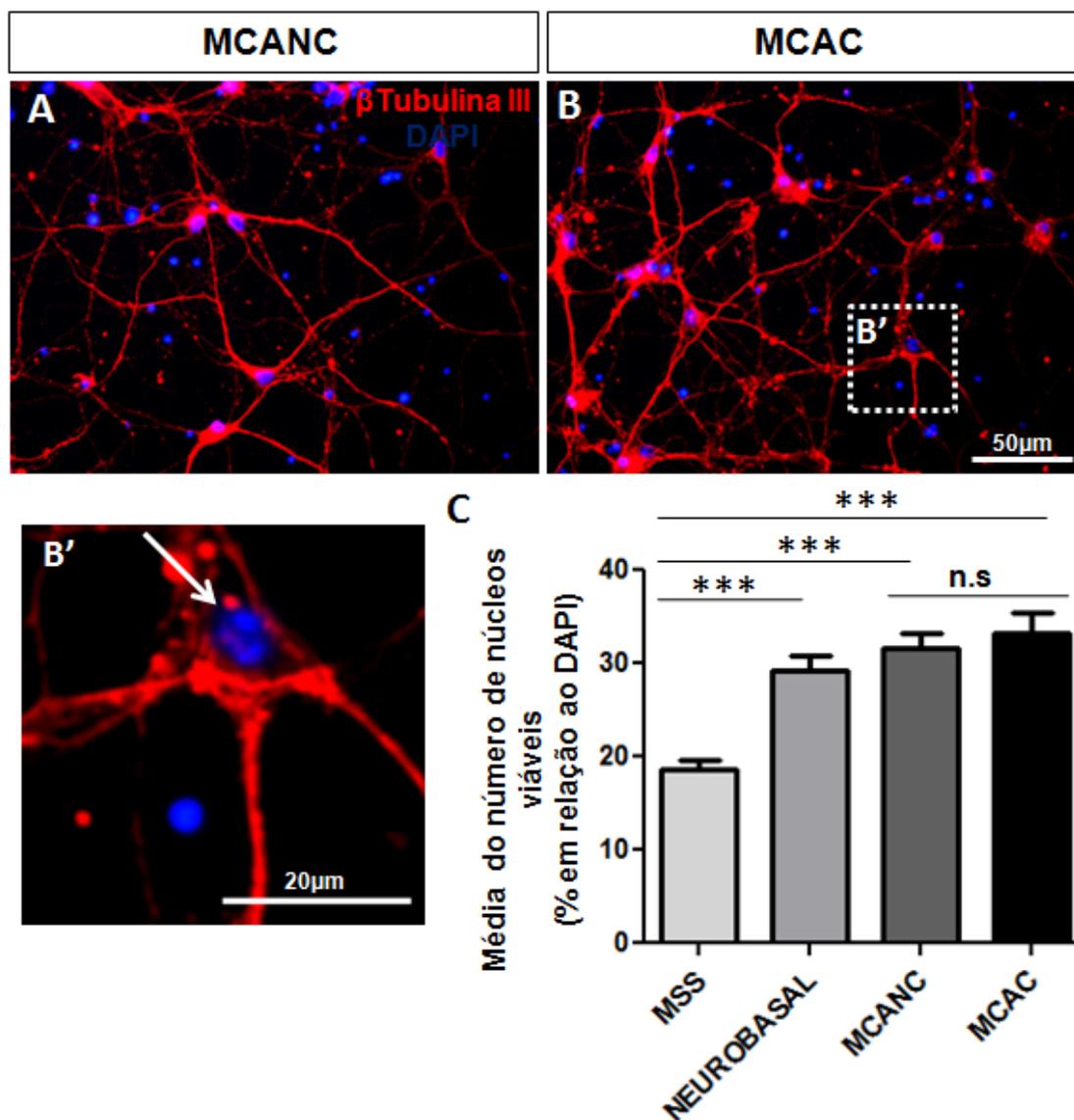


Figura 12: MCANC e MCAC são capazes de suportar a sobrevivência neuronal por 3 horas de forma similar. Após tratamento de culturas de neurônio com MCANC (A) e MCAC (B) pelo período de 3 horas, não foram percebidas diferenças na capacidade de suporte da sobrevivência neuronal entre MCANC e MCAC, evidenciadas pela quantificação de neurônios viáveis (C) duplamente marcados para β -Tub III e DAPI (B', seta). Observamos que MCANC, MCAC e Neurobasal foram mais eficientes em proteger os neurônios da morte, em comparação com o MSS. *** $p < 0,0001$. $n = 4$. Barra de calibração de 50 μ m e 20 μ m.

Nos questionamos se neurônios imaturos quando tratados com MCANC ou MCAC poderiam apresentar diferenças em sua sobrevivência, dado o potencial protetor do meio derivado de astrócitos. Para testarmos, culturas de neurônio mantidas por 24 horas em meio Neurobasal foram tratadas por 24 horas adicionais com MSS, Neurobasal, MCANC e o MCAC. Neste caso, verificamos que MCANC e MCAC possuem discreta diferença no que diz respeito à capacidade de suporte e sobrevivência neuronal (Figura 13). Observamos um percentual 7% maior de núcleos viáveis nas culturas de neurônios tratadas com MCANC em comparação ao tratamento com MSS (Figura 13 A, C) e uma redução de aproximadamente 15% no número de núcleos viáveis nas culturas de neurônios tratadas com MCAC em relação ao MSS (Figura 13 B, C). Quando comparamos o tratamento com Neurobasal em relação ao MSS, percebemos que o meio mais enriquecido possui aproximadamente 5% a mais de núcleos viáveis (Figura 13 C).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que quando comparados os quatro meios utilizados, percebemos que o MCAC possui discreta diferença, embora significativa, quando comparado ao MCANC; porém quando comparado aos demais meios, não foram percebidas diferenças significativas (Figura 13C).

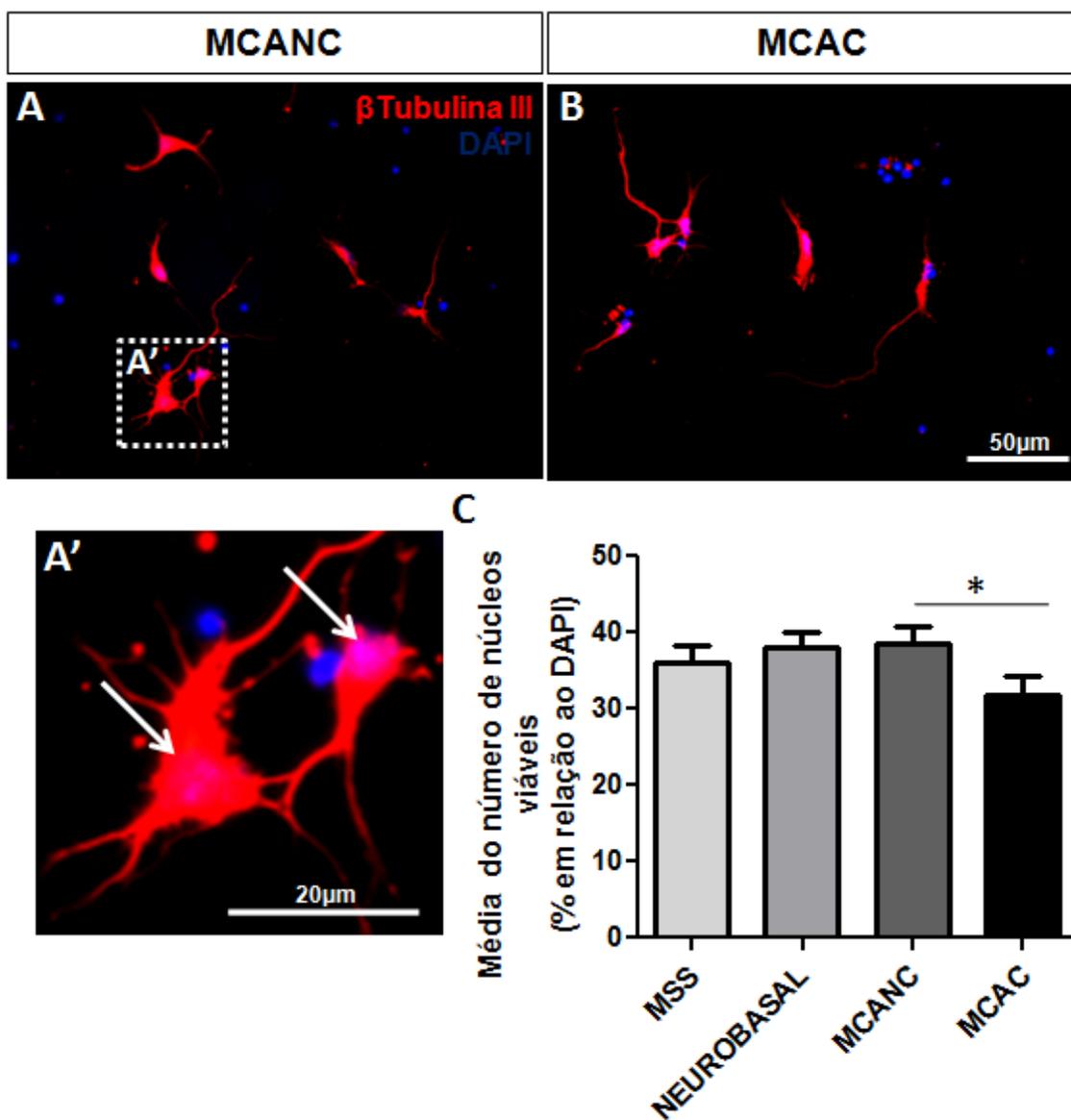


Figura 13: MCANC e MCAC possuem discreta diferença na capacidade de suportar a sobrevivência neuronal por 24 horas. Após tratamento de culturas de neurônio com MCANC (A) e MCAC (B) pelo período de 24 horas, o MCANC demonstrou-se mais efetivo em suportar a sobrevivência neuronal quando comparado com MCAC (C), evidenciadas pela quantificação de neurônios viáveis (C) duplamente marcados para β -Tub III e DAPI (A', seta). Com relação aos demais meios quando comparados entre si, não foram percebidas diferenças estatísticas. $p=0,0298$, $n=2$. Barra de calibração de 50 μ m e 20 μ m.

Outro aspecto funcional importante é a capacidade dos astrócitos de promoverem a arborização neuronal através da indução da extensão e crescimento de prolongamentos neuronais *in vitro*, evento conhecido como neuritogênese (SPOHR ET AL., 2012). Para avaliar o potencial de MCANC e MCAC de induzirem a neuritogênese, tratamos culturas de neurônios por 24 horas com diferentes meios e analisamos a neuritogênese/arborização nestas culturas.

Após os tratamentos, percebemos que a maior parte dos neurônios apresentaram 5 ou mais neuritos, A distribuição dos neuritos nas cinco condições analisadas aparecem na Tabela 4, e exemplos representativos na Figura 14.

Tabela 4: Número de neuritos

	Um neurito	Dois neuritos	Três neuritos	Quatro neuritos	Cinco ou mais neuritos
MCANC	1,93%	10,14%	19,80%	13,52%	54,48%
MCAC	3,40%	10,22%	22,72%	20,45%	43,18%
MSS	2,3%	13,89%	19,3%	18,91%	45,55%
Neurobasal	1,65%	9,09%	17,76%	20,24%	51,23%

Não observamos diferenças estatísticas entre o perfil de arborização dos neurônios após tratamento com meios oriundos de CANC ou CAC, e dos meios comerciais MSS e Neurobasal. Em conjunto, esses dados demonstram que o congelamento de astrócitos mantém seu potencial de induzir a maturação/arborização neuronal.

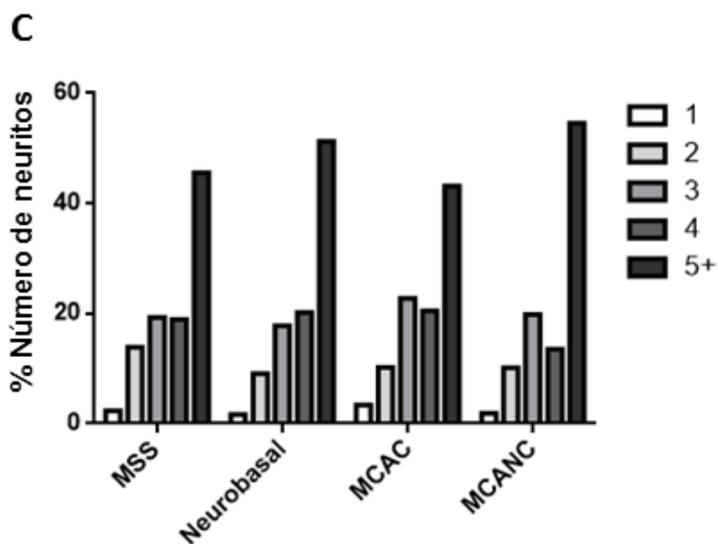
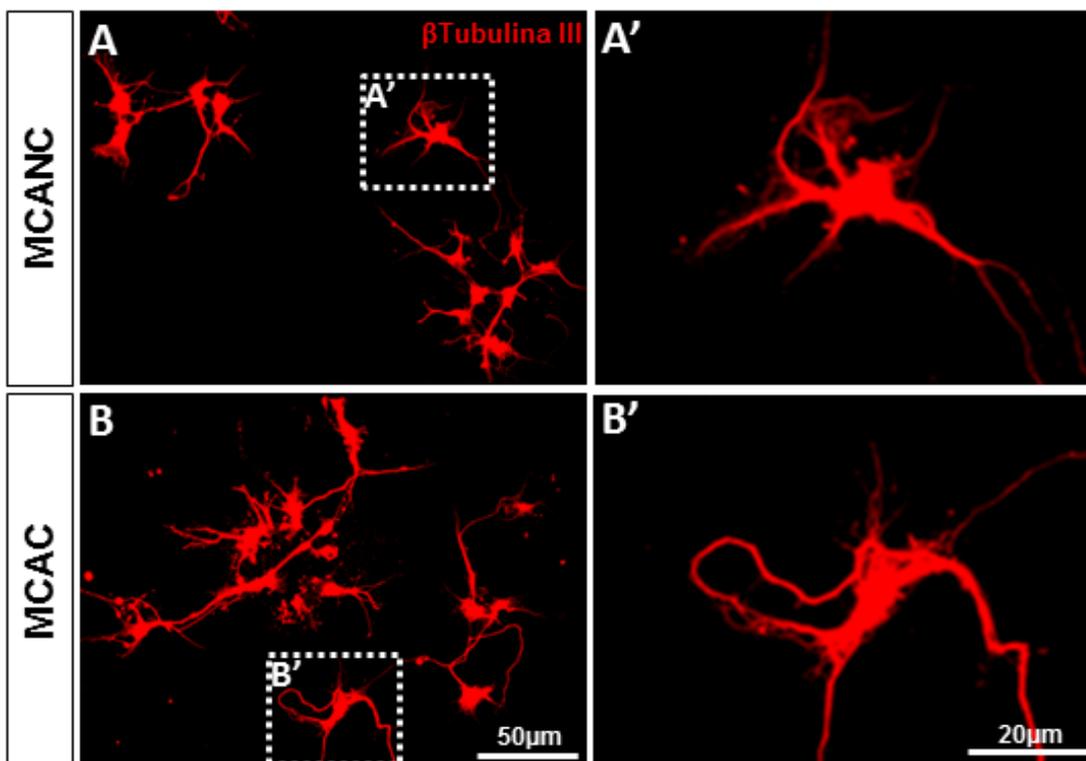


Figura 14: MCANC e MCAC são capazes de induzir a arborização neuronal de forma similar. Após tratamento das culturas de neurônio com MCANC (A, A') e MCAC (B, B') pelo período de 24 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas para β -Tub III para identificação e quantificação dos neuritos. Não foram percebidas diferenças estatísticas no número de neuritos dos neurônios tratados com os diferentes meios. Gráfico C, indica o número de neuritos dos neurônios analisados. $p=0,7622$, $n=2$. Barra de calibração de $50\mu\text{m}$ e $20\mu\text{m}$.

O aspecto funcional astrocitário que tem sido alvo de muitos estudos recentemente, é o potencial destas células de induzir a formação de sinapses através da produção de fatores secretados e de contato (CLARKE, 2013). Para comparar o potencial sinaptogênico de MCANC e MCAC, tratamos culturas de neurônios com 12 DIV com diferentes tipos de meio por um período de 3 horas, e analisamos a capacidade sinaptogênica destes meios, através de ensaio de imunocitoquímica para os marcadores pré-sináptico, Sinaptofisina, e pós-sináptico, PSD-95 (Figura 15).

Observamos que o tratamento com MCANC e MCAC teve o mesmo efeito na capacidade de induzir a formação de sinapses, uma vez que em comparação com o MSS, tanto MCANC quanto MCAC, tiveram aumento de 11 % e diminuição de aproximadamente 14%, respectivamente, de colocalização de punctas, indicando sinapses estruturalmente formadas.

Após a quantificação do número de puncta sinápticos para Sinaptofisina e PSD-95, e para os puncta colocalizados para ambos os marcadores, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de puncta pré e pós-sinápticos, nem na colocalização, em culturas tratadas com MCANC e MCAC (Figura 15).

As culturas de neurônio também foram tratadas com MSS e meio Neurobasal por um período de 3 horas. Verificamos que o MSS e o meio Neurobasal possuem papel semelhante no que tange sua capacidade sinaptogênica. Da mesma forma não foram identificadas diferenças estatísticas no número de puncta pré- e pós-sinápticos, nem na sua colocalização (Figura 15C, F, I).

Em conjunto, nossos dados demonstram que o congelamento de astrócitos mantém sua capacidade indutora de sinapses.

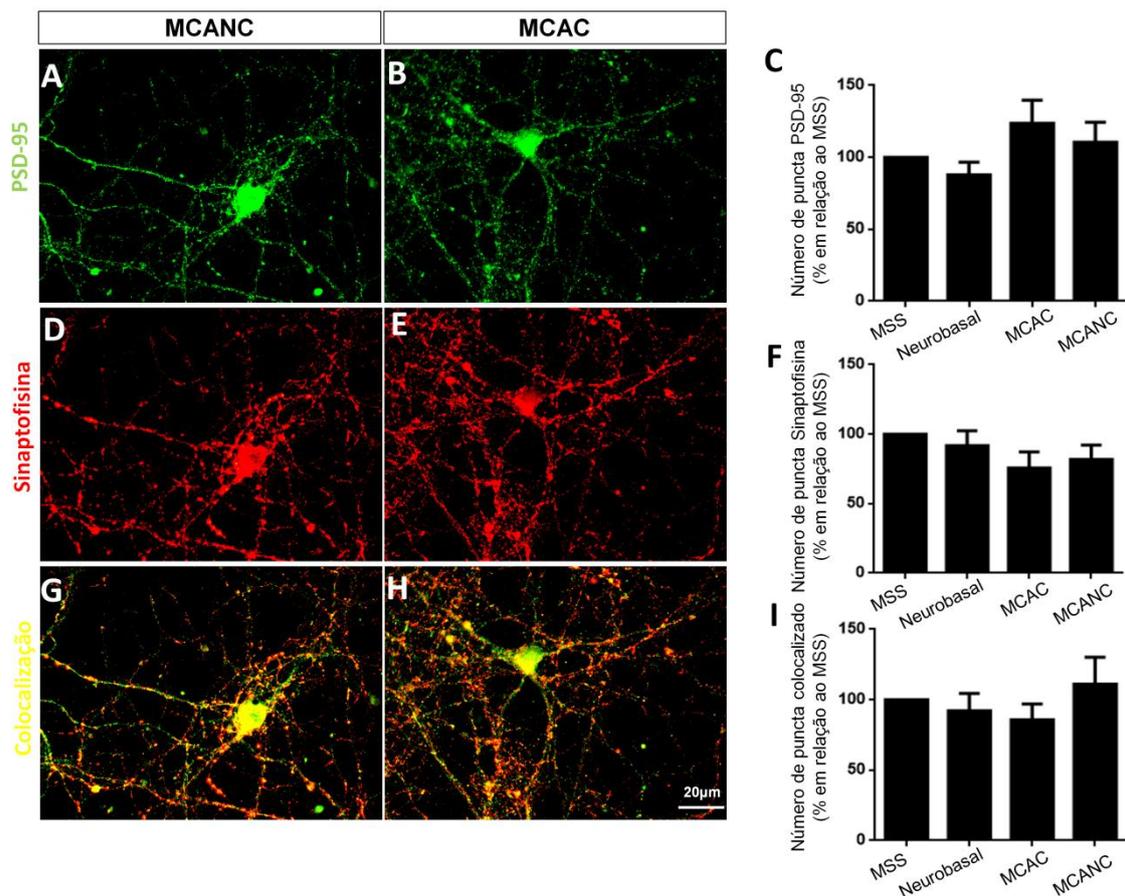


Figura 15: MCANC e MCAC possuem potencial sinaptogênico semelhante. Culturas de neurônios foram tratadas por 3 horas com diferentes meios de cultura e processadas para imunomarcagem para as proteínas sinápticas, PSD-95 (A, B) e Sinaptofisina (D, E), e posterior análise da colocalização (G, H) e quantificação (C, F, I). Não foram percebidas diferenças estatísticas significativas entre MCANC e MCAC no potencial de indução sináptica. $p=0,3008$ (C); $p=0,1797$ (F); $p=0,5553$ (I). $n=3$. Barra de calibração de $20\mu\text{m}$.

5. Discussão

5.1) Aspectos gerais

Nessa dissertação de mestrado, foi estabelecido e caracterizado um novo procedimento para armazenamento de astrócitos murinos derivados de córtex cerebral. Para isso, foram comparadas culturas de astrócitos provenientes do córtex cerebral de camundongos suíços, submetidas ao congelamento ou não, no que se refere às características morfológicas e funcionais, utilizando as seguintes abordagens metodológicas: microscopia em contraste de fase, imunomarcação para moléculas específicas de células neurais, tratamento de células neuronais com meio condicionado de astrócitos congelados e não congelados, para análise de suporte da sobrevivência neuronal, indução da arborização, e da capacidade de indução da formação de sinapses.

Foi demonstrado que astrócitos congelados possuem características morfológicas e funcionais semelhantes às de astrócitos não congelados, configurando-se uma alternativa importante à utilização de culturas primárias de astrócitos. Desta forma, a metodologia desenvolvida nesse trabalho poderá trazer benefícios nos aspectos do planejamento e agilidade dos projetos, além de grande economia financeira e conformidade bioética, contribuindo com a diminuição do uso de animais de experimentação.

Embora nossos dados demonstrem que CANC e CAC são culturas bastante enriquecidas em células astrocitárias, verificamos a presença de um baixo percentual de outros tipos celulares nestas culturas. Neste caso, observamos que o percentual de células marcadas positivamente para marcadores neuronais e microgliais ficou abaixo de 5% para ambos os tipos celulares, sugerindo que, de fato, nossas culturas são virtualmente puras de células astrocitárias, o que confirma a utilidade destas culturas como ferramentas importantes para o estudo da fisiologia astrocitária *in vitro*.

As células gliais, juntamente com os neurônios, constituem os principais tipos celulares do SNC. Dentre as células gliais, os astrócitos representam o maior e mais heterogêneo tipo celular (SCHITINE ET AL, 2015, BUOSI ET AL, 2016). Possuindo ampla capacidade proliferativa quando estão em cultura, as

células astrocitárias permitem o subcultivo e, por consequência, a possibilidade de congelamento. Observamos que CANC e CAC apresentaram morfologia protoplasmática, característica de astrócitos em cultura, além de apresentarem mesma taxa de crescimento e perfil morfológico.

5.2) Características astrocitárias

De acordo com a literatura, mesmo dentro de uma mesma espécie são percebidas claras diferenças nas células astrocitárias, por exemplo: na substância branca, os processos de astrócitos fibrosos são orientados ao longo do trato de fibras enquanto que na camada molecular do giro denteado, astrócitos protoplasmáticos são influenciados pela fronteira que separa as aferências associativas e periféricas (MATYASH ET AL, 2009).

Astrócitos possuem diferentes graus de complexidade quando se compara a região e a espécie de ocorrência. Exemplo disso é que astrócitos humanos são muito mais complexos e diversos que astrócitos de roedores (MATYASH ET AL, 2009), possuindo um maior diâmetro e chegando a ter dez vezes mais prolongamentos primários do que astrócitos de roedores (OBERHEIM ET AL, 2006).

Além dos aspectos morfológicos, nossos resultados mostram que CANC e CAC possuem mesmo perfil de distribuição de GFAP e Aldh1L1, porém destaca-se que o número de células marcadas para Aldh1L1 é maior que o número de células marcadas para GFAP, tanto em CANC quanto em CAC.

Os astrócitos são células que apresentam diferentes marcadores específicos, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP); a proteína S-100 beta, os transportadores do aminoácido excitatório (glutamato) 1 e 2 (EAAT1 e 2), e a proteína aldeído desidrogenase (Aldh1L1) (RUSNAKOVA ET AL., 2013).

Amplamente utilizado nesse estudo, GFAP foi descrita com uma proteína intracelular formadora dos filamentos intermediários de glia astrocitária de vertebrados (RAFF ET AL, 1979). Enquanto células precursoras astrocitárias apresentam vimentina como principal filamento intermediário, o processo de maturação dos astrócitos é marcado também por uma mudança no perfil de

expressão da proteína de filamento intermediário vimentina para GFAP, reconhecido como marcador de astrócitos maduros (GOMES ET AL, 1999).

Aldh1L1 foi descrita como uma enzima metabólica com RNAm presente por todo o SNC. A marcação com anticorpo policlonal específico para esta proteína revelou sua presença em astrócitos ramificados, incluindo o corpo celular e seus processos. Foi também mostrado que todas as células marcadas positivamente para GFAP apresentam marcação positiva para Aldh1L1 e que Aldh1L1 está presente em um número maior de astrócitos do que GFAP. Análises de RNAm mostraram que a expressão de Aldh1L1 se estende por todo o SNC enquanto que a de GFAP mostrou-se ser predominante na substância branca (CAHOY ET AL, 2008; GOMES ET AL, 2013).

Esses achados da literatura corroboram os nossos dados, uma vez que foi observado um maior percentual de astrócitos Aldh1L1 positivos do que GFAP positivos, sugerindo que Aldh1L1 seja um marcador astrocitário mais expresso de forma geral do que GFAP. Além de células marcadas para os diferentes marcadores, foram percebidas diferenças na intensidade de marcação para uma mesma molécula, sugerindo assim uma variação de astrócitos dentro da população analisada.

Atualmente existem diversos centros especializados no comércio e distribuição de diferentes tipos celulares, como por exemplo, o *Science Cell Research laboratories* (www.sciencellonline.com). Nesta empresa, são vendidos diferentes tipos de células astrocitárias com preço de aproximadamente USD\$350,00, o *vial* contendo 5×10^5 astrócitos de córtex de camundongo. Segundo o fabricante, essas células são caracterizadas por imunomarcação para GFAP, e teste negativo para micoplasma, fungos e bactérias, com garantia para 5 duplicações da população sendo respeitadas as condições do fabricante. Vale ressaltar que, com exceção de marcadores morfológicos e de contaminação por microorganismos, não observamos nas empresas de banco de células, preocupação com a aferição das características funcionais das células congeladas.

Quando comparamos nossas células congeladas com as outras linhagens comercialmente disponíveis, percebemos que tivemos um maior rigor com a autenticação das células, uma vez que nossas células são caracterizadas por

mais de um marcador típico de célula astrocitária, GFAP e Aldh1L1, enquanto geralmente essas linhagens são caracterizadas somente com GFAP. Outro fator importantíssimo é o fato de termos realizados diversos testes funcionais para confirmar que o processo de congelamento não fez com que nossas células perdessem suas características funcionais, o que não observamos nos fabricantes dessas linhagens. Com relação ao conteúdo, nossos *vials* foram congelados com, aproximadamente, 1×10^6 células em média. No que diz respeito a parte financeira, enquanto essas células são comercializadas a aproximadamente USD\$350,00, nossas células são adquiridas a um custo final de aproximadamente R\$60,00. Com relação ao subcultivo, testes adicionais se fazem necessários para avaliar a manutenção ou não das características morfofuncionais de astrócitos que passaram por mais ciclos de congelamento.

No que diz respeito a heterogeneidade astrocitária, é bem descrito na literatura que astrócitos possuem diversidade em vários aspectos, como diferenças morfológicas, diversidade na sinalização de íons de cálcio, na distribuição de proteínas de junções do tipo *gap*, além de variedade de receptores e transportadores de glutamato (RUSNAKOVA ET AL., 2013), também são descritas diferenças em seu potencial neurogênico e proliferativo, e respostas a lesões e doenças (BUOSI ET AL., 2017).

Nossa preocupação principal consistiu no fato de que o processo de congelamento/descongelamento poderia alterar a morfologia e a funcionalidade da célula astrocitária ou selecionar subpopulações. Embora alguns trabalhos tenham mostrado a viabilidade celular pós descongelamento para validar o sucesso da técnica, evidências recentes sugerem que talvez o congelamento possa estar associado a desvios de marcas epigenéticas, uma vez que esses parâmetros ainda não foram avaliados em detalhes (CHATTERJEE ET AL., 2016).

Apesar de existirem inúmeras linhagens de células gliais disponíveis comercialmente, como por exemplo, iCell Astrocytes (ASC-100-020-001-PT) astrócitos derivados de células iPS humanas, da empresa Cellular Dynamics International (iCell³), e C8-D30 (Astrocyte type III clone (ATCC - CRL-2534)

³ cellulardynamics.com/products-services/icell-products/icell-astrocytes

astrócitos murinos de cerebelo comercializados pela empresa ATCC (ATCC⁴), essas células imortalizadas podem não preservar a características de astrócitos.

Já é descrito na literatura que linhagens de células imortalizadas de neurônios possuem diferenças importantes em aspectos morfológicos quando comparadas as células das quais foram originadas (GORDON ET AL., 2013). E que o processo de imortalização celular de forma geral possui algumas limitações como, a não manutenção do fenótipo exato da célula de origem e mudanças epigenéticas durante o processo de diferenciação (IRFAN-MAQSOOD ET AL., 2013).

Desse modo, o congelamento de astrócitos permanece como alternativa bastante razoável, uma vez que nosso protocolo mostrou que as células congeladas respondem da mesma forma (tanto morfológica como funcionalmente, através da capacidade de conferir sobrevivência neuronal, da indução da formação de sinapses e promovendo crescimento neurítico), que as células não congeladas, e que o processo de imortalização celular pode fazer com que as linhagens tenham diferenças significativas das células de origem.

5.3) Interação neurônio- astrócito

A interação neurônio - astrócito possui papel fundamental em vários eventos do desenvolvimento cerebral, como: geração e migração neuronal, maturação e diferenciação glial, assim como em desordens cerebrais (STIPURSKY ET AL., 2012 a). Astrócitos são células com alta capacidade de secretar fatores tróficos, como fatores de crescimento, neurotransmissores e lipídeos, que interferem diretamente na sua interação com a célula neuronal (STIPURSKY ET AL., 2012 b). Utilizando, especialmente, meio condicionado derivado de culturas primárias e secundárias não congeladas de astrócitos murinos, nosso grupo demonstrou a importância de algumas moléculas nessa interação, como: o ácido lisofosfatídico, LPA, (SPOHR ET AL., 2014), hormônios tireodianos (DEZONNE ET AL., 2013), esfingosina 1 fosfato, S1P,

⁴ www.atcc.org/Products/All/CRL-2534.aspx

(SPOHR ET AL., 2012), além do fator de crescimento transformante beta-1, TGF- β 1, (DINIZ ET AL., 2012, 2014; STIPURSKY ET AL., 2007, 2014).

Nossos resultados mostram que MCANC e MCAC possuem a mesma capacidade de suporte da sobrevivência neuronal uma vez que não foram percebidas diferenças no número de núcleos picnóticos em culturas neuronais mantidas em presença destes meios por 3 horas. Neste contexto, é possível que CANC e CAC secretem um repertório de moléculas semelhantes ou em níveis similares. Seria interessante analisar o secretoma de CANC e CAC para avaliar de fato se o congelamento/descongelamento altera o padrão de moléculas secretadas pelos astrócitos das diferentes condições.

Porém vale ressaltar que quando as culturas de neurônio foram tratadas com MCANC e MCAC por 24 horas, foi percebida leve diferença estatística no número de núcleos picnóticos. O ensaio de suporte de sobrevivência neuronal foi realizado em tempos distintos, pois o período de tratamento de 3 horas poderia ser curto demais para observarmos diferenças significativas.

Para confirmarmos o potencial neuroprotetor de MCANC e MCAC, ensaios de imunocitoquímica para marcadores de morte celular, como Caspase 3 clivada, poderão ser realizados, uma vez que medimos morte indiretamente através do percentual de núcleos picnóticos.

Durante o desenvolvimento, os neurônios são gerados a partir de células progenitoras neurais. Em cultura, o processo de diferenciação/maturação neuronal é marcado pela emissão de prolongamentos celulares que podem se assemelhar aos axônios e dendritos. Nossos resultados mostram que o tratamento com MCANC e MCAC não altera o perfil de crescimento de prolongamentos dos neurônios quando comparados ao tratamento com MSS e meio Neurobasal, sugerindo que a arborização neuronal é induzida de forma similar pelos astrócitos de CANC e CAC. Desta forma, podemos aferir que o processo de congelamento e descongelamento não altera o potencial astrocitário de induzir arborização neuronal.

Um dos eventos terminais do processo de maturação neuronal é a formação e estabilização das sinapses. Diversos trabalhos têm apontado para os astrócitos como os principais indutores da formação das sinapses durante o

desenvolvimento do SNC, através da secreção de diversos fatores como BDNF, TGF- β 1, moléculas de contato e matriz extracelular como Glipican, Hevina, Sparc, trombospondinas, entre outras (CLARKE ET AL., 2013; CHRISTOPHERSON ET AL., 2005; KUCUKDERELIA ET AL., 2011; DINIZ ET AL., 2012; GOMES ET AL., 2013).

Nossos dados evidenciam que o processo de congelamento/descongelamento das culturas astrocíticas não altera seu potencial indutor de sinapses, uma vez que culturas de neurônios tratadas com MCANC e MCAC apresentam marcação semelhante para proteínas pré e pós sinápticas. Vale ressaltar, no entanto, que ao compararmos o percentual de formação de sinapses de neurônios tratados com MSS e com os diferentes meios condicionados de astrócito, também não foram observadas diferenças estatísticas, contrariamente ao que mostra a literatura e discutido acima, que astrócitos são capazes de modular positivamente o processo sinaptogênico. Devido a dificuldades metodológicas encontradas nos experimentos para medir potencial da indução de formação de sinapses, outros ensaios serão necessários.

Também serão necessários a realização de mais ensaios funcionais para aumentar ainda mais a autenticidade de nossas células congeladas, será interessante medir ondas de cálcio dos astrócitos congelados através do ensaio de eletrofisiologia e compará-las a eletrofisiologia dos astrócitos não congelados. Outro ensaio importante é a análise da co-cultura de células neuronais plaqueadas em monocamada astrocítica que foram submetidas ao processo de congelamento em comparação com o mesmo ensaio só que com células neuronais plaqueadas em astrócitos que não foram congelados.

Como já descrito na literatura, diversas moléculas de matriz extracelular sintetizadas por astrócitos possuem papel sinaptogênico, como, Trombospondina, Hevina e Glipican (GOMES ET AL., 2013). Também será então interessante avaliar se o perfil destas moléculas em CAC é mantido quando comparadas a CANC.

Diante do exposto acima, nossos resultados demonstram que o método de congelamento de células é viável no que diz respeito à comparação morfológica e funcional com CANC.

5.4) Diferentes protocolos e otimização do uso de animais

Uma questão interessante de se discutir no que diz respeito ao processo de congelamento, são as inúmeras possibilidades de protocolos de congelamento de células, que abordam questões como diferentes crioprotetores, propriedades físicas que ocorrem durante os processos de congelamento e descongelamento, diferentes temperaturas e diferentes tempos de congelamento.

Os crioprotetores possuem papel importantíssimo no processo de congelamento celular, possuindo efeitos metabólicos e biofísicos que são necessários para sua ação, porém podem causar complicações (ELLIOTT ET AL, 2017). Esses agentes têm como característica proteger a membrana da célula dos cristais de gelo. Os crioprotetores mais utilizados são glicerol e DMSO, ambos são tóxicos para células e, portanto, precisam ser retirados no momento do descongelamento (MOLINARO ET AL, 2010). Uma perspectiva que se abre diante dessa discussão dos diferentes tipos de crioprotetores e variados protocolos de congelamento seria comparar a metodologia utilizada nessa dissertação com outras já descritas na literatura, e a realização de testes para controle de contaminação por microplasma e outros agentes infecciosos.

No que diz respeito ao protocolo utilizado, majoritariamente foram usadas células congeladas há aproximadamente 30 dias, porém seria interessante saber se os aspectos funcionais e morfológicos são preservados em células congeladas a médio e longo prazo. Diante disso, mais experimentos serão necessários para validar o protocolo estabelecido para células congeladas por tempo superior ao utilizado nesse trabalho.

Embora tenhamos verificado a presença de baixos percentuais de neurônios e microglia, tanto em CANC quanto em CAC, foi notada a presença de células morfológicamente distintas de astrócitos, mas que não apresentavam marcação nem para neurônios nem para microglia. Desta forma,

faz-se necessário o uso de outros marcadores para outros tipos celulares, como por exemplo, o fator de transcrição, olig 2, marcador de oligodendrócitos, com o objetivo de identificar essa pequena parcela que não foi caracterizada.

Os resultados obtidos nessa dissertação abrem excelentes perspectivas no que tange a agilidade da prática científica, uma vez que o pesquisador terá acesso à célula de interesse com maior facilidade, sem depender de restrições ao acesso a modelos animais.

Outro objetivo que foi atingido com sucesso neste trabalho de dissertação diz respeito ao uso otimizado de animais para a pesquisa em harmonia com o conceito dos 3 Rs (KO ET AL., 2010), principalmente no que diz respeito a redução e substituição dos modelos animais. Esse trabalho prevê uma grande otimização do uso de animais no desenvolvimento de projetos o que impacta diretamente em economia financeira, uma vez que manter um biotério capaz de fornecer animais com qualidade genética e sanitária ao experimentador é extremamente oneroso. Em momentos como esse que se vive no cenário da pesquisa nacional com cortes sequenciais de verbas para ciência e tecnologia e redução de orçamento, alternativas econômicas são extremamente pertinentes.

O presente trabalho foi capaz de estabelecer um protocolo viável de congelamento de células astocitárias com características morfológicas e funcionais preservadas. Como desdobramento dessa dissertação, temos a real possibilidade de montarmos um banco de células astrocitárias, incluindo astrócitos oriundos de diferentes regiões, uma vez que um dos fatores que confere variabilidade a células astrocitárias é o local onde residem. Fato esse que fará com que a otimização da utilização de animais experimentais seja ainda maior, uma vez que as demais estruturas cerebrais que não utilizamos para a confecção das culturas foram descartadas. Extrapolando ainda mais, podemos estabelecer protocolos de congelamento de outros tipos de células neurais e não neurais, como por exemplo, células endoteliais, alvo de estudo da linha de pesquisa desenvolvida pela Prof. Joice Stipursky uma das orientadoras dessa dissertação.

6. Conclusões

- CANC e CAC possuem morfologia, taxa de crescimento e perfil populacional semelhante;
- CANC e CAC possuem características funcionais semelhantes no que se refere a capacidade de suporte da sobrevivência, indução da maturação neuronal e potencial sinaptogênico;
- O processo de congelamento, a -196°C , de células astrocitárias murinas oferece ao experimentador acesso fácil e rápido à célula de interesse, gerando mais autonomia nos estudos deste tema;
- O processo de congelamento de astrócitos otimiza o uso de animais em pesquisa, em consonância com as boas práticas de utilização de animais em experimentação;
- O processo de congelamento de astrócitos murinos abre a perspectiva para a formação de um estoque destas células que podem ser isoladas de diferentes regiões do encéfalo, assim como a possibilidade a formação de um banco de células deste e de outros tipos celulares neurais.

7. Referências bibliográficas

AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p.1-20, 2011.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. Disponível em <http://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>. Último acesso em 16/06/2017.

ARAQUE, A.; PEREA, G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. **Glia**, v. 47, n. 3, p. 241-8, 2004.

ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; ET AL. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Caderno Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.

BACELLAR, F.; DE SOUSA, R. A importância do isolamento por cultivo celular e identificação de rickettsias através de técnicas de biologia molecular para o conhecimento das rickettsioses. **Revista Ouro Preto**, v. 13, n. suplemento 1, p. 190 - 192, 2004.

BARBOSA, B. S.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M L.; ET AL. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n. 2, p. 334-347, 2015

BUOSI, A.; MATIAS, I.; ARAÚJO, A. P.; ET AL. Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions. **Molecular Neurobiology**, 2017.

CAHOY, J. D.; EMERY, B.; KAUSHAL, A.; ET AL. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 264-78, 2008.

CARDONA, A. E.; PIORO, E. P.; SASSE, M. E.; ET AL. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 917-24, 2006.

CHANDRASEKARAN, A.; AVCI, H. X.; LEIST, M.; ET AL. Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. 215, p. 1-27, 2016.

CHATTERJEE, A.; SAHA, D.; NIEMANN, H.; ET AL. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. **Cryobiology**. v. 74, p. 1-7; 2016.

CHRISTOPHERSON, K. S.; ULLIAN, E. M.; STOKES, C. C.; ET AL. Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. **Cell**. v. 120, n. 3, p. 421-433, 2011.

CLARKE, L. E.; BARRES, B. A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. **Nature Neuroscience Reviews**. v. 14, n. 5, p. 311-321. 2013.

DANIELSKI, J. C. R.; BARROS, D. M.; CARVALHO, F. A. H. O uso de animais pelo ensino e pela pesquisa: prós e contras. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 5, n. 1, p. 72-84. 2011.

DEZONNE, R. S.; STIPURSKY, J.; GOMES, F. C. A. Effect of thyroid hormone depletion on cultured murine cerebral cortex astrocytes. **Neuroscience Letters**, v 467, p. 58-62. 2009.

DEZONNE, R. S.; STIPURSKY, J.; ARAÚJO, A. P. B.; ET AL. Thyroid hormone treated astrocytes induce maturation of cerebral cortical neurons through modulation of proteoglycan levels. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. 124, p. 1- 12, 2013.

DEZONNE, R. S.; SARTORE, R. C.; NASCIMENTO, J. M.; ET AL. Derivation of Functional Human Astrocytes from Cerebral Organoids. **Scientific Reports**, p. 1-14, 2017.

DINIZ, L. P.; ALMEIDA, J. C.; TORTELLI, V.; ET AL. Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 41432-41445, 2012.

DINIZ, L. P.; TORTELLI, V.; GARCIA, M. N.; ET AL. Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling. **GLIA** (New York, N.Y. Print), v. 62, n. 12, p. 1917-1931, 2014.

DINIZ, L. P.; TORTELLI, V.; MATIAS, I., ET AL. Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against A β oligomers in Alzheimer's disease model. ***The Journal of Neuroscience***, 2017.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. ***Cryobiology***. v. 76, p. 74-91. 2017.

EROGLU, C.; BARRES, B. A. Regulation of synaptic connectivity by glia. ***Nature***, v. 468, n. 7321, p. 223-231, 2010.

GERAGHTY, R. J.; CAPES DAVIS, A.; DAVIS, J. M.; ET AL. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. ***British Journal of Cancer***, V 111, n. 6, p.1021-1046. 2014.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial Fibrillary Acidic Protein: Modulation By Growth Factors And Its Implication In Astrocytes Differentiation. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research*** (Impresso), v. 32, n. 5, p. 619-631, 1999.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V.; DINIZ, L. P. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. ***Estudos Avançados***, v. 27, n. 77, 2013.

GORDON, J.; AMINI, S.; WHITE, M. H. General overview of neuronal cell culture. ***Methods in Molecular Biology***, v. 1078, p. 1-8. 2013.

HOWARTH, C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. ***Frontiers in Neuroscience***, v. 8, n. 103, p. 1-9, 2014.

IRFAN-MAQSOOD, MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R.; ET AL. Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. ***Cell Biology International***. v. 37, n. 10, p. 1038-1045. 2013.

JANG, T.H.; PARK, S. C.; YANG, J. H.; ET AL. Cryopreservation and its clinical applications. ***Integrative Medicine Research***, v. 6, p. 12-18, 2017.

KANDEL, E., SCHWARTZ, J., JESSELL, T., SIEGELBAUM, S., HUDSPETH, A. J. ***Princípios de Neurociências***. 5 ed. AMGH Editora, 2014. 1496 p.

KUCUKDERELI, H.; ALLEN, N. J.; LEE, A. T.; ET AL. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. **PNAS**, v. 108., n. 32, p.E440-49, 2011.

KO, G. M., MATTARAIA, V. G. H., LAPCHIK, V. B. V. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, Atheneu 2010. 708p.

LANGE, S. C.; BAK, L. K.; WAAGEPETERSEN, H. S.; ET AL. Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2569-2588, 2012.

LANGLEY, R. R.; FAN, D.; GUO, L. ET AL. Generation of an Immortalized Astrocyte Cell Line from H-2KbtsA58 Mice to Study the Role of Astrocytes in Brain Metastasis, **International Journal of Oncology**, v. 35, n. 4, p. 665-672, 2009.

MAGALHÃES, M.; FILHO, H.O. ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS COMO RECURSO DIDÁTICO. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.9, n.2, p. 147-154, 2006

MATIAS,I., DINIZ, L. P.; BUOSI, A.; ET AL. Flavonoid Hesperidin Induces Synapse Formation and Improves Memory Performance through the Astrocytic TGF- β 1. **Frontiers in Aging Neuroscinece**, v. 9, p. 1-14, 2017.

MARAFIGA, A.; PIRES, A. V.; MOUAWAD, L. S.; ET AL. Células-Tronco, Terapias Celulares e Bancos de Células. O que é preciso saber, **ANVISA**. 2016.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. **Brain Research Review**, v. 63, p. 2-10, 2009.

MCKENNA, M. C. Glutamate pays its own way in astrocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. 191, p. 1-6, 2013.

MOLINARO, E.M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2**. Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. 290 p.

MORAES, C.; SANTOS, G.; DE SAMPAIO e SPOH, T. C. L.; ET AL. Activated microglia induce deficits in excitatory synapses through IL-1 β : Implications for cognitive impairment in sepsis. *Molecular Neurobiology*, v. 52, p. 653-663, 2014.

OBERHEIM, N. A.; WANG, X.; GOLDMAN, S.; ET AL. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neuroscience*, v. 29, n. 10, p. 547-553, 2006.

OBERHEIM, N. A.; TAKANO, T.; HAN, X.; ET AL. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 10, p. 3276-3287, 2009.

OBERHEIM, N. A.; GOLDMAN, S.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of astrocyte form and function. *Methods in Molecular Biology*, v. 814, p. 23-45, 2012.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: Costs and benefits. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 4, p. 1077-1098, 2014.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neuroscience*, v. 32, n. 8, p. 421-431, 2009.

PINHEIRO, L. M.; ACRA, L. A. O conhecimento de recursos alternativos em pesquisa com animais de laboratório. *Estudos de Biologia*, v. 29, n. 67, p. 157-163, 2007.

PYKA, M.; BUSSE, C.; SEIDENBECHER, C.; ET AL. Astrocytes are crucial for survival and maturation of embryonic hippocampal neurons in a neuron-glia cell-insert coculture assay. *Synapse*, v. 65, n. 1, p. 41-53, 2011.

RAFF, M. C.; FIELDS, K. L.; HAKOMORI, S. L.; ET AL. Cell Type specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Research*, v. 174, n. 2, p. 283-308, 1979.

RUSNAKOVA, V.; HONSA, P.; DZAMBA, D.; ET AL. Heterogeneity of Astrocytes: From Development to Injury – Single Cell Gene Expression. *Plos One*, v. 8, n. 8, p. e69734, 2013.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p 775-787, 2011.

SCHITINE, C.; NOGAROLI, L.; COSTA, M. R.; ET AL. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, V. 9, n. 76, p. 1-11, 2015.

SHERMAN, D. L.; BROPHY, P. J. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. **Nature Reviews Neuroscience**, v6, n. 9, p. 683-690, 2005.

SIQUEIRA, M.; FRANCIS, D.; GISBERT, D.; ET AL. Radial Glia Cells Control Angiogenesis in the Developing Cerebral Cortex Through TGF- β 1 Signaling. **Molecular Neurobiology**, p. 1-16, 2017

SPORH, T. C. L.; DEZONNE, R. S.; NONES, J.; ET AL. Sphingosine 1-phosphate-primed astrocytes enhance differentiation of neuronal progenitor cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, p. 1892-1902, 2012.

SPORH, T. C. L.; DEZONNE, R. S.; REHEN, S. K.; ET AL. LPA-primed astrocytes induce axonal outgrowth of cortical progenitors by activating PKA signaling pathways and modulating extracellular matrix proteins. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 296, P. 1-9, 2014.

STIPURSKY, J.; GOMES, F. C. A. TGF- β 1/SMAD Signaling Induces Astrocyte fate commitment in vitro: implications for radial glia development. **GLIA** (New York), v. 55, n. 10, p. 1023-1033, 2007.

STIPURSKY, J.; FRANCIS, D.; GOMES, F. C. A.; Activation of MAPK/PI3K/SMAD Pathways by TGF- β 1- Controls Differentiation of Radial Glia into Astrocytes in vitro. **Developmental Neuroscience**, v. 34, p. 68-81, 2012. a

STIPURSKY, J.; DE SAMPAIO e SPORH, T. C. L.; SOUSA, V. O.; ET AL. Neuron–Astroglial Interactions in Cell-Fate Commitment and Maturation in the Central Nervous System. **Neurochemistry Research**, v.37, n. 11, p. 2402-2418,. 2012. b

STIPURSKY, J.; FRANCIS, D.; DEZONNE, R. S.; ET AL. TGF- β 1 promotes cerebral cortex radial glia-astrocyte differentiation in vivo. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 1-13, 2014.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. ***Drug Delivery System Workshop***. Bangkok, Thailand. p.1-30.1999.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W.; KUHN, C.; ET AL. Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. ***PNAS***, v. 83, p. 3500-3504, 1986.

ZHAO, G; FU, J. Microfluidics for cryopreservation. ***Biotechnology Advances***, v. 35, n. 2, p. 323-336. 2017.

8. Apêndice

8.1) Protocolo dos tampões e soluções

Tampão Gey` s

NaCl 0,8%;

CaCl₂ 0,017%;

KCl 0,037%;

MgCL₂ 0,02%;

KH₂PO₄ 0,003%;

Na₂HPO₄ 0,012%;

MgSO₄ 0,0034%;

NaHCO₃ 0,0227%;

Glicose 0,075%;

Água Milli-q, Q.S.P.

Meio de Eagle modificado por Dulbecco/F12

1 pacote de DMEM-F-12 (Invitrogen, catálogo 12400-024);

1,2 g de bicarbonato de sódio;

1 L de Água Milli-q;

Ajustar o pH entre 7,2 - 7,4 com NaOH 1M

Poli-L-lisina

50 µg/mL de poli-L-lisina (Sigma, catálogo P2636);

Água Milli-q, Q.S.P.

Glutamina

2mM de Glutamina (Gibco - Invitrogen, catálogo 21051-024);

Água Milli-q, Q.S.P.

PBS 1X

NaCl 0,8%;

Na₂HPO₄ 0,536%;

KH₂PO₄ 0,04%;

KCl 0,0095%;

Água Milli-q, Q.S.P.

Tripsina

Tripsina 0,25%(Sigma, catálogo T4799);

EDTA 0.02% (Vetec);

PBS 1X, Q.S.P.

ARA-C

1mM de ARA-C (Sigma, catálogo C1768);

PBS 1X, Q.S.P.

Solução de Bloqueio

BSA 3% (Invitrogen, catálogo A7906);

Soro normal de cabra (NGS 5%, Sigma, catálogo 16210-064);

Azida monossódica 0,02%;

Triton X-100 0,2% (Vetec);

PBS1X, Q.S.P.

Paraformaldeído 4%

PBS1X, Q.S.P.;

Paraformaldeído 4%;

Ajustar pH para 7,5

9. Anexo

9.1) COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2016

Prezada Professora Flávia Carvalho Alcantara Gomes

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Pesquisa Clínica e Experimental em Células Gliais: em Busca de novos alvos terapêuticos para patologias Neurais.”**, protocolo nº 004/16, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **24/05/2016**.

Vigência do Projeto	Até 31/05/2019
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus/ Swiss</i>
Nº de animais	1203 animais
Peso/idade	1-35g / 0-6 meses
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – FIOCRUZ – RJ Biotério do ICB – CCS – Bloco K - UFRJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS