Guilherme Alves Lepski

**Diferenciação neuronal *in vitro* de células-tronco mesenquimais
humanas para uso em transplante neural**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Manoel Jacobsen
Teixeira
Co-orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue
Nagahashi Marie

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lepski, Guilherme Alves

Diferenciação neuronal *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas para uso em transplante neural / Guilherme Alves Lepski. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Neurologia.

Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Manoel Jacobsen Teixeira.

Co-orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie

Descritores: 1.Células-tronco adultas 2.Transplante de células-tronco mesenquimais 3.Doenças neurodegenerativas 4.Microscopia de fluorescência 5.Técnicas de patch-clamp

USP/FM/SBD-261/07

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª.ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

À minha inseparável companheira Cinthia Elim, por ter tomado meus sonhos como seus próprios, lutando sempre ao meu lado pelos mesmos objetivos, tornando nossas vitórias mais alegres e nossos insucessos mais amenos.

Ao nosso filho Julian, que no seu silêncio pueril nos mostra as coisas verdadeiramente importantes da vida.

Aos meus pais Roberto e Sônia, pelo amor, carinho e esforço com que dirigiram minha formação dentro e fora de casa, tornando possível o alcance de todos os meus sonhos.

Aos meus avós Zilda e Alberto (postumamente), por terem norteado minha formação ética e moral, que carregarei por toda minha vida.

À minha sogra Carmen Edith, uma verdadeira exceção em sua classe, sempre incentivadora dos nossos sonhos.

*“Aufklärung ist der Ausgang des Menschen aus seiner selbst-verschuldeten
Unmündigkeit“
Immanuel Kant (1724-1804)*

*Esclarecimento é a saída do Homem da sua auto-infligida imaturidade.
(tradução livre)*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. med Guido Nikkhah, por ter me aceitado tão calorosamente em seu grupo de pesquisa e por ter sido responsável pela minha formação científica, acompanhando e orientando todos os passos do presente trabalho, sempre me motivando e me dando total respaldo e apoio.

Ao Prof. Dr. Josef Bischofberger, por ter me ensinado e treinado em eletrofisiologia, no mais alto rigor que a Ciência tanto carece, estimulando o raciocínio crítico e a superação dos meus próprios limites.

Ao Prof. Dr. Manoel Jacobsen Teixeira, um homem com o pensamento à frente de seu tempo, por ter sido o grande motivador do meu desenvolvimento científico e intelectual, pessoa em que sempre me espelhei desde o início da minha vida acadêmica, e a quem devo o incentivo e apoio a todas as minhas idéias.

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, por ter aceito o desafio do presente trabalho desde a mais embrionária idéia, pela confiança e apoio que nos levou a desbravar uma nova fronteira e estabelecer uma nova linha de pesquisa.

À amiga e confidente Johanna Wessoleck, pelo excelente auxílio técnico-científico, pelo importante treinamento em cultura celular, imunocitoquímica e diversas outras técnicas laboratoriais, além da grande amizade que nasceu da convivência no Laboratório.

Aos amigos e colegas de trabalho Anita Papazoglou, Brunhilde Baumer, Alexander Klein, Christina Hackl, Beatriz Schmidt e Claudia Ganser, pela amável receptividade e adorável convivência no ambiente de trabalho, e por terem me ensinado numerosas técnicas de neurorestauração, modelos animais de doenças degenerativas e testes comportamentais.

Aos amigos Jarek e Donata Maciaczyck, pelos agradáveis momentos conjuntos, pelas valiosas discussões técnicas, além de terem me ensinado técnicas de imunofluorescência e cultura celular que muito contribuíram para o sucesso do presente trabalho.

A Brian Strauss, pela doação dos lentivírus eGFP usados numa vertente desse projeto.

A Stefan Kaiser, por ter me ensinado técnicas de isolamento de células mesenquimais, e a Alexander Mehlhorn, por ter me auxiliado na seleção de doadores.

A Luis Sartori Viana, pela valiosa ajuda técnica na crítica fase de nascimento do meu filho e após o afastamento de minha esposa.

A Roseli da Silva, por ter me ensinado os primeiros conceitos de cultura celular.

Ao Prof. Dr. Dalton Chamone e ao Dr. Alfredo Mendrone, por terem me auxiliado no estabelecimento da linha de pesquisa nas fases iniciais do projeto.

Ao Prof. Dr. Antônio João Tedesco-Marchese, pelas idéias originais que muito contribuíram e ainda decerto contribuirão para o desenvolvimento do presente projeto.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Pires de Aguiar, pela motivação dada e auxílio prestado por ocasião da inscrição junto ao departamento de intercâmbio acadêmico alemão (DAAD).

Aos amigos e colegas Eder Santos, André Messias, Roberto Portz, Carla Celedônio, Cleberson Fernandes, Sabrina Pancera, James Varela, Helena Nunes, Luiraima Salazar, Luciano Martorano, Adriana e Anderson Meda, Claudia Schallenmüller e Sebastian Ens, Esther e Marcelo Bertazzo, Michela Mantovani e Thomas Hogenmüller e Rodrigo Monteiro, pela agradável e memorável convivência em terra estrangeira, além do incentivo e apoio durante o trabalho.

Aos amigos Daniel Chung, Alexandre da Costa Pereira, Daniel Chaia, João Paulo Leite, Márcio Peçanha, Maurício Guerreiro, Alexandre Martelliti do Amaral, Christian Wiikman, Maurício Lobato, Lian Barreira e Erich Fonoff, pelo importante apoio durante a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Contextualização histórica sobre transplante neural	6
2.2 Ensaios clínicos sobre transplante de células para tratamento da doença de Parkinson	9
2.3 A possibilidade do uso de terapia celular para outras afecções clínicas	12
2.4 Busca por fontes alternativas de células-tronco	15
2.4.1 Células-tronco neurais	17
2.4.1.1 Neurogênese <i>in vitro</i>	17
2.4.1.2 Neurogênese <i>in vivo</i>	19
2.4.2 Células-tronco embrionárias	21
2.4.3 Células-tronco mesenquimais	23
2.4.3.1 Estudos <i>in vitro</i>	23
2.4.3.2 Estudos <i>in vivo</i>	31
3. MÉTODOS	34
3.1 Obtenção dos tecidos	35
3.1.1 Punção da medula óssea	35
3.1.2 Obtenção de tecido fetal humano	36
3.1.3 Obtenção de tecido fetal murino	36
3.2 Isolamento e expansão de células-tronco	37
3.2.1 Isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais	37
3.2.1.1 Separação das células estromais	37
3.2.1.2 Purificação das células não-hematopoiéticas	39
3.2.1.3 Caracterização das células estromais por FACS	40
3.2.1.4 Comprovação da propriedade troncular das células estromais	41
3.2.2 Isolamento e expansão de células-tronco neurais humanas e murinas	42
3.3 Protocolos de diferenciação neuronal	43
3.3.1 Pré-diferenciação de células-tronco mesenquimais	43
3.3.2 Diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais	44
3.3.3 Diferenciação neuronal de células-tronco neurais humanas e murinas	46
3.4 Marcação imunocitoquímica	47
3.5 Contagem celular e microscopia confocal	49
3.6 Análise de morte e viabilidade celular	50
3.7 Eletrofisiologia	51
3.8 Análise estatística	55
4. RESULTADOS	57
4.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais	57
4.1.1 Isolamento das células estromais	57
4.1.2 Purificação das células não-hematopoiéticas	58
4.1.3 Caracterização por FACS	59
4.1.4 Incorporação de BrdU e diferenciação a múltiplas linhagens	61

4.2	Análise imunocitoquímica da diferenciação neuronal.....	63
4.2.1	Pré-diferenciação neuronal (indução).....	63
4.2.2	Diferenciação neuronal tardia.....	69
4.2.2.1	Estudo dos marcadores neuronais.....	69
4.2.2.2	Quantificação das células neuronais.....	76
4.2.2.3	Análise estatística.....	80
4.2.2.4	Análise de morte e viabilidade celular	82
4.2.2.5	Expressão de CREB.....	84
4.3	Diferenciação neuronal. Análise eletrofisiológica comparativa.....	85
4.3.1	células neuronais derivadas de células mesenquimais.....	85
4.3.2	neurônios derivados de encéfalos fetais humanos.....	87
4.3.3	neurônios derivados de encéfalos fetais murinos.....	89
5.	DISCUSSÃO	91
6.	CONCLUSÕES	100
7.	REFERÊNCIAS	101
8.	ANEXO	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
®	marca registrada
ln	logaritmo natural
π	número pi
Σ	somatória
σ	desvio padrão, ou raiz quadrada da variância
Ω , M Ω	Ohms, Megaohms
$\Delta F/F$	variação de fluorescência, por unidade de fluorescência inicial
5HT	5-hidroxi-triptamina, serotonina
6-OH-dopamina	6-hidroxi-dopamina
AMPc	adenosina-monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
B27	suplemento sérico
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHA	butiril-hidroxi-anisol
BrdU	bromodesoxiuridina
Ca ²⁺	cálcio
Cd ²⁺	cádmio
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-diona
CO ₂	dióxido de carbono
CREB	cAMP-responsive element binding protein
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrochloridro
Dcx	doblecortina
DDC	dopa-decarboxilase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DT	tempo de duplicação
e	número de Euler
E	potencial de Nernst
EAE	encefalomielite experimental autoimune
E13, E14 etc	embrião com 13, 14 dias de vida intra-útero
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
F	constante de Faraday
F12	suplemento de Ham
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF 8	<i>Fibroblast growth factor 8</i>
FITC	fluoresceína
g	condutância
GABA	ácido gama-amino-butírico
GAD	<i>Glutamic acid decarboxilase</i>
GalC	Cerebrogalactosidase C
GFAP	<i>glial fibrilar acidic protein</i>

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gráfico QQ	gráfico de quantis normais <i>versus</i> quantis amostrais
HPLC	<i>high pressure liquid cromatography</i>
Hz, KHz	Hertz, Kilohertz
i	corrente
IBMX	iso-butil-metil-xantina
IgG	imunoglobulina G
I_h	correntes hiperpolarizantes
K⁺	potássio
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MAPC	<i>multipotent adult progenitor cells</i>
MEM	<i>minimal essencial medium</i>
mm, µm	milímetro, micrômetro
mM, µM, nM	milimolar, micromolar, nanomolar
mg, µg, ng	miligrama, micrograma, nanograma
Mg²⁺	magnésio
mL, µL	mililitro, microlitro
ms, µs	milisegundo, microsegundo
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i>
MSCBM	<i>mesenchymal stem cell basal medium</i>
N	normal
Na⁺	sódio
NeuN	<i>neuronal nuclear protein</i>
NF200	neurofilamento de 200KD (kilodaltons)
NF-H	neurofilamento de alto peso molecular
NF-M	neurofilamento de médio peso molecular
Ni²⁺	níquel
NSE	<i>neuronal specific enolase</i>
O₂	oxigênio
PBS	<i>phosphated buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	ficoeritina
PET-scan	<i>photon-emission tomography scan</i>
pF	picofarad
pH	potencial de hidrogênio
PKA	fosfoquinase A
PKAi	inibidor de fosfoquinase A
PSA	penicilina-estreptomicina-anfotericina
PSA-NCAM	<i>polissialic neuronal cell adhesion molecule</i>
R	constante de Boltzmann
RT-PCR	<i>real-time polimerase chain reaction</i>
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SNC	sistema nervoso central
T	temperatura em Kelvin
Tau	proteína do citoesqueleto
TH	tirosina-hidroxilase
Tuj-1	βIII tubulina (microtúbulo neuronal)
V, mV	volt, milivolt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Z	valência do íon

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1. Caracterização das células estromais por imunofluorescência.....	58
2. Purificação a laser das células mesenquimais.....	59
3. Caracterização das células estromais por FACS.....	61
4. Propriedade de auto-renovação das células estromais.....	62
5. Diferenciação condrocítica das células-tronco mesenquimais.....	63
6. Expansão clonal de precursores neurais derivados de células mesenquimais.....	65
7. Análise morfológica de precursores neurais derivados de células mesenquimais.....	67
8. Determinação da proporção de células nestina-positivas.....	68
9. Expressão de diversos marcadores em células estromais diferenciadas.....	70
10. Expressão de NF200 em células estromais diferenciadas.....	72
11. Expressão de GABA em células estromais diferenciadas.....	73
12. Análise da especificidade dos marcadores neuronais na fase tardia de diferenciação.....	74
13. Quantificação dos níveis de fluorescência antes e depois da diferenciação neuronal.....	75
14. <i>Box plots</i> representando as porcentagens de células neuronais sob diferentes condições de cultivo.....	77
15. <i>Box plots</i> representando as porcentagens de células neuronais em condições de inibição da diferenciação.....	79
16. Análise da distribuição dos dados a partir dos resíduos.....	81

17. Análise do curso da diferenciação neuronal e da viabilidade celular.....	83
18. Expressão de CREB antes e após a diferenciação.....	84
19. Eletrofisiologia das células estromais em diferenciação.....	86
20. Eletrofisiologia das células-tronco neurais humanas diferenciadas in vitro.....	88
21. Eletrofisiologia das células-tronco derivadas de fetos murinos.....	90

LISTA DE TABELAS

1. Lista dos anticorpos utilizados.....	48
2. Porcentagem de células positivas para NF200 sob diferentes condições de cultivo.....	77
3. Porcentagem de células positivas para NF200 em condições de inibição da diferenciação.....	78
4. Análise de variância das condições de cultivo.....	82

RESUMO

Lepski GA. *Diferenciação neuronal in vitro de células-tronco mesenquimais humanas para uso em transplante neural* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 163p.

Introdução. O transplante de células é possibilidade terapêutica promissora para muitas doenças neurológicas. Nos últimos anos, a possibilidade do isolamento de células-tronco dos tecidos adultos, por exemplo da medula-óssea, atrai a atenção da comunidade científica, estratégia que minimiza os problemas éticos relativos ao uso de tecido fetal para implantes visando ao tratamento de doenças neurológicas. Entretanto, a eficiência da transdiferenciação de células-tronco mesenquimais em neurônios, bem como os mecanismos envolvidos nesse processo, permanecem desconhecidos. A obtenção de neurônios maduros ocorreu somente em sistemas de co-cultura, o que induz a questão se a diferenciação representa um potencial das células *per si*, ou se é possível somente devido à fusão com neurônios maduros. **Objetivos.** No presente trabalho, pretendeu-se verificar o potencial de as células-tronco mesenquimais tornarem-se neurônios e esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo. **Material e métodos.** Células-tronco mesenquimais foram isoladas de 20 doadores voluntários normais e caracterizadas por análise de separação celular ativada por fluorescência. A multipotencialidade foi investigada ao se diferenciar as células em condrócitos e osteócitos. A capacidade de auto-renovação foi confirmada pelo ensaio de incorporação de BrdU. Ulteriormente, as células foram diferenciadas por uma semana em meio contendo AMPc, IBMX, ou combinação de ambos, e os resultados foram comparados com o cultivo em meio básico. Diferentes bloqueadores de Ca^{2+} ou inibidores de PKA foram usados como tentativa de se impedir a diferenciação, ocorrência que foi mensurada com imunocitoquímica para NF-200 (marcador de neurônios maduros). O registro eletrofisiológico por meio de *patch clamp* foi usado para se confirmar o fenótipo neuronal. As figuras foram configuradas em microscopia confocal. Para análise estatística foi utilizada ANOVA com teste *post-hoc*. **Resultados.** As células isoladas expressaram CD90, 105, 44 e 13 mas foram negativas para CD34 e 45. Isto significa que não são de origem hematopoiética; $98,74 \pm 0,43\%$ das células incorporaram BrdU em 24 horas. Após o isolamento, foi possível diferenciá-las em condrócitos ou osteócitos. Em situação controle, não foram evidenciadas células positivas para NF200. Por outro lado, ocorreu positividade em $10,75\% \pm 1,35$ ($p < 0,0001$) das células sob IBMX e, em $15,18\% \pm 1,12$, sob a combinação cAMP e IBMX ($p < 0,0001$). Foram registradas correntes de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem, mas não potenciais de ação. A diferenciação foi inibida com PKAi ($5,73\% \pm 0,42$, $p < 0,0001$), nifedipina ($5,79\% \pm 0,98$, $p < 0,0001$), Ni^{2+} ($7,06\% \pm 1,68$, $p < 0,0001$) e Cd^{2+} (0 ± 0 , $p < 0,0001$). **Discussão.** Isolou-se uma população de células-tronco estromais da medula-óssea de seres humanos que se mostrou multipotencial e auto-renovável. O aumento da concentração de AMPc no meio elevou a concentração de neurônios para 15%. A diferenciação parece depender da via PKA mas também envolve a concentração intracelular de Ca^{2+} . **Conclusão.** O correto entendimento de como as células-tronco mesenquimais diferenciam-se pode contribuir para aumentar a eficácia do método e, talvez um dia, tornar possível o uso dessa ferramenta no campo clínico.

Descritores: células-tronco adultas, transplante de células-tronco mesenquimais, doenças neurodegenerativas, microscopia de fluorescência, técnicas de *patch clamp*.

SUMMARY

Lepski GA. *Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro for neural transplantation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 163p.

Introduction. Cell transplantation has been considered a promising therapeutic approach for many neurological diseases. The possibility of isolation of stem cells from adult tissues, i.e. bone marrow, has attracted the attention of the scientific community in the recent years. This strategy is interesting on avoiding the ethical issues regarding the use of fetal tissue for neural implants. Moreover, the efficiency of the transdifferentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into neurons, and the mechanisms involved in this process remain largely unknown. The obtention of mature neurons was described only in coculture systems, what raised the question if the differentiation is a potential of the cells itself, or if it is possible only due to fusion with mature neurons. **Objectives.** In the present investigation, we aimed to verify the potential of MSCs to differentiate into neurons, and also to clarify the possible mechanisms involved on it. **Material and methods.** MSCs were isolated from 20 healthy human subjects and characterized by FACS-analysis. Multipotentiality was addressed by differentiating them into chondrocytes and osteocytes. The self-renewal capacity was confirmed with BrdU-incorporation assay. Afterwards, cells were differentiated for 1 week in a medium containing cAMP, IBMX, or a combination of both, and the results were compared with cells treated in basal-medium condition. Different Ca^{2+} -blockers and PKA-inhibitor peptide were used on an attempt to impair differentiation, which was quantified with NF-200 immunostaining (a marker of mature neurons). Patch-clamp recording was used to confirm neuronal phenotype. Pictures were taken in confocal microscope. For statistical analysis ANOVA with a post-hoc test was used. **Results.** The isolated cells expressed CD90, 105, 44, and 13, but were negative for CD34 and 45, meaning that they were non-hematopoietic; 98.74 ± 0.43 % of them incorporated BrdU in 6hs. After isolation, they differentiated into chondrocytes and osteocytes. In a control situation, no NF200 positive cell was seen. On the other hand, $10.75\% \pm 1.35$ ($p < .0001$) of positivity was seen under IBMX and $15.18\% \pm 1.12$ in the combination of cAMP with IBMX ($p < .0001$). Na^+ and K^+ -voltage gated currents were recorded. Differentiation was impaired with PKAi ($5.73\% \pm 0.42$, $p < .0001$), nifedipin ($5.79\% \pm 0.98$, $p < .0001$), Ni^{2+} ($7.06\% \pm 1.68$, $p < .0001$), and Cd^{2+} (0 ± 0 , $p < .0001$). **Discussion.** We were able to isolate a population of stromal stem cells from the bone marrow of human subjects, since they were multipotential and self-renewable. Increasing the concentration of cAMP raised the percentage of neurons up to 15%. The differentiation seems to be dependent on the PKA pathway, but also involved the intracellular concentration of Ca^{2+} . **Conclusions.** The complete understanding of how MSC differentiate can contribute to increase the efficiency of the method and thus make possible to use this powerful tool in the clinical practice.

Descriptors: adult stem cells, mesenchymal stem cell transplantation, neurodegenerative diseases, fluorescence microscopy, patch-clamp techniques.

1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças neurológicas para as quais não se dispõe de tratamento realmente eficaz causam incapacidade importante. Dentre elas destacam-se as doenças de Parkinson, de Alzheimer e de Huntington, o acidente vascular encefálico, a dor neuropática crônica e a lesão da medula espinal. Muitas pesquisas são realizadas para possibilitar o tratamento destas doenças neurológicas por meio do transplante de células-tronco. No entanto, a propriedade de tipos específicos de células-tronco gerarem neurônios, sua segurança biológica e a praticabilidade dos métodos envolvidos encontram-se sob intensa investigação e ainda permanecem bastante controversos (Dass e cols., 2006).

Células-tronco podem ser obtidas da camada interna de blastocistos (células embrionárias), do encéfalo de fetos (células fetais), do tecido neuronal maduro (substância cinzenta periventricular ou giro denteado do hipocampo) ou de tecidos maduros não-neuronais (medula óssea). Cada fonte de células apresenta vantagens e desvantagens (Lindvall e Kokaia, 2006). O tecido fetal pode ser implantado logo após sua extração (tecido primário contendo células-tronco, progenitoras e células maduras), ou após o isolamento de células-tronco por cultivo celular.

As células fetais primárias são capazes de sobreviver no encéfalo do hospedeiro e gerar neurônios maduros, que por sua vez, geram axônios longos que podem alcançar estruturas relativamente distantes, organizar novas sinapses e liberar neurotransmissores como a dopamina, além de promover reinervação, por exemplo, do corpo estriado desnervado, o que explica a melhora observada nos testes

comportamentais usando-se o modelo experimental da doença de Parkinson (Nikkhah e cols. 1993, 1994, 1995; Nikkhah e Brandis, 1995; Bentlage e cols. 1999). Alguns ensaios clínicos realizados em seres humanos com doença de Parkinson submetidos a implante de mesencéfalo fetal revelaram que pode haver significativa melhora dos sintomas motores e da captação de F¹⁸-fluordopa no estriado (Lindvall, 1997, Freed e cols., 2001, Piccini e cols., 2005). Todavia, o uso de tecido fetal humano para fins terapêuticos é matéria complexa, não apenas porque há necessidade de número elevado de embriões, como também pela logística necessária e pelas numerosas limitações éticas que se impõem, o que justificou a procura de outras fontes de células para promover a neurorestauração.

Em 1992, Reynolds e Weiss isolaram uma população de células-tronco neurais do encéfalo de ratos adultos por meio de cultivo celular com fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), o que suscitou enorme interesse por permitir a possibilidade de auto-transplantes com finalidade restauradora. No entanto, a ocorrência de neurogênese num encéfalo acometido por afecções degenerativas é questionável.

A observação de que a densidade de células-tronco e progenitores neurais é muito maior no encéfalo em desenvolvimento, durante o período intra-uterino (Svendsen e cols., 1995, 1998; e Caldwell e cols., 2001), estimulou seu isolamento e representou marco importante que possibilitou a expansão clonal de células-tronco neurais, diminuindo a necessidade de vários embriões para realizar um único transplante. Acarretou, no entanto, um dilema ético relacionado ao uso de embriões humanos. Entretanto, o potencial de neurogênese a partir dessas células diminui a favor de gliogênese, à medida em que se prolonga o período de expansão (Shetty e

Turner, 1999). Nos diversos protocolos desenvolvidos com o intuito de se isolar células-tronco neurais de encéfalos adultos ou fetais, salientou-se a importância do bFGF como o principal fator de crescimento indutor de fenótipo neuronal (Gage e cols., 1995; Whittemore e cols., 1999).

Outra linha de pesquisa promissora envolveu a tentativa de neurorestauração utilizando-se células-tronco embrionárias, provenientes da camada interna dos blastocistos. O potencial de diferenciação dessas células primordiais pluripotentes em diferentes linhagens teciduais é vastíssimo. Porém, como consequência de sua imaturidade funcional, também é vasto seu potencial replicativo, o que as torna oncogênicas. De fato, existem relatos de ocorrência de até 25% de teratomas malignos em animais submetidos a implantes de células embrionárias. Portanto, a despeito de se ter descrito a geração de neurônios maduros, inclusive dopaminérgicos, a partir dessas células *in vitro* (Lee e cols., 2000), seu uso clínico não é seguro, e sua implantação envolverá necessariamente o controle da velocidade de replicação (Kim e cols., 2002).

As células-tronco mesenquimais são abundantes mesmo no animal adulto, são facilmente obtidas por simples punção da medula óssea da crista ilíaca, e são biologicamente seguras, por terem sido usadas extensivamente como implantes em doentes com neoplasias hematológicas (Reyes e cols., 2001; Mezey e cols., 2003). Além disso, podem ser usadas em auto-transplantes, o que permite prescindir-se da terapia imunossupressora necessária para a sobrevivência de qualquer enxerto neural, diminuindo-se assim significativamente a morbimortalidade. O isolamento de uma população de células-tronco multipotentes da medula óssea de seres humanos (Pittenger e cols., 1999), a demonstração da diferenciação neuronal espontânea das

células mesenquimais implantadas em camundongos irradiados (Brazelton e cols., 2000; Mezey e cols., 2000) e em seres humanos (Mezey e cols., 2003), e o isolamento de subtipos de células mesenquimais não-hematopoiéticas capazes de transdiferenciação neuronal inauguraram a perspectiva de seu uso clínico com finalidade de neurorestauração (Sanchez-Ramos e cols., 2000; Woodbury e cols., 2000; Jiang e cols., 2002). No entanto, ainda há controvérsia no que diz respeito aos marcadores neuronais utilizados, protocolos de diferenciação e métodos usados para se confirmar a aquisição de fenótipo neuronal. Alguns autores baseiam-se unicamente em critérios morfológicos e poucos marcadores (Kim e cols., 2002), enquanto outros, por outro lado, argumentam que as transformações morfológicas iniciais induzidas durante a diferenciação seriam devidas ao aumento de osmolaridade do meio de cultivo e não implicariam em diferenciação neuronal (Lu e cols., 2004; Neuhuber e cols., 2004). Adicionalmente, os poucos trabalhos com comprovação eletrofisiológica adequada da diferenciação neuronal foram realizados em condições de co-cultivo de células mesenquimais com células neuronais maduras (Jiang e cols., 2003; Wislet-Gendebien e cols., 2005). Considerando-se a propriedade de as células mesenquimais fundirem-se entre si e incorporarem material genômico de outras células, permanece a dúvida se a diferenciação neuronal observada é característica da célula-tronco mesenquimal ou resulta tão somente da sua fusão com neurônios presentes na cultura (Wurmser e Gage, 2002). A possibilidade de que a fusão celular seja responsável pela maturação eletrofisiológica reportada deve ser considerada e é de importância ímpar para se propor o uso de células mesenquimais adultas como fonte alternativa de células-tronco com fins restauradores. De acordo com o que foi exposto, pretende-se determinar se células mesenquimais adultas

podem abandonar sua herança mesenquimal e adquirir características morfológicas, imunocitoquímicas e eletrofisiológicas de neurônios em condições de monocultura. Adicionalmente, pretende-se avançar no entendimento dos possíveis mecanismos bioquímicos envolvidos nesse processo de transdiferenciação.

1.1 Objetivos

O presente trabalho tem por objetivos: i) investigar o real potencial de diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais; ii) estabelecer protocolo de diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais em condições que não envolvam a presença de outros tipos celulares; iii) estabelecer método de avaliação da diferenciação celular baseado em critérios morfológicos, imunocitoquímicos e eletrofisiológicos, avaliando-se inclusive sua especificidade; iv) elucidar os possíveis mecanismos bioquímicos envolvidos na diferenciação neuronal, e, por fim v) comparar o potencial de diferenciação neuronal de células mesenquimais com o de outras células-tronco, mais especificamente células-tronco neurais extraídas de fetos de seres humanos e de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Contextualização histórica sobre transplante neural

O interesse pelo transplante de tecido cerebral não é prerrogativa dos tempos atuais. Essa preocupação está presente desde o século XVI, quando o eminente cirurgião Ambroise Paré (1510-1590) transcreveu em suas anotações (apud Hamby 1960) uma ordem peculiar do rei, solicitando que fosse dada atenção especial a um membro da corte que desejava um novo cérebro. Escreveu Paré:

“Um cavaleiro, em aparente bom estado, tinha a impressão que seu cérebro estivesse se putrefazendo. Ele foi ao Rei, implorando-lhe a convocar M. le Grand, médico real, M. Pigray, cirurgião real e eu, a abrir a sua cabeça, remover o seu cérebro doente e trocá-lo por outro. Pudemos fazer muitas coisas pelo sujeito, mas nos foi impossível restaurar o seu cérebro.” (tradução livre).

Em pintura da época, Paré é figurado em seu laboratório ao lado de um frasco contendo um feto humano, o que sugere que o interesse pelo tratamento ordenado pelo rei não tenha sido tão efêmero.

Foi somente com Thompson (1890), que a comunidade científica tomou conhecimento do primeiro relato experimental envolvendo transplante de tecido cortical de gatos para gatos adultos. Tal iniciativa foi acompanhada pouco tempo depois por Forssman (1900) e Saltykow (1905) que analisaram a viabilidade do

tecido neural implantado em um encéfalo hospedeiro e a propriedade dos enxertos em estimular a regeneração.

Perlow e cols. (1979) reportaram a melhora dos sintomas motores após o transplante de tecido fetal contendo precursores dopaminérgicos em ratos parkinsonianos nos quais havia sido lesada a via nigroestriatal. Simultaneamente, Bjorklund e Stenevi (1979) reportaram a regeneração da via nigroestriatal por meio de implante de tecido fetal. Seguindo a mesma linha, Bjorklund e cols. (1983) demonstraram a sobrevivência de células nervosas após enxertia de tecido mesencefálico fetal implantado em diversas regiões do encéfalo; porém, o alongamento de fibras dopaminérgicas só pôde ser observado no neostriado e no núcleo acumbente. Tal observação teve implicação ímpar no desenho de futuros trabalhos envolvendo neurorestauração, pois estabeleceu-se o conceito de que, para melhorar a integração do implante no hospedeiro, deve-se implantá-lo na própria estrutura-alvo. Pouco tempo depois, Schmidt e cols. (1983) mostraram incremento da ordem de 20% na liberação de dopamina intra-estriatal após o implante de precursores mesencefálicos fetais, provando que os enxertos estavam de fato sintetizando e liberando dopamina na estrutura-alvo. Dunnett e cols. (1983a) demonstraram que o implante intra-estriatal de precursores mesencefálicos abolia as rotações induzidas pela anfetamina e apomorfina em animais submetidos à lesão com 6-OH-dopamina na substância negra, fato que não foi observado nos animais submetidos a implantes na substância negra ou no hipocampo lateral. Usando o modelo de lesão bilateral da via nigroestriatal, modelo esse de difícil execução devido ao grave quadro de afagia e adipsia que se instala, Dunnett e cols. (1983b) observaram reversão parcial da acinesia e da ingesta oral em animais. No entanto,

devido à morte de muitos animais por caquexia que acompanha esse tipo de estudo, o modelo de lesão bilateral foi preterido em favor do modelo de lesão unilateral, no qual a quantificação das rotações por minuto serve para se avaliar a gravidade do quadro e permite análises matemáticas posteriores.

Gage e cols. (1983) observaram crescimento de fibras dopaminérgicas da ordem de 1mm no estriado e de 3mm no hipocampo em animais adultos implantados, o que, sem dúvida, representava sério fator limitante para as terapias neurorestauradoras. No entanto, Nikkhah e cols. (1995a) mostraram ser possível a regeneração completa da via nigroestriatal ao implantarem precursores fetais na substância negra de ratos neonatos, nos quais notou-se extenso crescimento de fibras, que inclusive alcançaram o estriado não-denervado. Resta-nos a tarefa de descobrir quais são os fatores responsáveis pelo crescimento de fibras no animal neonato, fatores esses que poderiam ser manipulados no animal adulto para facilitar a integração do enxerto. Seguindo essa lógica, Timmer e cols. (2004), pesquisadores do mesmo grupo, em Freiburg, Alemanha, mostraram aumento da sobrevivência do implante, de sua integração funcional e da resposta motora quando precursores neurais são implantados concomitantemente a células de Schwann que hiperexpressam bFGF.

2.2 Ensaios clínicos sobre transplante em doença de Parkinson

Após a evidenciação da neuroregeneração experimental em animais, alguns autores passaram a propor o mesmo tratamento para doentes com doença de Parkinson. Lindvall e cols. (1990 e 1992), da Universidade de Lund, Suécia, demonstraram que havia melhora da bradicinesia e da rigidez, bem como aumento da captação de F^{18} -fluordopa, após o implante unilateral de tecido derivado de quatro fetos com até nove semanas de gestação no putâmen pós-comissural em uma série de casos. Utilizando avaliação clínica padronizada, Freeman e cols. (1995) mostraram melhora clínica segundo a escala *Unified Parkinson's disease Rating Scale* (UPDRS) e melhora da captação de F^{18} -fluordopa em quatro doentes submetidos a implante de mesencéfalos de feto com até nove semanas de gestação no putâmen pós-comissural bilateral. Um doente dessa casuística faleceu um ano e meio após o último implante e a análise patológica do material revelou sobrevida de mais de 200.000 células imunorreativas para tirosina-hidroxilase (marcador de neurônios monoaminérgicos), evidências de neosinaptogênese à microscopia eletrônica, e integridade da barreira hêmato-encefálica, o que demonstrou ter havido integração funcional do enxerto no hospedeiro, além de diferenciação dopaminérgica, corroborando a melhora clínica observada (Kordower e cols., 1996).

Piccini e cols. (1999) avaliaram um doente da casuística sueca dez anos após o transplante, e evidenciaram liberação de quantidade normal de dopamina no putâmen. Lindvall e Hagell 2000, ulteriormente, confirmaram em casuísticas maiores a melhora clínica relatada. Entretanto, existem somente dois ensaios clínicos

controlados duplamente-encobertos, ou seja, onde se fez cirurgias-controle para “cegar” o cirurgião e o doente sobre o tema (Freed e cols., 2001; Olanow e cols., 2003). No primeiro, 40 doentes gravemente acometidos pela doença de Parkinson com tempo de evolução médio de 14 anos foram implantados com tecido mesencefálico fetal, seguidos durante um ano, e avaliados segundo o UPDRS e a captura de F^{18} -fluordopa pelo *PET-scan*. Ocorreu melhora clínica e iconológica nos doentes com menos de 60 anos de idade, mas ocorreram discinesias de fase “*off*” refratárias em 15% dos casos. Entretanto, o trabalho avalia doentes gravemente acometidos e comprometidos por longo tempo de evolução. Nesse tipo de doente, entende-se que haja hiperexpressão de receptores dopaminérgicos, tornando-os mais susceptíveis à ocorrência de discinesias, induzidas ou não por levodopa. Disto resultou o questionamento se doentes menos graves, nos quais esses mecanismos plásticos não são tão exuberantes, poderiam beneficiar-se de modo mais eficaz com a terapia celular restauradora.

No segundo estudo controlado, 34 doentes foram implatados com o mesmo tipo de tecido e seguidos durante dois anos. Embora tenha ocorrido efeito terapêutico nos pacientes menos acometidos, não houve efeito terapêutico global, apesar de ter havido marcante aumento (da ordem de 30%) da captação de F^{18} -fluordopa e de na análise *post-mortem* ter-se notado sobrevivência do enxerto e diferenciação dopaminérgica nas células implantadas. Entretanto, os doentes dessa casuística eram mais graves que os de Freed e cols (2001), a julgar pela média de dose de medicação necessária para tratá-los antes do transplante. Além disso, notou-se melhora clínica marcante durante os primeiros seis meses pós-transplante, que não foi mantida mais tardiamente. Verificou-se posteriormente que a piora clínica observada coincidiu

com a suspensão da terapia imunossupressora. Segundo Winkler e cols., 2005 a reação enxerto-hospedeiro teria sido a causa de recrudescência tardia dos sintomas. Corroborou essa hipótese o fato de ter-se observado infiltrado microglial ao redor do enxerto na autópsia de dois doentes. Adicionalmente, 56,5% dos doentes apresentaram discinesias de fase “*off*”. Interrogou-se se tal efeito adverso poderia ser resultado de rejeição crônica, que causaria maior liberação de dopamina no estriado. Essa possibilidade foi consubstanciada pelo estudo de Hagell e cols. (2002). Esses autores, ao revisarem a casuística do programa de transplante de Lund/Londres/Marburg, notaram que ocorreram discinesias particularmente graves em seis doentes nos quais a imunossupressão foi interrompida 2,5 anos após o transplante.

De fato, a ocorrência de discinesias induzidas pelo enxerto tornou-se, juntamente com as dificuldades técnicas para a obtenção de tecido fetal humano, o principal fator impeditivo da incorporação da terapia celular no arsenal terapêutico da doença de Parkinson. Atualmente, deflagrou-se busca obsessiva pelo entendimento de seus mecanismos, para que seja possível dispor-se de tão desejada opção terapêutica no futuro. Nesse sentido, Hagell e cols. (2002) demonstraram não haver relação entre a ocorrência e gravidade das discinesias e os níveis de captação de F¹⁸-fluordopa no *PET-scan*. Ma e cols. (2002) hipotetizaram que as discinesias poderiam ser devidas a padrão anômalo de reinervação do estriado, que se caracterizaria pela distribuição de novas terminações nervosas em nichos. Piccini e cols. (2005) salientaram que as discinesias não poderiam ser explicadas pela localização em que os implantes foram realizados, tampouco pela maior captação de F¹⁸-fluordopa. Complementarmente, Winkler e cols. (2005) observam que as

discinesias ocorreram na mesma frequência em doentes que receberam tecidos oriundos de um ou quatro fetos por hemisfério, o que denotou a pequena importância da quantidade de células transplantadas como fator desencadeante dessa complicação. Acrescentaram ainda que a reação de rejeição ao implante, a gravidade da doença no momento do transplante (tratamento com doses elevadas de L-dopa), além dos cuidados com a preparação e conservação do tecido poderiam representar fatores adicionais na patogenia das discinesias. Urgem, portanto, estudos em animais, como o de Carlsson e cols. (2006), para que se esclareça a patogênese das discinesias, antes que seja apropriado propor terapias para doenças neurológicas baseadas em transplantes celulares (Winkler e cols., 2005).

2.3 Possibilidade do uso da terapia celular para tratar outras afecções neurológicas

Se com relação à doença de Parkinson defronta-se com alguns fatores limitantes à terapia celular que devem ser considerados, a situação é ainda mais incerta em relação às outras afecções neurológicas. Não obstante, é notável o avanço que se alcançou nos últimos anos e vultoso o investimento destinado para tal questão, o que pode, sem dúvida, mudar muito em breve o *status quo*.

Em relação à dor neuropática, Eaton e cols. (1997) e Cejas e cols. (2000) observaram melhora da hiperalgesia e da alodínea em ratos E13 (13 dias de vida intra-útero) com dor neuropática induzida por ligadura do nervo ciático, após o

transplante de células fetais derivadas da rafe modificadas geneticamente para produzir fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF). O BDNF atuaria potencializando a diferenciação serotoninérgica e a maturação sináptica do implante, favorecendo circuitos inibitórios locais na medula espinal que bloqueariam a transmissão dolorosa *in loco*.

Em ratos com dor mielopática traumática induzida por hemiseção da medula espinal no 13º segmento torácico (T13), Hains e cols. (2001 e 2002) reportaram melhora não apenas da hiperalgesia e da alodínea, mas também dos testes motores realizados até um mês após o implante, resultados que diferiram dos grupos-controle. Nesses estudos, células derivadas de ratos E13 foram modificadas geneticamente para crescer a 33°C e estacionar a 39°C, e ainda modificadas para produzir serotonina (5HT) e BDNF. No entanto, a discreta melhora observada (erro alfa de 5%) não foi explicada do ponto de vista estrutural, haja visto que não houve comprovação do crescimento de fibras do córtex motor primário até níveis infra-lesionais da medula espinal. Lembrando-se dos clássicos estudos de Gage e cols. (1983), que demonstraram haver crescimento de no máximo 3mm das fibras derivadas do enxerto, conclui-se ser pouco provável que ocorra regeneração da ordem de dezenas de centímetros, como sugeriu o estudo. Restaria a possibilidade de as células implantadas terem estabelecido conexões em série em um circuito rostro-caudal descendente aberrante, mas tal teoria carece de confirmação experimental. Entretanto, a melhora da dor poderia decorrer da produção e liberação local de neurotransmissores inibitórios.

Com intuito de neurorestauração para casos de acidentes vasculares isquêmicos, Zhu e cols. (2005) demonstraram haver recuperação motora de animais

submetidos à isquemia do sistema nervoso central e posteriormente implantados com células-tronco neurais modificadas derivadas de ratos E14 para produzir fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Semelhantemente, Zhao e cols. (2002), pertencentes ao mesmo grupo de pesquisadores, também relataram melhora dos sinais motores após o implante de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, mas não justificaram estruturalmente a resposta clínica observada; vale também aqui a argumentação explicitada acima, acerca do crescimento das fibras derivadas do enxerto. Nesse modelo, ainda restaria a possibilidade de o VEGF ter induzido a neoangiogênese, permitindo a recuperação de zonas de penumbra isquêmica por princípios não puramente neurorestauradores.

Interessante, porém, é o fato de que a terapia celular até aqui considerada parecer não estar restrita ao âmbito da geração de neurônios e reestabelecimento de circuitos perdidos pelas condições patológicas. Duas linhas de pesquisa merecem menção especial pelo campo que oferecem. A primeira diz respeito à terapia oncológica e a segunda, à terapia imunomoduladora. Trata-se, no primeiro caso, de se utilizar propriedades intrínsecas das células imaturas implantadas no encéfalo, quais sejam, a migração extensa e a primazia por áreas de quebra da barreira hematoencefálica. Ao se combinar essas propriedades com uma transformação genética que condicione a síntese de um quimioterápico, tem-se um veículo ótimo para liberação de droga nas áreas de infiltração tumoral. Se valendo desse princípio, Lee e cols. (2003) reportaram maior longevidade de ratos com glioma implantados com células-tronco mesenquimais produtoras de fator plaquetário-4, agente inibidor da angiogênese. Iniciativas semelhantes foram tentadas por técnicas de transfecção de

células-tronco com adenovírus antitumorais (Komarova e cols., 2006; Nakamura e cols., 2004).

A segunda linha de pesquisa diz respeito à capacidade que as células-tronco indiferenciadas têm de sintetizar substâncias imunomoduladoras e com o poder de alterar o curso natural de doenças inflamatórias como a esclerose múltipla. Seguindo essa linha, Martino e Pluchino (2006), Pluchino e cols. (2003 e 2005) evidenciaram diminuição dos focos inflamatórios e recuperação nos testes funcionais em ratos com encefalomielite experimental autoimune (EAE) modelo experimental de esclerose múltipla, após o implante de células-tronco neurais.

Portanto, como vimos, embora os dados atuais indiquem a multiplicidade dos efeitos potenciais das células-tronco, muitas pesquisas experimentais em animais ainda são necessárias para se conhecer seus reais benefícios e limitações, condições essas necessárias para que se possa propor com segurança novos estudos experimentais em seres humanos.

2.4 Busca por fontes alternativas de células-tronco

Embora os estudos com células fetais humanas sejam mais promissores e adiantados no âmbito da neurorestauração, além de terem contribuído para desfazer diversos dogmas relativos ao potencial de regeneração do encéfalo adulto, seu uso em larga escala é dificultado por diversos fatores. Em muitos países, aspectos culturais, religiosos e legais limitam o abortamento e o uso tecidos de abortos

humanos para pesquisa. No Brasil, abortamentos legais de fetos durante o primeiro trimestre de gestação geralmente são autorizados em casos de violência sexual contra a mulher. Além disso, o número de tais procedimentos na rede assistencial pública jamais suplantaria a necessidade de tratamento à base de transplantes para doentes parkinsonianos. Embora o abortamento durante o primeiro trimestre da gestação seja permitido em muitos países desenvolvidos, muitas mulheres recusam-se a doar o material fetal para fins científicos em decorrência principalmente do drama psicológico que as aflige no momento do abortamento. Devido à pouca disponibilidade de abortos para fins científicos, muitos esforços e recursos foram direcionados no sentido de se obter fontes alternativas de células-tronco que apresentem, idealmente, i) vasto potencial de diferenciação em diferentes linhagens neurais, *id est*, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, ii) capacidade de auto-renovação quando se encontram na forma indiferenciada e iii) elevada disponibilidade, facilidade de extração e de isolamento.

Assim sendo, há muitas alternativas, destacando-se dentre elas, i) células-tronco neurais isoladas e expandidas a partir de uma pequena amostra de encéfalo fetal ou adulto, ii) células-tronco embrionárias obtidas da camada interna de blastocistos humanos, mantidas em cultura e disponíveis comercialmente, iii) células-tronco mesenquimais oriundas da medula-óssea de adultos ou do cordão umbilical de recém-natos, iv) células-tronco derivadas de células somáticas adultas, obtidas por transfecção nuclear em ovócito com técnicas de clonagem, v) células-tronco derivadas da divisão partenogênica espontânea, de rara ocorrência na espécie humana e sem viabilidade gestacional (Tabar e Studer, 2002).

2.4.1 Células-tronco neurais

2.4.1.1 Neurogênese *in vitro*

Frederiksen e cols. (1988) e Frederiksen e McKay (1988) foram os primeiros a isolar uma população de células no cerebelo de ratos pós-natais capaz de gerar neurônios e glia quando cultivados sob condições especiais. Pouco tempo depois, Reynolds e cols. (1992) e Reynolds e Weiss (1992) isolaram a mesma população de células multipotentes no corpo estriado de ratos adultos e embrionários (E14). Observaram que as células cresciam na ausência de soro, respondiam ao fator de crescimento epitelial (EGF), expressavam o filamento intermediário nestina, presente em células neuroepiteliais imaturas, e geravam neurônios e glia quando cultivadas com EGF.

A seguir, vários protocolos sucederam-se, objetivando a geração de diferentes taxas de neurônios *in vitro* (Svendsen e cols., 1998; Caldwell e cols., 2001). A partir desses estudos, concluiu-se que os fatores neurotróficos EGF e bFGF eram os principais fatores responsáveis pela indução de fenótipo neuronal e expansão de precursores neurais.

Foi descrita a geração de neurônios dopaminérgicos *in vitro* a partir de extratos de encéfalo fetal ou adulto, ou seja, de precursores neurais, em sistemas de cultivo com ácido ascórbico (Yan e cols., 2001), fator de crescimento de fibroblasto 8 (FGF8) e *sonic hedgehog* (SHH), ambas as proteínas expressas na notocorda (Ye e

cols., 1998; Hynes e cols., 1995), cAMP (Sanchez-Pernaute e cols., 2001) ou sob baixo teor de oxigênio (Studer e cols., 2000). Nessas preparações, o tecido extraído do encéfalo adulto ou fetal é dissociado enzimaticamente e diretamente colocado em meio de diferenciação, sem passar pela fase de isolamento ou seleção de células-tronco propriamente ditas. Como os neurônios maduros morrem em poucos minutos, restam no sistema não só células-tronco, mas também células progenitoras um pouco mais diferenciadas, mais resistentes que os neurônios maduros, e também células gliais maduras e progenitores gliais.

Já a indução de diferenciação dopaminérgica a partir das células-tronco neurais propriamente ditas, isoladas por meio de expansões de longo prazo, é muito mais trabalhosa, possivelmente porque as células-tronco perdem progressivamente seu potencial de diferenciação proporcionalmente à duração do tempo de expansão, e também porque os outros constituintes celulares secretam fatores de crescimento que facilitam a maturação e a sobrevivência das células neuronais jovens. Mesmo assim, foram observadas algumas células que expressam tirosina hidroxilase (TH), enzima presente em neurônios monoaminérgicos, em culturas derivadas de células-tronco neurais tanto murinas (Carvey e cols., 2001; Ling e cols., 1998), quanto humanas (Christophersen e cols., 2006). Falta, no entanto, marcação mais convincente de células dopaminérgicas, bem como comprovação da síntese de dopamina e descrição das características eletrofisiológicas de neurônios verdadeiramente dopaminérgicos.

No sentido de comprovar que células-tronco neurais são mesmo capazes de gerar neurônios maduros *in vitro*, Song e cols. (2002a e b) demonstraram de maneira indubitável a maturação eletrofisiológica de células-tronco neurais, acrescentando que o processo depende da interação com astrócitos e neurônios maduros

eletricamente ativos presentes no sistema de cultivo. Deisseroth e cols. (2004) complementaram essa observação demonstrando que a ultimação do processo de maturação dependia da atividade elétrica das células em desenvolvimento e sugeriram que há necessidade da sinalização elétrica, além da química, para o correto desenvolvimento sináptico.

Embora células-tronco neurais sejam capazes de gerar neurônios maduros *in vitro*, ainda permanece obscuro como se pode condicionar a geração de tipos específicos de neurônios, como por exemplo dopaminérgicos, e, principalmente, como se poderá induzir tal diferenciação após o seu implante no encéfalo adulto, lesado ou intacto (Grothe e cols., 2004; Sorensen e cols., 2005; Thompson e cols., 2005).

2.4.1.2 Neurogênese *in vivo*

À parte da importância do entendimento dos mecanismos que regem a diferenciação neuronal *in vitro*, não é de menor relevância o conhecimento acerca dos mecanismos fisiológicos que condicionam, no animal adulto intacto, a geração espontânea de neurônios. De fato, se fosse possível acelerar ou estimular esse processo, poderíamos promover neurorestauração sem a necessidade de implantes biológicos de qualquer natureza.

A neurogênese ocorre normalmente em todo o encéfalo na vida pré-natal e em duas regiões encefálicas durante toda a vida adulta, a saber, na camada

subgranular do giro dentado hipocampal e na região ântero-lateral da zona subventricular dos cornos frontais dos ventrículos laterais (Ming e Song, 2005; Doetsch e cols., 1999; Fukuda e cols., 2003). Nessas regiões, um tipo especial de astrócitos estrelados e duplamente positivos para proteína glial fibrilar acídica GFAP e nestina representam as verdadeiras células-tronco neurais fisiológicas (células tipo B ou tipo 1), e dividem-se assimetricamente com baixa taxa de duplicação, originando uma célula semelhante a si mesmas e outra célula, arredondada e de pequenas dimensões (tipo C ou tipo 2), que se divide com elevada taxa de duplicação, sendo por isso denominada amplificadora transitória, positiva para nestina e molécula de adesão celular neuronal polissialica (PSA-NCAM), mas negativa para GFAP. Essas células dividem-se rapidamente e originam neuroblastos ou progenitores neuronais (tipo A), negativos para nestina e GFAP, mas positivos para doblecortina (Dcx), que migram para seu lugar definitivo no SNC à medida em que se diferenciam. Nessa fase, neuroblastos jovens apresentam mais plasticidade sináptica (Schmidt-Hieber e cols., 2004), o que condiciona maior susceptibilidade às aferências sinápticas que recebem, facilitando assim sua integração em novos circuitos. Na verdade, para ultimateção da diferenciação neuronal e completa maturação funcional, é condição *sine qua non* a integração sináptica dos novos neuroblastos (Tozuka e cols., 2005). No entanto, ainda permanece obscuro o papel fisiológico que a neurogênese desempenha para o organismo. Deisseroth e cols. (2004) hipotetizam, baseados em simulações matemáticas envolvendo o modelo de rede neural hebbiana em camadas, que o fato de haver *turnover* celular no hipocampo aumenta, em muito, a eficiência do sistema em consolidar novas informações. Essas novas informações seriam armazenadas em

função da perda de memórias mais antigas e esse seria o meio que a Natureza encontrou para permitir o aprendizado por tempo ilimitado.

Assim sendo, o entendimento dos fatores condicionantes da neurogênese fisiológica pode permitir um dia o controle ou o aceleração desse processo com fins neurorestauradores. No entanto, pesquisas adicionais ainda são necessárias antes que seja alcançado tão sonhado objetivo.

2.4.2 Células-tronco embrionárias

Uma outra vertente experimental bastante promissora no âmbito da neurorestauração envolve o uso de células-tronco embrionárias. Tais células são extraídas do produto conceptual ainda em sua fase embrionária, ou seja, antes de completada a organogênese, o que na espécie humana ocorre por volta da nona semana de gestação. Mais especificamente, linhagens de células embrionárias são obtidas da camada interna de blastocistos obtidos de clínicas de fertilização. Estas são consideradas pluripotentes (Gage, 2000), *id est*, são capazes de gerar células maduras dos três folhetos embrionários. Entretanto, e até em consequência de seu elevado potencial de diferenciação, possuem também altíssimo poder replicativo, o que torna extremamente difícil controlar seu crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Num primeiro momento, alguns autores descreveram a possibilidade da obtenção de neurônios funcionantes a partir de células-tronco embrionárias de

camundongos *in vitro* (Okabe e cols., 1996; Lee e cols., 2000), e relataram positividade para TH e para Tuj-1 (proteína do citoesqueleto neuronal) em 35% das células cultivadas na presença de SHH, FGF8 e ácido ascórbico. Complementarmente, Perrier e cols. (2004) relataram diferenciação dopaminérgica de células embrionárias humanas em condições semelhantes, o que foi comprovado com imunocitoquímica, e mensuraram a liberação de dopamina na cultura por meio de análise HPLC, além de terem mensurado atividade elétrica compatível com neurônios maduros.

Num segundo momento, Bjorklund e cols. (2002) reportaram reversão dos sintomas parkinsonianos e constataram imunorreatividade para TH nas células células-tronco embrionárias implantadas no estriado de animais de experimentação. Kim e cols. (2002) mostraram, além da melhora dos testes rotacionais em animais tratados com anfetamina, maturação eletrofisiológica das células implantadas, traduzida por retificação de voltagem típica de células dopaminérgicas (SAG). No entanto, os primeiros autores fizeram menção à ocorrência de teratomas malignos em 5 de 19 animais implantados, o que levantou a questão sobre a biosegurança das células-tronco embrionárias para uso clínico. Controlar seu potencial replicativo equivale a controlar seu potencial de diferenciação, e assim diminuir sua eficácia na gênese neuronal. Além disso, o uso de células embrionárias humanas para pesquisa é proibido ou fortemente limitado em muitos países, o que torna problemático o seu uso em larga escala.

A célula ideal deve, portanto, ser de fácil obtenção (mínimo risco de extração, fácil disponibilização), de preferência autóloga, para que não seja necessária imunossupressão, e apresentar potencial de replicação e diferenciação ilimitados

(sendo as duas últimas características inversamente proporcionais entre si). Adicionalmente, devem ser de uso seguro, o que significa dizer que, uma vez implantadas, devem perder seu potencial replicativo e entrar no ciclo de diferenciação celular.

2.4.3 Células-tronco mesenquimais

2.4.3.1 Estudos *in vitro*

As características expostas acima são obviamente impossíveis de serem encontradas no mesmo tipo celular. Não obstante, chamou a atenção de pesquisadores a descoberta e caracterização de células-tronco mesenquimais multipotentes na medula óssea de adultos, que fisiologicamente desempenham papel na remodelação de tecidos mesenquimais pós-lesão (Pittenger e cols., 1999). Essas células apresentam alto poder replicativo e podem ser obtidas pela simples punção óssea, e assim servir como fonte de células para auto-transplantes. Evidentemente, a perspectiva de que tais células possam gerar neurônios e glia em condições especiais parece promissora.

Pouco tempo depois, Sanchez-Ramos e cols. (2000) e Woodbury e cols. (2000) descreveram diferenciação *in vitro* de células mesenquimais de roedores para células semelhantes a neurônios.

Sanchez-Ramos e cols. (2000) foram os primeiros a descrever a diferenciação neuronal *in vitro* de células estromais da medula óssea de roedores e seres humanos. Usando meio contendo 10% de soro fetal de bezerro (FCS), 0,5 μ M de ácido retinóico e 10ng/mL de BDNF durante uma semana, estes autores reportaram 0,5% de positividade para nestina (precursor neuroglial, vista em menos de 0,5% do total de células, no caso uma célula em cada 30 campos visuais), 0,5% para NeuN (proteína neuronal nuclear específica, marcadora de neurônio pós-mitótico) e 0,8% para GFAP (proteína glial fibrilar acídica, marcadora de astrócito ou precursor neuroglial), o que denota ocorrência extremamente rara. Relataram ainda que a maior parte das células tornou-se alongada e fusiforme e foi positiva para fibronectina (marcador de fibroblasto). A baixa taxa de eficiência do protocolo provavelmente deveu-se ao uso de soro fetal, já que esse estimula o crescimento de células não-neuronais. Em experimentos adicionais sobre co-cultivo de células mesenquimais marcadas com a tinta lipofílica PKH26® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e células maduras derivadas do mesencéfalo de roedores, ocorreu aumento da taxa de geração de células positivas para NeuN em 2-5% e de células positivas para GFAP em 5-8%, embora com ausência de células positivas para MAP2 (proteína associada ao microtúbulo do tipo II, outro marcador de neurônios maduros) e ausência da demonstração de células com morfologia neuronal madura. Assim sendo, a presença de um marcador parece não ser suficiente para caracterizar a célula em questão como madura, o que torna relevante o estudo das alterações morfológicas e funcionais (como, por exemplo, o estudo eletrofisiológico) para a correta caracterização de uma célula neuronal. Deve-se notar ainda que tintas lipofílicas ligam-se à bicamada lipídica e passam de uma célula a outra por simples contato direto, constituindo

método inadequado de marcação de co-culturas. No caso, especula-se aqui que a tinta tenha sido absorvida por células neuronais provenientes da cultura de tecido neuronal fetal.

O segundo grupo de autores aqui citado (Woodbury e cols., 2000) reportou a indução de importantes alterações morfológicas, quais sejam, a retração do corpo celular e o alongamento e ramificação dos prolongamentos citoplasmáticos, documentados após o intervalo de 3,5 horas de exposição a um meio contendo 1 a 10 mM de β -mercaptoetanol. Os autores relatam 78% de células positivas para enolase neuronal específica (NSE) e 79% de positividade para neurofilamento-M (NF-M) após diferenciação com meio contendo 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 200 μ M de hidroxianisol butilado (BHA). Devem-se ressaltar, no entanto, dois aspectos. Em primeiro lugar, as substâncias empregadas para diferenciação não são citocinas ou fatores neurotróficos, mas sim agentes osmóticos usados para criopreservação de culturas celulares. Assim sendo, é parte de seu mecanismo de ação a promoção do enxugamento celular e o enrugamento das membranas, evitando-se assim a rotura causada pela dilatação da água em solidificação. Especula-se que as alterações morfológicas profundas observadas tenham decorrido do efeito osmótico dos agentes estudados; tal hipótese foi confirmada por Lu e cols. (2004) e Neuhuber e cols. (2004). Em segundo lugar, os marcadores NSE e NF-M são expressos em fases precoces do desenvolvimento neuronal, e é ainda incerto até que ponto são expressos por células imaturas de outras linhagens não-neuronais. São, portanto, marcadores inadequados e inespecíficos para se averiguar diferenciação neuronal. De fato, alguns dos primeiros autores a publicar trabalho a respeito da transdiferenciação de células mesenquimais notaram, anos mais tarde, que células imaturas expressam genes do

ectoderma, mesoderma e endoderma antes de entrarem no ciclo de diferenciação neuronal, o que torna a escolha de um marcador neuronal específico ainda mais trabalhosa (Woodbury e cols., 2002). Para corroborar tal hipótese, Goolsby e cols. (2003) relataram a expressão (por *real time*-PCR) de NeuN, NF-H e ácido glutâmico-decarboxilase (GAD65) em precursores hematopoiéticos da medula óssea, e Neuhuber e cols. (2004) notaram positividade para alguns marcadores neuronais usados por outros autores mesmo em formas indiferenciadas de células estromais medulares.

A partir das observações desses primeiros autores, muitos trabalhos foram publicados, mostrando a influência de um ou outro fator que seria crucial para a diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais. No entanto, muitos protocolos baseiam-se somente na caracterização imunocitoquímica, muitas vezes com poucos marcadores, ou sem os controles negativos necessários, e ainda sem qualquer correspondência morfológica ou funcional. Por assim ser, o principal motivo que motiva a presente discussão é o de se tentar estabelecer um padrão de análise, segundo o qual se possa classificar uma célula em diferenciação como neurônio maduro.

Deng e cols. (2001) mostraram a importância do AMPc como fator indutor de diferenciação neuronal, ao reportarem 25% de células com “morfologia neuronal”, sem, no entanto, completarem o estudo com análise imunocitoquímica ou eletrofisiológica; a análise com *western blotting* revelou expressão de NSE, proteína associada ao microtúbulo 1B (MAP1B) e β III -tubulina (Tuj-1) seis dias após o cultivo com 0,5mM de isobutilmetilxantina (IBMX) e 1mM de dibutilil-AMPc. O mecanismo de ação do AMPc ainda é especulado, mas acredita-se que seja capaz de

inibir a proliferação celular, induzindo diferenciação celular e, por mecanismo relacionado, induzir apoptose. Interessante notar que após seis dias em cultura houve degeneração maciça das células.

Kim e cols. (2002) reportaram a diferenciação de células-tronco da medula óssea em células neuroprogenitoras em meio contendo bFGF e ácido retinóico. A marcação imunocitoquímica para marcadores neurais (β III-tubulina e neurofilamento-M) mostrada no trabalho não é, todavia, compatível com a morfologia neuronal, mas sim com células estromais medulares indiferenciadas, que são positivas para vimentina.

Hung e cols. (2002) relataram a diferenciação *in vitro* de células-tronco da medula óssea em “células eletricamente ativas”, o que foi conseguido em meio contendo β -mercaptoetanol e ácido retinóico. Nota-se, no entanto, que o padrão morfológico mostrado não é o típico das células neuronais. Além disso, relatou-se positividade para nestina e β -tubulina, que podem estar presentes mesmo em estágios indiferenciados, além de negatividade para MAP2 (marcador de neurônios maduros). Estranha-se a ausência de MAP2 e, concomitantemente, positividade para NeuN, proteína nuclear específica de neurônios maduros. Observando-se que NeuN deve ser expressada somente no núcleo, e que no trabalho observou-se marcação no citoplasma, é possível que problemas de ordem metodológica justifiquem de modo mais plausível os resultados pleiteados. Com respeito aos traçados eletrofisiológicos que representam correntes induzidas por pulsos de voltagem, notou-se que não foram reprimidas correntes de K^+ dependentes de voltagem, que são as primeiras a surgir quando ocorre diferenciação neuronal. Assim sendo, não há provas apresentadas

sobre diferenciação neuronal, baseando-se na imunocitoquímica, morfologia e análise funcional.

Foram também pesquisados os possíveis fatores de crescimento ou agentes anti-oxidantes determinantes da indução de diferenciação neuronal. Kabos e cols. (2002) reportaram a importância do bFGF neste processo e relataram a ocorrência de 5 a 10% de células positivas para Neurofilamento 200, 14 dias após cultura em meio contendo bFGF. Foi ilustrada positividade para outros marcadores de neurônios, tais como a enolase neuronal específica (NSE), para proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) e proteína neuronal nuclear específica (NeuN). Merece menção o fato de que todas as células apresentaram processos dendríticos curtos e forma estrelada, achados típicos de progenitores neurais, mas não de neurônios maduros. Além do mais, não foi explicitado qual anticorpo MAP2 foi utilizado. Sabe-se que MAP2abc (isoformas a, b e c) está presente em células neuronais jovens e maduras, enquanto que MAP2ab (isoformas a e b) é característica de maturidade.

Jiang e cols. (2002, 2003) estimularam mais pesquisas ao isolarem por meio de separação celular ativada por fluorescência (FACS) uma população de células da medula óssea de roedores e de seres humanos que denominaram células progenitoras adultas multipotentes (MAPC). A população inicial de células não era meramente de células estromais medulares, mas sim, uma subpopulação negativa para CD45 (marcador de células hematopoiéticas maduras) e glicoforina A (marcador de hemáceas) e foi expandida em fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB). Observaram então, a ocorrência de 15% de astrócitos (GFAP+), 12% de oligodendrócitos (GalC+, cerebrogalactosidase) e 68% de neurônios (NF200+, neurofilamento de 200KD) após 14 dias de cultivo sobre placas revestidas com

fibronectina, em meio contendo somente bFGF 100ng/mL. Num segundo experimento, relataram que, quando cultivadas por uma semana em bFGF, outra semana adicional em FGF8 (fator de crescimento de fibroblasto número 8) e uma terceira semana em BDNF, 30% das células expressavam marcadores de neurônios dopaminérgicos (DDC ou dopadecarboxilase, e tirosina hidroxilase, TH), 20% expressavam serotonina e 50%, ácido gama-aminobutírico (GABA), o que denota um fenótipo bem mais maduro. Também foi ilustrada positividade para Tau e MAP2. Complementaram o estudo no segundo trabalho citado (2003), afirmando que a maturação eletrofisiológica completa só pôde ser alcançada por meio de co-cultivo com astrócitos fetais, quando então puderam medir salvas de potenciais de ação e correntes de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem de grande amplitude. No entanto, ao se analisar a morfologia das células positivas para os neurotransmissores apresentados, verificou-se que não são coincidentes com o que se esperaria de neurônios maduros. Ademais, a hipersaturação das imagens de microscopia confocal a *laser* sugere ter havido problemas técnicos na marcação imunocitoquímica que não foram mencionados nos trabalhos. Os registros eletrofisiológicos poderiam ser explicados por fusão das células mesenquimais com células imaturas fetais, propiciando assim transdiferenciação, ou simplesmente serem registro de células neuronais derivadas da cultura de encéfalo fetal e não das células mesenquimais, haja visto que nenhum método de marcação proporciona 100% de especificidade. Adicionalmente, a técnica de transfecção lentiviral utilizada (GFP), segundo os autores, resultou em eficiência de 28% de células marcadas. Conclusivamente, não se pode afirmar que os resultados eletrofisiológicos exemplificados foram obtidos de neurônios maduros que se diferenciaram a partir de células mesenquimais medulares.

Outra possibilidade para explicar os resultados é a de que os autores tenham isolado um subtipo muito peculiar de células estromais da medula óssea, o que não ocorreu com outros pesquisadores. Para finalizar, as tentativas de outros grupos de reproduzir os protocolos detalhados nesses artigos não foram eficazes (Wagers e cols., 2002; Wehner e cols., 2003; Lepski e cols., não publicado).

É importante observar que o fato de que os únicos resultados eletrofisiológicos demonstrativos de diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais terem sido obtidos em condições de co-cultivo com outros tipos celulares neuronais levanta a questão de que talvez o processo de transdiferenciação nem mesmo ocorra, sendo talvez um erro técnico (Wurmser e Gage, 2002). Se essa idéia for comprovada, o uso de células-tronco adultas para fins restauradores tornar-se-ia inviável. Se descartada, tornaria supérflua a busca por células-tronco embrionárias como alternativa para transplantes.

Concluindo, nota-se que ainda pairam muitas dúvidas a respeito da real capacidade de as células-tronco mesenquimais poderem gerar neurônios maduros. Para se analisar a questão completamente, é necessária a análise conjunta de critérios morfológicos, imunocitoquímicos e eletrofisiológicos, que provem a realidade da transdiferenciação em condições de monocultivo.

2.4.3.2 Estudos *in vivo*

Azizi e cols. (1998) reportaram diferenciação espontânea de células estromais da medula óssea de seres humanos em astrócitos. Estas, uma vez implantadas no corpo estriado de ratos adultos, entretanto, não se transformam em neurônios.

Pouco tempo depois, Mezey e cols. (2000a e b) e Brazelton e cols. (2000) descreveram simultaneamente a aquisição espontânea de antígenos neuronais pelas células da medula óssea infundidas intraperitonealmente em ratos, que haviam migrado para o encéfalo do animal hospedeiro. Os primeiros autores usaram células mesenquimais de roedores machos implantadas em fêmeas com aplasia congênita da medula óssea. Reportaram diferenciação neuronal por meio de marcação imunohistoquímica com NeuN; a confirmação da origem da célula do doador foi feita por hibridização *in situ* do cromossomo Y, técnica essa de difícil execução e que dá margem a muita marcação puntiforme inespecífica, que pode ser erroneamente interpretada como cromossomo Y. Mesmo assim, relataram que 0,3 a 1,8% (a depender da idade do receptor) das células neuronais do prosencéfalo do hospedeiro eram derivadas do doador. No segundo trabalho, os autores valeram-se de ratos transgênicos cujas células expressam constitutivamente proteína verde fluorescente (GFP). Desses animais foram extraídas células estromais da medula óssea que foram implantadas intravenosamente em ratos irradiados, portanto, sem medula óssea viável. Reportaram imunopositividade para NeuN e neurofilamento de alto peso molecular (NF-H), coexpressas com GFP, em diferentes tipos celulares do bulbo olfatório de hospedeiros. Embora a marcação aqui adotada seja mais específica

que a do primeiro grupo, o trabalho carece de confirmação funcional da diferenciação neuronal, por exemplo, por meio de *patch clamp*. No entanto, os trabalhos citados são importantes por acender a possibilidade de que haja transdiferenciação de células-tronco mesenquimais em células de outras origens embrionárias.

Para verificar se o mesmo fenômeno ocorre em seres humanos, Mezey e cols. (2003) estudaram o encéfalo de mulheres previamente submetidas a transplante de medula óssea de doadores do sexo masculino como parte do tratamento para leucemia linfocítica (três casos) ou imunodeficiência congênita (um caso); encontraram proporção de sete neurônios derivados dos doadores para cada 10.000 neurônios próprios. Esse foi o melhor resultado dos casos estudados e refere-se a uma menina de dois anos de idade que sobreviveu durante nove meses após o transplante, o que mostra a raridade da ocorrência espontânea da diferenciação neuronal de células da medula óssea. Vale lembrar que organismos jovens apresentam maior taxa de neurogênese endógena, o que torna o tecido hospedeiro mais propício à diferenciação neuronal. Neurônios e glia assim obtidos são, na verdade, descoberta casual, e não há controle sobre o processo que gerou sua diferenciação. Assim sendo, torna-se imperativo a pesquisa dos fatores que condicionam esse processo, o que só pode ser feito com ensaios *in vitro*, na tentativa de induzir de modo controlado a diferenciação neuronal, provendo-se as bases para terapia neurorestauradora no futuro.

Permanece obscuro, todavia, se a propriedade de transdiferenciação deve-se a um potencial intrínseco das células-tronco estromais, ou se somente é possível devido à fusão com células neuronais maduras presentes no meio de cultivo ou no

órgão receptor. Se a hipótese for verdadeira, resta saber que papel fisiológico desempenham essas células multipotentes no organismo adulto; participariam elas de mecanismos restauradores em condições fisiológicas? É importante ressaltar ainda que outros autores não confirmaram os achados aqui citados (Castro e cols., 2002).

Assim sendo, há muita controvérsia a respeito do real potencial de diferenciação de células mesenquimais. Mais pesquisas são necessárias, sob melhores condições de controle e com melhores marcadores celulares, para que se possa concluir pelo seu real potencial neurorestaurador (Liu e Rao, 2003; Deng e cols., 2006). Pelo que foi exposto, o debate acerca do real potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais ainda é incerto e longe de um desfecho. Tal impasse só pode ser averiguado com precisão em condições de cultivo único das células de interesse, em que não haja a possibilidade de fusão com outros tipos celulares.

3. MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as leis constitucionais e infra-constitucionais dos países onde foram realizados (Alemanha e Brasil), além das normas das Comissões de Ética das referidas Universidades (Albert-Ludwig, Freiburg, Alemanha e Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil), baseadas na Declaração de Helsinque. Quando envolveram procedimentos com animais, necessitaram aprovação por escrito da Comissão, após avaliação dos procedimentos. Quando realizados em seres humanos, envolveram consentimento informado verbal e escrito previamente autorizados pela Comissão, após análise dos procedimentos. No exterior, a doação de material biológico envolveu o pagamento, pela Universidade, de uma soma de 250 Euros a título indenizatório, ordenada pela Comissão. No Brasil, a prática é proibida e os doadores não foram indenizados.

3.1 Obtenção dos tecidos

3.1.1 Punção da medula óssea

Voluntários normais (15) com idades variando entre 20 e 40 anos, normalmente catalogados como doadores regulares no Banco de Sangue do Departamento de Hematologia e Oncologia da Uniclínica, em Freiburg, foram submetidos à anestesia local com lidocaína a 1% e à punção da espinha ilíaca póstero-superior utilizando-se agulha descartável habitualmente utilizada para realização da mielograma. A seguir, foram aspirados 100ml de líquido da medula-óssea, imediatamente diluído em heparina. Como critérios de inclusão estabeleceram-se: idade de 20 a 40 anos, ausência de antecedentes mórbidos, hemograma e coagulograma normais, sorologias negativas para vírus de imunodeficiência adquirida (SIDA), hepatites B ou C, vírus da leucemia de células T humana (HTLV1 e 2) e sífilis.

3.1.2 Obtenção de tecido fetal humano

Coletou-se material encefálico de abortos com coração ainda batendo no momento da extração, durante abortamentos eletivos realizados rotineiramente até a 12ª semana de gestação. Após parada cardíaca espontânea, o encéfalo foi dissecado, as meninges retiradas e parte do material enviada para o laboratório para testes biológicos contra HIV, hepatites A e C, sífilis, HTLV 1 e 2 e micoplasma. Outra parte foi congelada e criopreservada a -80°C para futuros testes, quando necessário. As vesículas telencefálicas, incluindo-se as eminências ganglionares, foram dissecadas em ambiente estéril em capela de fluxo laminar e trituradas com microtesoura em meio de cultivo sem Ca^{2+} e Mg^{2+} .

3.1.3 Obtenção de tecido fetal murino

Fêmeas normais de ratos Sprague-Dowley com 14 dias de gestação, oriundos do Laboratório Charles River, Londres, foram anestesiadas com cetamina e diazepam. As fêmeas foram então sacrificadas e os embriões removidos da cavidade uterina. Após dissecação dos envoltórios em ambiente estéril em capela de fluxo laminar, a proeminência cefálica foi aberta e a vesícula telencefálica contendo as eminências ganglionares removida. As meninges foram então removidas e o tecido triturado com microtesoura em meio de cultivo sem Ca^{2+} e Mg^{2+} .

3.2 Isolamento e expansão de células-tronco

3.2.1 Isolamento das células-tronco mesenquimais

3.2.1.1 Separação das células estromais

Para isolar as células estromais foi seguido o protocolo proposto por Pittenger (1999), descrito a seguir.

O aspirado medular (± 280 milhões/mL, de células nucleadas, segundo Pittenger, 1999) foi diluído em PBS 1:1 (tampão fosfato, Gibco, Karlsruhe, Alemanha), despejado sobre solução de Biocoll® (Biochrom AG, Berlin, Alemanha) com densidade de 1,077g/l, centrifugado durante 25 min a 1500rpm para isolar das células mononucleares (± 100 milhões/ml, de células, 28% do inicial), que foram, a seguir, seletivamente aspiradas, novamente diluídas em PBS e centrifugadas para removê-las da solução hiperdensa, ressuspensas em "*marrow stem cell basal medium*", (MSCBM)® (Cambrex-Poietics Cambrex, Walkersville, USA), contadas e semeadas em frascos T150 à densidade de 100.000 células /cm² no mesmo meio de cultivo, seguindo-se incubação a 5% de CO₂, 37°C e 80% de humidade. O meio foi renovado após 24 horas e, a seguir, a cada 72 horas. Nessa fase, observaram-se

inúmeras células arredondadas pequenas em suspensão, em sua grande maioria correspondendo a células hematopoiéticas maduras. Com esse método, notou-se que, após uma semana, algumas células (estimadas em 0,001% a 0,01% das células mononucleares, ou seja, 1:300.000 das células iniciais, aderiram-se à superfície do frasco de cultivo e assumiram morfologia plana, com soma relativamente grande e alguns prolongamentos não ramificados, com núcleo de cromatina frouxa. Nas três semanas subseqüentes, esse tipo celular (células estromais) passou a predominar no meio de cultivo, em detrimento das células hematopoiéticas, que crescem em suspensão e foram removidas a cada aspiração do meio. Conseguiu-se assim população com homogeneidade de 95% e 98% por ocasião das passagens 1 e 2, respectivamente, e desse modo, na segunda passagem, 5 a 37 milhões de células estromais por ml de aspirado medular.

Assim procedendo, o tempo de duplicação (DT) das células isoladas pode ser quantificado através da fórmula

$$DT = \frac{t}{3,3 \cdot \log\left(\frac{y}{y_0}\right)}, \text{ onde}$$

y_0 = número de células ao início do período considerado

y = número de células ao final do período considerado

t = duração do tempo considerado

3.2.1.2 Purificação das células não-hematopoiéticas

Na tentativa de se verificar quais subtipos celulares na medula óssea seriam capazes de diferenciação neuronal, as amostras recém-extraídas foram submetidas à purificação por imunofluorescência a *laser* das células hematopoiéticas (positivas para CD34 e CD45) e não-hematopoiéticas (duplamente negativas) e, então, colocadas em meio de diferenciação.

Em três experimentos, células mononucleares medulares (após centrifugação por gradiente de densidade) foram submetidas à separação para isolamento das células não-hematopoiéticas, de modo similar ao método de Jiang e cols. (2002), com a diferença de que foram utilizados como marcadores os anticorpos anti-CD34 conjugados com ficoeritina (BD Pharmingen, San Diego, USA), sendo CD34 um marcador de células-tronco hematopoiéticas, e anti-CD45 conjugado com fluoresceína (BD Pharmingen), sendo CD45 um marcador de células hematopoiéticas maduras. Como as hemáceas são eficientemente separadas do restante da amostra por centrifugação, considerou-se o presente método mais fidedigno para o isolamento de células não-hematopoiéticas.

Foram acrescentados 20µL de cada anticorpo para cada milhão de células na amostra contendo aproximadamente 100 milhões de células mononucleares em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) sem vermelho-fenol e 1% de soro fetal bovino. Após 20 minutos de incubação a 4°C, a amostra foi lavada duas vezes em PBS e submetida à separação por *laser* no aparelho Cell Sorter® (Leica

Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Células duplamente negativas foram novamente cultivadas e submetidas à diferenciação para comparação com a amostra não-purificada.

3.2.1.3 Caracterização das células mesenquimais por FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)

Para caracterizar o tipo de população celular isolada, células estromais da medula-óssea foram submetidas à marcação com 12 antígenos de superfície diferentes e contadas por FACS, três semanas após a extração da amostra, portanto, após o isolamento das células estromais aderentes e da expansão clonal *in vitro*.

Foi realizada citometria de fluxo por FACS para caracterizar a expressão dos marcadores de superfície nas células estromais medulares. Para tanto, foram acrescentados anticorpos conjugados a fluoróforo (fluoresceína ou ficoeritina) às amostras de 500µl contendo aproximadamente 100.000 células em PBS, conforme descrição anterior. Os anticorpos utilizados foram anti-CD34, 45, 13, 29, 49d, 49e, 51/61, 105, 90, 44, HLA-classe I e HLA-DR, juntamente com IgG anti-rato conjugada a PE ou FITC para controle negativo. Após sucessivas lavagens, as amostras foram analisadas em hemocitômetro FACS-Scalibur® (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os gráficos são apresentados como densidades de

frequências obtidas das amostras marcadas com os anticorpos de interesse, sobrepostas aos controles negativos apropriados.

3.2.1.4 Comprovação da propriedade troncular das células mesenquimais

Para comprovar que as células isoladas pelos métodos expostos são realmente células-tronco, demonstrou-se que elas mantêm a capacidade de auto-regeneração, mantendo-se no ciclo replicativo sem, no entanto, perderem suas características iniciais. Paralelamente, demonstrou-se a capacidade de gerar tipos celulares maduros de diferentes origens.

Para tanto, analisou-se o contingente de células em fase de replicação pelo ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), análogo da timidina, que é incorporado ao DNA durante a fase de síntese (S) do ciclo de divisão celular. Portanto, as células que estavam em fase S durante a exposição ao BrdU tornaram-se passíveis de identificação imunocitoquímica ulterior. De acordo com este protocolo, o BrdU (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) a 10uM foi acrescentado ao meio de cultivo e mantido durante seis horas antes da fixação com paraformaldeído a 4% durante 30 a 40 minutos. Após sucessivas lavagens, foi acrescentado ácido clorídrico a 2N às placas para desnaturar o DNA. Ulteriormente, o ácido foi neutralizado com solução tampão de borato com pH 8,5. A seguir, foi realizada incubação em solução bloqueadora contendo 0,1% de Triton-X100, 4% de soro fetal de cabrito e PBS.

Anticorpo primário anti-BrdU de rato (Oxford Biotechnology, 1:200, Oxford, Reino Unido) foi acrescentado para marcação primária. Para marcação secundária foi utilizado Alexa Fluor 488 ou 568 anti-rato (Molecular Probes, Karlsruhe, Alemanha) durante uma hora à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens em PBS, Tween a 0,001% e Na-ácido a 0,05%, as lamínulas foram analisadas sob microscopia confocal de fluorescência a *laser*.

Para se avaliar o caráter das células-tronco da população isolada, reportou-se sua diferenciação a condrócitos e osteócitos (Mehlhorn e cols., 2005). Para tanto, as células isoladas foram cultivadas em TGF β durante uma semana e coradas para colágeno tipo II, para confirmar a diferenciação condrocítica, ou tratada com a reação de von Kossa, para confirmar a diferenciação osteocítica.

3.2.2 Isolamento e expansão das células-tronco neurais humanas e murinas

Para isolar e expandir as células-tronco neurais obtidas de fetos humanos e de roedores foi adaptado o método descrito por Svendsen (1998), baseado na formação de neuroesferas, que nada mais são que agregados de células em suspensão formadas por expansão clonal de células progenitoras e fusão de agregados menores.

Para tanto, o tecido inicialmente obtido pela dissecação dos embriões foi enzimaticamente dissociado com tripsina 0,1% (Worthington, Lakewood, NJ, EUA) durante 20 minutos a 37°C e DNase 0,05% (Worthington, Lakewood, NJ, EUA)

durante mais 10 minutos a 37°C. Ulteriormente, a trituração mecânica com micropipeta permitiu a obtenção de suspensão de células únicas. A seguir, o material obtido foi cultivado a 37°C à tensão parcial de 21% de O₂, 5% de CO₂ e 80% de humidade em meio contendo DMEM:F12, 1% de suplemento B27 e 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina (todos da Gibco), complementados com 20ng/mL de EGF (Peprotech, Londres, Reino Unido), 20ng/mL de bFGF (Sigma) e 5ug/mL de heparina (Sigma). O meio foi trocado duas vezes por semana e foram realizadas passagens com trituração por método de *chopping* uma vez por semana. Após duas semanas de cultivo, puderam-se observar agregados celulares com cerca de 500µm de diâmetro, compostos por células imaturas em rápida expansão, as neuroesferas.

3.3 Protocolos de diferenciação neuronal

3.3.1 Pré-diferenciação das células-tronco mesenquimais

Para indução de diferenciação neuronal utilizou-se meio básico composto por DMEM:F12, suplemento B27 a 1%, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina, acrescidos de 20ng/ml de bFGF e

20ng/ml de EGF. Para tanto, foram tripsinizadas as células estomais aderentes, que a seguir, foram re-suspendidas e semeadas em placas com 75cm² de superfície, não-revestidas. Após uma semana, pôde-se observar a formação de estruturas esferóides que lembravam neuroesferas, conforme descrito por Kabos (2002). A diferentes intervalos de tempo, as esferas formadas foram dissociadas, contadas e plaqueadas a 10.000 células/cm² em placas 24 *wells* (Becton Dickinson) previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma).

3.3.2 Diferenciação neuronal das células-tronco mesenquimais

Como meio de diferenciação neuronal foram testados separadamente ou em combinação as seguintes substâncias: 20 a 100ng/ml de bFGF (Sigma), 100ng/mL de FGF8, 100ng/mL de SHH, 50ng/ml de BDNF (todos da R&D Systems, Minneapolis, EUA), 1mM de dibutilil-AMPc, 0,5mM de iso-butil-metil-xantina, IBMX, 10μM de forskolina, 200μM de butiril-hidroxi-anisole, BHA, 10mM de β-mercaptoetanol, 2% de dimetilsulfóxido, DMSO, e 1μM de ácido retinóico (todos da Sigma).

Para se verificar qual o tipo celular ideal mais susceptível à transdiferenciação, foram semeadas em trélicas células estomais logo após o isolamento ou após a pré-indução em meio contendo bFGF e EGF (na forma de esferas).

Para se verificar a densidade ideal das células no processo de diferenciação neuronal, foram semeadas em outra série de experimentos células a 5.000/cm², 10.000/cm², 15.000/cm² e 20.000/cm².

Para se verificar o revestimento de placa ideal para a diferenciação neuronal, células foram plaqueadas sobre fibronectina (Chemicon, Temecula, Canadá), poli-L-ornitina ou poli-L-lisina (ambos da Sigma).

Com o intuito de se diminuir o estresse oxidativo, foram incubadas células em meio a 3% de O₂ contendo 100μM de ácido ascórbico (Sigma).

No total, tentaram-se mais de 500 combinações diferentes de cada um dos parâmetros relatados previamente, distribuídos em 62 experimentos durante dois anos de pesquisa. Após vários testes, pôde-se observar que as condições que continham IBMX (inibidora da fosfodiesterase), forskolina (ativadora da adenilato-ciclase) ou AMPc induziam diferenciação neuronal. Todas essas substâncias aumentam direta ou indiretamente a concentração intracelular de cAMP. Por esse motivo, foram finalmente comparadas as culturas com diferentes combinações dessas substâncias, acrescidas ou não de BDNF. Selecionou-se como meio básico, a combinação de meio α-MEM (Sigma), 200mM de L-glutamina, 0,1% de glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1% de PSA (Gibco) e 2% de suplemento sérico (Gibco). Células mesenquimais foram expandidas durante períodos de 5 a 100 passagens, perfazendo o mínimo de cinco semanas e o máximo de 2 anos e, a seguir, plaqueadas em placas com 24 orifícios previamente revestidas com poli-L-ornitina (Sigma) ou fibronectina humana (Sigma) a 10.000/cm².

Após definição do protocolo ideal de diferenciação neuronal, procurou-se bloquear o processo com diferentes reagentes, como tentativa de se elucidar os mecanismos envolvidos na transdiferenciação de células mesenquimais a neurônios. Primeiramente, utilizaram-se 3,5nM de PKA-*inhibitor fragment*, (Sigma), um inibidor de fosfocinase A. Ulteriormente, baseando-se em outras observações experimentais, onde se notou a importância dos canais de Ca^{2+} do tipo L para a diferenciação neuronal de células-tronco fetais, optou-se por bloqueá-los com 50 μM de Cd^{2+} (bloqueador inespecífico de todos os tipos de canais de Ca^{2+} -dependentes de voltagem), 50 μM de Ni^{2+} (bloqueador preferencial de canais de Ca^{2+} do tipo T, *tiny current*, classe LVA- *low voltage activated*) e 5 μM de nifedipina (Sigma) (bloqueador específico de canais de Ca^{2+} tipo L- *large current*, classe HVA- *high voltage activated*).

3.3.3 Diferenciação neuronal de células-tronco neurais humanas e murinas

Para diferenciação neuronal das neuroesferas extraídas de encéfalos humanos ou de roedores, as neuroesferas expandidas por longo período (mínimo de três meses, cinco a vinte passagens) foram plaqueadas a 10.000cél./cm² em placas com 24 orifícios previamente revestidas com poli-L-ornitina (Sigma) ou fibronectina humana (Sigma), em meio contendo α -MEM (Sigma), 200Mm de L-glutamina, 0,1% de glicose (Merck), 1% de PSA (Gibco), 2% de suplemento sérico (Gibco) e 0,5mM

iso-butil-metil-xantina (IBMX, Sigma). Seguiu-se incubação durante uma a duas semanas nos casos de células de roedores e durante uma a seis semanas no caso de células humanas.

3.4 Marcação imunocitoquímica

Para marcação imunocitoquímica, fixaram-se as culturas com paraformaldeído a 4% durante uma hora. Após sucessivas lavagens em PBS, as mesmas foram incubadas em solução bloqueadora contendo 4% de soro de cabrito e 0,1% de Triton X-100 em PBS durante uma hora à temperatura ambiente e, a seguir, em solução com anticorpos primários diluídos em 4% de soro de cabrito, 0,1% de Triton X-100 e PBS. Seguiu-se lavagem em PBS, incubação durante uma hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína (AlexaFluor 488 ou AlexaFluor 568, Molecular Probes, Karlsruhe, Alemanha) e DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido, 1:10000, Sigma, para marcação nuclear) diluídos em 4% de soro de cabrito, 0,1% de Triton X-100 e PBS. Finalmente, as lamínulas com células foram lavadas sucessivamente em PBS, Tween a 0,001%, água destilada e solução de Na-ácido a 0,05% para conservação. Lamínulas foram então transferidas para lâminas e revestidas com solução *antifade* da DAKO (Glostrup, Dinamarca) para prolongamento da reação fluorescente. Os anticorpos utilizados estão apresentados na tabela 1.

Os testes de especificidade da reação de imunofluorescência foram realizados com células estromais anteriormente à indução da diferenciação, nas mesmas diluições usadas para as marcações.

Tabela 1. Relação do tipo celular marcado, natureza do anticorpo, companhia fornecedora, hospedeiro e concentração dos anticorpos utilizados nos experimentos

Tipo celular marcado	anticorpo	fornecedor	hospedeiro	concentração
Célula-tronco neural	nestina	Chemicon	camundongo	1:200
		Chemicon	coelho	1:200
	PSA-NCAM	Chemicon	camundongo	1:200
	SOX 2	Sigma	camundongo	1:100
Glia ou célula-tronco neural	GFAP	DAKO	coelho	1:600
Neurônio imaturo	β III tubulina	Sigma	camundongo	1:400
		Covance	coelho	1:600
	MAP 2 abc	Chemicon	coelho	1:200
			porco da índia	
Neurônio maduro	Dcx	Santa Cruz		1:3000
	NF-M	Chemicon	coelho	1:2000
	MAP 2 ab	Chemicon	camundongo	1:200
	Tau	Abcam	camundongo	1:50
	NF 200	Chemicon	camundongo	1:200
	NeuN	Chemicon	camundongo	1:50
	NF-M	Chemicon	camundongo	1:50
	GABA	Chemicon	coelho	1:1000
	Tirosina-hidroxilase	Covance	coelho	1:1000
	GAD-65/67	Chemicon	coelho	1:1000
	glutamato	Chemicon	camundongo	1:5000
	DAT	Chemicon	rato	1:5000
	NeuroD	Chemicon	coelho	1:1000
	Nurr1	Santa Cruz	coelho	1:200
Núcleo humano mesênquima	núcleo humano	Chemicon	camundongo	1:500
	vimentina	Chemicon	camundongo	1:1000
	fibroblasto humano	Chemicon	camundongo	1:200
Células em divisão	BrdU	Oxford	rato	1:200

3.5 Contagem celular e microscopia confocal

As células foram fixadas em lamínulas e contadas no microscópio de fluorescência. Analisaram-se dez campos visuais (ou mais, quando o número de células marcadas foi menor que 100), em três lamínulas diferentes e em três experimentos consecutivos, cada um com células de um doador diferente. As contagens foram realizadas de acordo com o método duplamente encoberto, ou seja, o pesquisador que realizou a contagem não conhecia as marcações utilizadas e as condições experimentais. A percentagem de células marcadas foi então determinada com base no número total de células (contado com o marcador nuclear DAPI). Os dados foram apresentados com a variação de erro-padrão. Foram realizadas fotografias em microscópio confocal de fluorescência a *laser* SMP2 Leica® com *laser* diodo de 405nm, Ar-Kr 488nm, Ar 594 e Xn633. As imagens foram adquiridas sob *airy-unit* 1, garantindo confocalidade máxima com regulagem variável do *pinhole*. Foram digitalizadas a 2048 por 2048 *pixels* e gravadas em formato “tif” para ulterior compilação no programa Adobe-Photoshop 6.2.

Paralelamente à contagem do número de células neuronais positivas para cada condição de cultivo, procurou-se medir a quantidade expressa de determinados marcadores antes e depois da diferenciação celular. Para tanto, foram selecionadas duas áreas de interesse em dez fotografias de 750 por 750 μm para cada condição experimental, para se mensurar o sinal de fluorescência da reação imunocitoquímica. Uma área de interesse englobou todo o campo visual, e outra, uma área sem sinal

para mensuração do sinal de fundo. A seguir, o valor da fluorescência absoluta em cada fotografia foi fornecido pelo programa de computação numa escala entre 1 e 255. Determinou-se assim o contraste entre a área fotografada e o fundo, relativizado pelo valor da fluorescência total ($\Delta F/F$). Foram assim mensuradas as fluorescências relativas antes e depois da diferenciação celular para diferentes marcadores neuronais, como, nestina, MAP2ab, MAP2abc, NF-M, NF-200, β III tubulina, NeuN e NeuroD. Para saber-se se a ativação da via PKA culminou com a fosforilação de *cAMP-response element binding protein (CREB)*, que é um fator de transcrição envolvido na neurogênese fisiológica, mediu-se a fluorescência para CREB fosforilado na cultura fixada após cultivo em meio básico (não diferenciada) e em meio contendo IBMX (diferenciada).

3.6 Avaliação de morte e viabilidade celular

Para se determinar se a diferenciação de células mesenquimais foi evento permanente ou transitório, culturas em meio de diferenciação foram fixadas e coradas com NF200 a 12, 24, 36 e 60 horas após a incubação. Foi realizada a determinação da porcentagem de células positivas para NF200, conforme já exposto. Adicionalmente, foi estudada a viabilidade das células com o marcador de ácido nucléico verde fluorescente SYTO 10 (*Cell Viability Kit®*, Molecular Probes), marcador altamente permeável que cora todas as células vivas em verde, e etídio-

homodímero 2, que, analogamente ao etídio-bromídeo, representa um marcador vermelho fluorescente de ácido nucléico altamente impermeável a membranas celulares, ou seja, cora somente os núcleos das células em processo de degeneração, cujas membranas estejam lesadas.

3.7 Eletrofisiologia

Com o intuito de caracterizar as células em diferenciação do ponto de vista funcional, registrou-se sua atividade elétrica por meio da técnica de *patch clamp*. Para tanto, as células foram cultivadas em meio contendo bFGF e EGF e, ulteriormente, em IBMX até ocorrer diferenciação completa, para, então, serem transportadas para a unidade de registro eletrofisiológico.

Foram transferidas laminulas com as culturas para câmara de registro em diferentes estágios do desenvolvimento durante a diferenciação celular. A cultura foi continuamente perfundida com fluxo de 5 a 10mL/min (volume da câmara ~2mL) em solução salina fisiológica. A solução salina continha, em mM, 125 de NaCl, 25 de NaHCO₃, 2,5 de KCl, 1,25 de NaH₂PO₄, 25 de Glicose, 2 de CaCl₂, and 1 de MgCl₂ (equilibrados com 95% de O₂ e 5% de CO₂). As células neuronais foram identificadas de acordo com sua morfologia em videomicroscopia por contraste de fase ou contraste interferencial diferencial, o que ulteriormente foi confirmado pela expressão dos marcadores neuronais MAP2ab ou NF200. Foram confeccionadas

pipetas de vidro borossilicato tubular (diâmetro externo de 2mm, diâmetro interno de 1mm, Hilgenberg, Malsfeld, Alemanha) em aparelho Sutter P97 (Sutter Instruments, Novato, CA, EUA), que foram polidas com calor imediatamente antes do uso para realizar o registro. Foi utilizado amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). Os traçados de *current clamp* (*i-clamp fast*) para registros de voltagem e *voltage clamp* para registro de correntes foram filtrados a 5-10 KHz com filtro Bessel de 4 polos, e digitalizadas a 10 ou 20 KHz por meio de interface 1401plus (CED, Cambridge, Reino Unido) conectada a um computador pessoal. A frequência da amostragem foi duas a quatro vezes maior que a frequência da filtragem. Para aquisição dos dados e análise ulterior foram usados programas de computador desenvolvidos no Instituto de Fisiologia I da Universidade de Freiburg (Alemanha), como o FPulse, além de programas comerciais (EPC e CED, Cambridge, Reino Unido). Durante o período de registro, as células mensuradas foram preenchidas com 1mg/mL de biocitina durante uma hora (Molecular Probes) para identificação posterior por imunofluorescência

Para registrar a voltagem em *current clamp*, usaram-se pipetas de 5 a 10 M Ω preenchidas com solução intracelular que compreendia, em mM, 120 de K-gluconato, 20 de KCl, 10 de EGTA, 2 de MgCl₂, 2 de NA₂ATP e 10 de HEPES (o pH foi ajustado a 7,3 com KOH). Foi usado balanço de ponte para compensar a resistência em série de 20-40 M Ω . Adicionalmente, foi usada compensação da capacitância para reduzir o período de carregamento da pipeta para menos de 50 μ s. O potencial de clampeamento foi fixado em -80mV aplicando-se pequena corrente hiperpolarizante, caso necessário.

Para registrar as correntes, em *voltage clamp*, as pipetas foram preenchidas com solução intracelular contendo, em mM, 140 de KCl, 10 de EGTA, 2 de MgCl₂, 2 de Na₂ATP e 10 de Hepes (o pH foi ajustado a 7,3 com KOH). A solução salina extracelular continha, em mM, 105 de NaCl, 25 de NaHCO₃, 25 de glicose, 2,5 de KCl, 1,25 de NaH₂PO₄, 2 de CaCl₂ e 1 de MgCl₂. A resistência das pipetas foi de 3 a 5 MΩ. Foi usado balanço em ponte para compensar a resistência em série, que variou de 10 a 20 MΩ (80-90%, *lag* 20 μs). Assumindo a variação da capacitância de membrana da ordem de 5 a 10pF, essas configurações permitiram constante de tempo de clampeamento de voltagem da ordem de 50 a 200μs a partir da equação:

$$\tau = R_s C_m \quad (1) ,$$

onde τ é a constante de tempo, ou seja, tempo para o decaimento a 1/e do valor original; R_s representa a resistência em série e C_m , a capacitância da membrana.

O potencial de clampeamento foi fixado em -80mV. Foram subtraídas correntes capacitivas e de escape usando algoritmo matemático P/-8, que, basicamente consistiu em se aplicar 8 pulsos de 1/8 da voltagem do pulso teste, mas com sinal contrário, evitando-se assim a ativação de canais I_h . Todos os experimentos foram realizados a 22°C. Traços de corrente mostrados nas figuras representam médias de 3 a 5 *sweeps*.

Para se registrar correntes sinápticas, a região onde encontravam-se as células clampeadas foi estimulada com microeletrodo externo bipolar a pulsos breves de 400 ms e intensidades de 1 a 10V (5 estímulos a 12,5 Hz repetidos 20 vezes a 1,3 Hz) . Para a correta identificação das correntes, foram adicionados à solução de perfusão 10μM de bicuculina e 10μM de 6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-

diona (CNQX), visando a bloquear a transmissão GABAérgica e glutamatérgica, respectivamente.

Foi determinada a resistência de entrada a partir dos registros de corrente, por meio de pulsos hiperpolarizantes de 10ms, repetidos 50 vezes para promediação, em modo *voltage clamp*. Foi analisada, por regressão linear logarítmica, a curva de decaimento da média dos 50 traçados para se determinar a constante de tempo da membrana. Foram determinadas correntes de pico pela média de 5 pontos para Na⁺ e 100 para K⁺, nos pontos mínimos e máximos dos traçados da corrente, respectivamente. Foram calculadas densidades de corrente, valores que remetem à densidade de canais expressos na membrana celular, dividindo-se as correntes de pico pela capacitância da célula, essa determinada a partir da equação 1. As correntes sinápticas evocadas foram promediadas e subtraídas dos traçados obtidos sob bloqueio farmacológico dos neurotransmissores (com bicuculina ou CNQX), para reduzir o artefato de estimulação.

A curva de ativação da condutância ao K⁺ foi sobreposta ao modelo teórico derivado da equação de Boltzmann (Martina, 1998):

$$g(v) = \frac{g_{m\acute{a}x}}{1 + e^{\frac{(V_{1/2} - V)}{k}}} \quad (2),$$

sendo $g_{m\acute{a}x}$, o parâmetro representado pelo valor máximo da condutância, $V_{1/2}$, a voltagem correspondente à máxima ativação (pico da primeira derivada da função original), V , a voltagem do pulso e k , o fator de inclinação.

Para análise da ativação das correntes de Na⁺, os gráficos de corrente em função do pulso de voltagem foram sobrepostos ao modelo teórico derivado da

equação de Boltzmann multiplicada pela equação de Nernst, segundo Bischofberger (2002), resultando:

$$I(V) = \frac{I_{\min Na} (V - E_{Na})}{1 + e^{\frac{(V_{1/2} - V)}{k}}} \quad (3),$$

sendo $I_{\min Na}$, o parâmetro relacionado à corrente mínima de Na^+ , V , a voltagem do pulso, E_{Na} , o potencial de reversão para o Na^+ calculado a partir da equação de Nernst (vide equação 4), e os demais parâmetros iguais aos da equação (2).

$$E_{ion} = \frac{RT}{ZF} \log \frac{[ion]_{fora}}{[ion]_{dentro}} \quad (4)$$

onde R , é a constante de Boltzmann, T , a temperatura em Kelvin, Z , a valência do íon e F , a constante de Faraday.

3.8 Análise estatística

Para análise estatística foram calculadas as medidas-resumo dos dados iniciais por métodos convencionais (média, mediana, quartis, desvios-padrão e erros-padrão). Gráficos de perfis médios são mostrados para ilustrar as diferenças entre os grupos, sendo que as barras representam o erro padrão, que ressalta a precisão das medidas. Analisou-se, a seguir, a distribuição dos resíduos dos diferentes grupos experimentais

(as diferenças entre cada medida e a média do respectivo grupo) por meio de gráficos QQ. Por essa análise, avaliou-se se os dados tinham distribuição normal, o que permitiu o ajuste do modelo de distribuição e a escolha do teste estatístico mais adequado. Para contagem das células positivas para NF-200, usou-se a transformação logarítmica dos dados para proceder à análise de variância (ANOVA) com teste *post hoc* pareado Newman-Keuls e Dunnett (contra controle). Para as comparações entre grupos com distribuição normal, utilizaram-se os dados originais e o ANOVA. Para a análise da especificidade da marcação imunocitoquímica com NF-200, estudou-se a correlação entre a morfologia neuronal típica e a positividade para o marcador por meio do coeficiente de correlação de Spearman, que diferentemente do coeficiente de Pearson aplica-se a dados de distribuição desconhecida. Para análise dos dados eletrofisiológicos que não obedecem a distribuição conhecida, lançou-se mão do teste não-paramétrico Mann-Whitney U.

Os valores de significância foram representados por asteriscos, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os testes foram realizados com programas de computador JMP IN 5.1 (SAS Institute, Cary, EUA) e os gráficos realizados com o programa Igor 5.04 (Wavemetrics, Portland, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das células-tronco estromais

4.1.1 Isolamento das células estromais

Observou-se inicialmente no material aspirado da crista ilíaca processado e semeado predominância de células pequenas arredondadas e muito densas, não aderidas ao frasco de cultivo. Após uma semana, algumas poucas células passaram a aderir à superfície do frasco de cultivo. A cada troca de meio, células em suspensão, em sua maioria hematopoiéticas maduras ou precursores hematopoiéticos, iam sendo removidas do sistema. Aos poucos, as células remanescentes e aderentes, foram predominando e mudando sua morfologia, a ponto que, após três a quatro semanas, notou-se morfologia típica de células estromais medulares, com citoplasma extenso e achatado, um a dois prolongamentos não-ramificados e núcleo de cromatina frouxa (Figura 1). A duração do tempo de duplicação foi $121 \text{ h} \pm 9$ em três experimentos consecutivos (media $\pm$ erro padrão), na fase exponencial.

Figura.1 Caracterização das células estromais por imunofluorescência. A. Fotografia de contraste de fase de cultura de células estromais após 3 semanas em meio MSCBM. Note-se a típica morfologia alongada com alguns prolongamentos longos não-ramificados e soma plano com núcleo de cromatina frouxa. Ampliação 20x. B. Marcação com anticorpo anti-fibroblasto humano revelado com Alexa Fluor 568. 20x. C. Mesma cultura e mesmo aumento que em B, porém com marcação anti-vimentina, que marca todo o citoplasma. D, Note-se preferencial marcação peri-nuclear (ampliação de B). 40x

4.1.2 Purificação das células não-hematopoiéticas

O processo de purificação das células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas transcorreu sem problemas em três experimentos consecutivos, com células de três

doadores (Figura 2). As células foram, a seguir, submetidas ao protocolo de diferenciação já mencionado.

Figura 2. Purificação a *laser* das células mesenquimais em aparelho *Cell sorter* Leica acoplado a aparelho de FACS. Análise de 35000 eventos. Cada ponto representa uma célula. Em A, nas ordenadas representa-se o tamanho, nas abscissas a granularidade. Em B, representa-se a mesma amostra; a distribuição linear indica que não há agregados celulares. Em C, nas ordenadas, representa-se a intensidade da fluorescência para CD34 conjugado à ficoeritina e nas abscissas, fluorescência para CD45 conjugado a fluoresceína. A população assinalada como R3 representa células duplamente negativas, que são supostamente células-tronco não-hematopoiéticas (8,44% no caso). A população R4 é duplamente positiva e representa células-tronco hematopoiéticas (14,02% no caso).

As células hematopoiéticas, no entanto, não sobreviveram ao cultivo, ao passo que as células não-hematopoiéticas desenvolveram-se do mesmo modo que células não-selecionadas, ou seja, foram capazes de originar células neuronais segundo o protocolo mostrados adiante.

4.1.3 Caracterização por FACS

Da figura 3 depende-se que as células da medula óssea isoladas como já exposto e não-selecionadas expressam em sua superfície HLA-classe I, CD13, 29, 44, 49d e 49e, 90, 105, além de baixos níveis do complexo CD51-61, mas não

expressam CD34, 45 e HLA-DR. A marcação positiva para CD13, 29 e 90 indica a origem medular das células. CD 44 e 105 são, por sua vez, membros da família das β -integrinas e, portanto, responsáveis pela adesividade à fibronectina e às moléculas apolares dos frascos de cultivo. A negatividade para CD34 (marcador de células-tronco hematopoiéticas) e CD45 (marcador de células hematopoiéticas maduras) indica que a população isolada é de células não-hematopoiéticas, o que a própria morfologia já indicava.

Concluiu-se que, após o isolamento por aderência, selecionou-se uma população negativa para CD34 e 45, e que, portanto, pode-se prescindir da fase de purificação a *laser* das células não-hematopoiéticas descrita na seção anterior. Finalmente, pôde-se concluir que se isolou população homogênea de células-tronco medulares estromais, não-hematopoiéticas, com padrão fenotípico semelhante ao que foi encontrado por Pittenger (1999) por ocasião da descrição de células multipotentes na medula-óssea de seres humanos.

Figura 3. Caracterização das células estromais por FACS. Análise de 100.000 pontos por marcador, cada ponto representa uma célula. As linhas claras representam controle negativo da reação de fluorescência, enquanto as linhas escuras preenchidas representam a contagem das células positivas para cada um dos 12 diferentes marcadores de superfície. A análise demonstra que, após 3 semanas, todas as células cultivadas nessas condições tornaram-se negativas para CD34 e 45, e portanto, não se trata de células hematopoiéticas. Paralelamente, nota-se forte positividade para HLA-classe I, CD13, 29, 44, 49d e 49e, 90, 105, e fraca positividade para CD51-61.

4.1.4 Incorporação de BrdU e diferenciação a múltiplas linhagens

Para se argumentar que foi isolada população de células-tronco da medula óssea, não basta o isolamento de uma população supostamente semelhante a células-tronco mesenquimais descritas por outros autores. É necessário provar que essas células têm capacidade de auto-renovação e que podem gerar tipos celulares maduros

de diferentes linhagens. O ensaio de incorporação de BrdU demonstrou capacidade de auto-renovação ao se verificar que $98,7 \pm 0,4\%$ das células estromais incorporaram BrdU durante as seis horas de exposição e que, portanto, encontravam-se em fase S do ciclo celular. Isso evidencia seu alto potencial replicativo (Figura 4).

Figura 4. Propriedade de auto-renovação das células estromais. Em A, após 6 horas de incubação com BrdU, as células foram fixadas e coradas para vimentina, em vermelho, que é expressada em todas as células estromais, e BrdU em verde, incorporado somente pelas células em fase S do ciclo celular. A contagem em microscopia confocal revelou que $98,7 \pm 0,4\%$ das células incorporaram BrdU, o que denotou alto contingente de células em replicação. Em B, coloração em vermelho para vimentina, onde se observa a morfologia típica das células-tronco estromais após o isolamento. Vermelho representa AlexaFluor 594, ao passo que verde representa AlexaFluor 488, e azul, DAPI. Barra de escala, 50 μ m.

Notou-se diferenciação condrocítica em significativo contingente das células após a exposição ao TGF β durante sete dias, e diferenciação osteocítica em condições semelhantes, porém a alta densidade (Mehlhorn e cols., 2005). Concluiu-se portanto, que isolou-se população de células capazes de se auto-renovarem e de gerar células maduras de diferentes tecidos, o que as habilita como células-tronco.

Figura 5. Diferenciação condrocítica de células-tronco mesenquimais. Fotografia de microscopia confocal a *laser* de células-tronco estromais. Em A, as células foram cultivadas em meio controle sem citocinas e coradas para colágeno II em verde e DAPI em azul para evidênciação dos núcleos. Em B, células foram cultivadas durante uma semana em meio contendo TGF β . Reação imunocitoquímica para colágeno do tipo II demonstrou diferenciação condrocítica. Verde representa Alexa 488, azul representa DAPI. Aumento 20x

4.2 Análise imunocitoquímica da diferenciação neuronal

4.2.1 Pré-diferenciação neuronal (indução)

Tendo em vista que o bFGF e o EGF são os principais fatores neurotróficos responsáveis pela expansão de precursores neurais, foi testada a hipótese de que esses fatores também seriam importantes para a indução do fenótipo neural em células-tronco mesenquimais. Após uma a quatro semanas em meio contendo bFGF e EGF, as células passaram a formar grupamentos que, nos dias subseqüentes, cresceram por expansão clonal, formando esferas que em muito

assemelhavam-se às neuro-esferas descritas para células-tronco neurais derivadas de fetos (Kabos, 2002). Após período de uma a quatro semanas, as esferas foram fixadas e coradas por imunocitoquímica. A marcação imunocitoquímica das células estromais após indução com bFGF e EGF durante uma semana revelou positividade para SOX2, um fator de transcrição expresso em células-tronco neurais, PSA-NCAM, molécula de adesão expressa em precursores neuronais, nestina, neurofilamento intermediário expresso em células-tronco neurais e precursores neuroepiteliais, GFAP, proteína glial fibrilar acídica, coexpressa junto com nestina em células-tronco neurais, β III tubulina, proteína do citoesqueleto expressa em neurônios jovens e maduros, e vimentina, expressa em tecido mesenquimal, do modo como mostrado na Figura 6. Controles de imunocitoquímica realizados com células em meio básico revelou fraca positividade para nestina, forte positividade para vimentina (origem mesenquimal) e negatividade para todos os outros marcadores.

Figura 6. Expansão clonal de precursores neuronais derivados de células mesenquimais. Quando cultivadas durante pelo menos 1 semana em meio contendo bFGF e EGF, formam-se agregados celulares com forma de esferas, que revelaram-se positivos para SOX2, PSA-NCAM, nestina, β III tubulina (Tuj1), GFAP e vimentina. Verde representa Alexa 488, vermelho Alexa 594, e azul DAPI. Barras de escala, 40 μ m.

Demonstrou-se, portanto, a expressão de proteínas típicas de células neurogliais, induzidas por bFGF e EGF, visto que o cultivo sem os mencionados fatores promoveu manutenção do fenótipo estromal com marcação imunocitoquímica negativa. A permanência de vimentina indicou que não ocorreu perda da identidade estromal, possivelmente porque o processo de diferenciação é gradativo e paulatino. A co-ocorrência de GFAP e PSA-NCAM ou GFAP e SOX2 indicou

que as células em questão são neste estágio, em sua maioria, precursores neurogliais, e não precursores neuronais, ou seja, representam verdadeiras células-tronco neurais.

Nas mesmas culturas descritas, algumas células isoladas aderiram-se às lamínulas de cultivo e prestaram-se, assim, a estudos morfológicos mais detalhados (Figura 7). Comparando-se a Figura 7 com a Figura 1, nota-se que o soma passou da morfologia alongada para a piramidal. Se, previamente, a célula apresentava no máximo dois prolongamentos diametralmente opostos, nessa fase passa a apresentar três ou quatro prolongamentos não-ramificados. Notaram-se dilatações terminais denominadas cones de crescimento (assinalados com setas), de onde emergem posteriormente prolongamentos mais longos. Observou-se também positividade para vimentina, GFAP, β III tubulina, nestina, PSA-NCAM, SOX 2 e NF M. É importante ressaltar que, nessa fase, não foi observada positividade para MAP2ab, NeuN, Tau e NF200.

Figura 7. Análise morfológica de precursores neurais derivados de células mesenquimais. Células-tronco mesenquimais foram isoladas e cultivadas por 1 semana em presença de bFGF e EGF. Duas horas após o plaqueamento, as lamínulas foram fixadas e coradas por técnicas de imunocitoquímica. As imagens foram obtidas em microscópio confocal de fluorescência a *laser*. Notou-se positividade para vimentina, GFAP, β III tubulina, nestina, PSA-NCAM, SOX 2 e NF M. Notou-se que o soma apresenta forma piramidal com três ou quatro prolongamentos não ramificados e, em suas extremidades, cones de crescimento (assinalados com setas). Verde representa Alexa 488, vermelho Alexa 594, e azul DAPI. Barras de escala, 40 μ m.

Estes achados significam que as células estromais foram induzidas a expressar diversas proteínas neuro-gliais, além de acumularem sensíveis alterações morfológicas caracterizadas por soma bipolar ou tripolar estrelado e algumas ramificações finas e curtas. É interessante notar-se que o MAP2ab, bem como outros marcadores de neurônios maduros (Tau, Neurofilamento 200), foram negativos nessa fase.

A quantificação celular nesta fase (Figura 8) demonstrou que 97,6% das células foram positivas para nestina e 92,5% para β III tubulina, o que indica que são, em sua grande maioria, precursoras neurais.

Figura 8. Determinação da proporção de células nestina-positivas. Células-tronco mesenquimais foram isoladas e cultivadas por 1 semana em presença de bFGF e EGF. Duas horas após o plaqueamento, as lamínulas foram fixadas e coradas por técnicas de imunocitoquímica. As imagens foram obtidas em microscópio confocal de fluorescência a laser. Aumento 10x. Quantificou-se a seguir a porcentagem de células positivas para nestina e β III tubulina. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro-padrão de três experimentos consecutivos com células de três doadores, cinco campos visuais de três lamínulas para cada doador. Verde representa Alexa 488, vermelho Alexa 594, e azul DAPI.

O cultivo alternativo em meio contendo EGF e PDGF-BB, como proposto por Jiang e cols. (2002), não proporcionou os mesmos resultados, pois a mortalidade celular foi elevada e o crescimento bem menos pronunciado, possivelmente devido à baixa expressão de receptores para PDGF.

4.2.2 Diferenciação neuronal tardia

4.2.2.1 Estudo dos marcadores neuronais

As células pré-diferenciadas durante uma semana em meio contendo bFGF e EGF foram cultivadas em meio contendo IBMX durante três dias, após o que, as culturas foram fixadas e processadas por imunocitoquímica, evidenciando-se positividade para MAP2ab, NeuN, β III tubulina e NF M (Figura 9).

Figura 9. Expressão de diversos marcadores neuronais em células estromais diferenciadas. Microscopia confocal de células estromais medulares pré-diferenciadas em bFGF e EGF durante uma semana e, a seguir, diferenciadas durante três dias em IBMX antes da fixação e coloração imunocitoquímica. Observou-se positividade para MAP2ab, NeuN, β III tubulina e NF M. Notou-se inespecificidade de alguns marcadores, que chegam também a ser expressos em células sem morfologia neuronal típica. Verde representa Alexa 488, vermelho Alexa 594, e azul DAPI. Barras de escala, 50 μ m.

Comparando-se a Figura 9 com as Figuras 1 e 7, observou-se que as células passam a apresentar *somata* de pequenas dimensões, e projetam, nessa fase, prolongamentos mais longos e ramificados, diferentemente do ocorrido em outros estágios. A osmolaridade do meio de cultivo não se alterou significativamente (292 ± 2 mOsm em meio básico para 309 ± 3 mOsm em meio de diferenciação, mensurados em três experimentos consecutivos) e poucos microlitros de água

destilada foram suficientes para ajustá-la aos valores prévios. No entanto, merece menção o fato de alguns marcadores terem-se revelado insatisfatórios para quantificações posteriores, por marcarem também fração de células sem morfologia neuronal típica.

Por outro lado, quando se observa a coloração para NF200, percebe-se que a marcação restringe-se às células com morfologia neuronal típica. Por esse motivo, selecionou-se esse marcador como o preferencial para outros experimentos de quantificação (Figura 10). A escolha de um marcador específico para células neuronais é de fundamental importância, haja visto que muitos autores publicam estudos com positividade para alguns marcadores que, em nossa experiência, revelaram-se inadequados para a caracterização neuronal.

Figura 10. Expressão de NF200 em células estromais diferenciadas. Microscopia confocal de imunofluorescência para NF200 e β III tubulina. Notam-se neuritos longos e ramificados, assumindo formas complexas compatíveis com neurônios mais maduros. Em contrapartida, β III tubulina é algumas vezes expressa em células sem morfologia neuronal típica. Verde representa Alexa 488, vermelho Alexa 594, e azul DAPI. Barras de escala, 50 μ m.

Observou-se positividade para GABA na grande maioria dos neurônios obtidos com o método de diferenciação (Figura 11).

Figura 11. Expressão de GABA em células estromais diferenciadas. Coloração imunocitoquímica e microscopia confocal ilustrando positividade para GABA numa célula neuronal marcada com β III tubulina. Verde representa Alexa 488, vermelho Alexa 594, e azul DAPI. Barras de escala, 50 μ m.

Na tentativa de se quantificar a especificidade dos marcadores neuronais utilizados na etapa anterior, calculou-se um coeficiente de correlação entre células positivas para um determinado marcador e células com morfologia neuronal típica. No caso, verificamos pela análise da distribuição dos resíduos, similarmente ao que já foi exposto, que as contagens não obedeciam distribuição paramétrica, e por esse motivo, optou-se pelo coeficiente de Spearman. No caso, quanto mais próximo de um for o valor obtido, maior será a correspondência entre a morfologia neuronal típica e a marcação positiva. Considerou-se morfologia neuronal típica a presença de soma esférico ou piramidal, prolongamentos mais longos que o diâmetro de dois corpos celulares e a presença de ramificações secundárias. A seguir, apresentou-se os resultados obtidos por meio de gráficos de densidade de elipses. O mais alto coeficiente foi obtido com a coloração para NF200 (0,9072), em comparação a 0,5719 para β III tubulina, 0,4041 para neurofilamento M e 0,3935 para MAP2ab.

Figura 12. Análise da especificidade dos marcadores neuronais na fase tardia de diferenciação. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman (ρ) entre células positivas para dado marcador e morfologia neuronal típica. Quanto mais próximo de um, mais linear e biunívoca é a relação entre as duas variáveis. Os resultados são mostrados em gráficos de densidade de elipses, onde cada ponto representa a contagem de um campo visual, e as elipses representam o intervalo de 95% de confiança.

Outra questão pertinente se refere ao grau de expressão do marcador antes e depois do período de diferenciação. Conforme já exposto, células imaturas, principalmente de origem mesenquimal, tendem a expressar baixos níveis de diversos marcadores de diferentes linhagens embrionárias. Para elucidar tal fato, realizaram-se medidas do sinal de fluorescência antes e depois da diferenciação neuronal.

Figura 13. Quantificação de níveis de fluorescência antes e depois da diferenciação neuronal. Os valores foram calculados antes e após exposição a IBMX, e notados na forma $\Delta F/F$. Nota-se que o mais baixo nível de expressão antes da diferenciação foi observado com NF200. Dividindo-se os dois valores (depois por antes) obtém-se o fator de aumento da expressão, anotado ao topo de cada dupla de barras. Nota-se que o maior fator de aumento ocorreu com NF200 (5,25 vezes maior depois que antes da diferenciação).

No caso, a expressão de NF200 aumentou de $0,12 \pm 0,02$ para $0,63 \pm 0,03$ (fator 5,25), o de NeuN aumentou de $0,17 \pm 0,07$ para $0,51 \pm 0,04$ (fator 3,00), o de MAP2abc aumentou de $0,25 \pm 0,03$ para $0,72 \pm 0,03$ (fator 2,88), o de NeuroD aumentou de $0,31 \pm 0,06$ para $0,67 \pm 0,03$ (fator 2,16), o de MAP2ab aumentou de $0,42 \pm 0,04$ para $0,71 \pm 0,05$ (fator 1,69), o de β III tubulina aumentou de $0,71 \pm 0,05$ para $0,90 \pm 0,02$ (fator 1,27) e, finalmente, o de NF-M aumentou de $0,50 \pm 0,04$ para $0,62 \pm 0,08$ (fator 1,24) (figura 13). A única redução ocorreu com a nestina, o que é esperado por tratar-se de marcador de células imaturas, que reduziu-se de $0,56 \pm 0,03$ para $0,38 \pm 0,05$ (fator 0,68). Analisando-se os dados apresentados, notou-se que o nível de expressão mais baixo antes da diferenciação foi observado para NF200, ao passo que o maior fator de aumento (5,25) também ocorreu com a marcação para NF200. Basendo-se nesses dados, juntamente com a

análise de especificidade mostrada anteriormente, optou-se pelo NF200 como marcador preferencial de células neuronais para as quantificações seguintes.

4.2.2.2 Quantificação das células neuronais

A representação da contagem da percentagem de células positivas para NF200 em relação ao número total de células (determinado pela coloração nuclear DAPI) está ilustrada na tabela 2 e na figura 14. Nessa representação (*box plot*), os retângulos representam a distribuição entre o primeiro e o terceiro quartis, as barras, os percentis 10 e 90, e os círculos, assinalam os valores que ultrapassaram 1,25 vezes a distância interquartil. A linha horizontal representa as medianas. Quantificou-se nenhuma célula positiva para NF200 em situação controle ($0 \pm 0\%$, 10 experimentos), $2,09 \pm 0,39\%$ sob cAMP (teste de Dunnett contra o grupo controle resultou em $p = 0,03$), $2,31 \pm 0,54\%$ sob BDNF ($p = 0,06$), $10,75 \pm 1,35\%$ sob IBMX ($p = 2,32 \times 10^{-6}$), $15,18 \pm 1,12\%$ sob IBMX e BDNF ($p = 2,32 \times 10^{-6}$) e, finalmente, $15,68 \pm 0,61\%$ sob IBMX, cAMP e BDNF ($p = 2,32 \times 10^{-6}$).

Tabela 2. Percentagens de células positivas para NF200 sob diferentes condições de cultivo; meio básico representa a condição controle, sem fatores de crescimento

Percentagem de células positivas para NF200	Condições de cultivo					
	Meio básico	IBMX	cAMP	BDNF	IBMX-cAMP	IBMX-cAMP-BDNF
	0,00	20,00	2,63	6,12	17,56	19,12
	0,00	15,24	2,63	0,73	16,47	14,96
	0,00	13,51	2,50	1,08	11,50	15,89
	0,00	8,03	4,35	1,47	19,69	15,28
	0,00	10,73	3,14	1,38	9,62	13,10
	0,00	7,58	1,17	0,93	18,89	20,83
	0,00	8,80	1,72	2,25	16,79	16,10
	0,00	9,09	1,18	3,92	11,86	11,69
	0,00	6,28	1,61	1,79	12,23	12,56
	0,00	8,21	0,00	3,45	17,14	17,24

Figura 14. Gráfico de *box plots* representando as porcentagens de células neuronais positivas para NF200 sob diferentes condições de cultivo: meio básico; BDNF (*brain derived neurotrophic factor*); AMPc (adenosina monofosfato cíclica); IBMX (iso-butil-metil-xantina); IBMX e cAMP; cAMP, IBMX e BDNF.

Notou-se que ocorreu aumento significativo da percentagem de células neuronais na presença de IBMX, efeito esse que foi maior quando o AMPc e o BDNF foram acrescentados ao meio. Deduziu-se com esses experimentos que a diferenciação depende do AMPc. Embora o AMPc não tenha tido efeito significativo quando testado isoladamente no meio, talvez por ser rapidamente

degradado, proporcionou efeito adicional favorável à diferenciação quando foi associado ao IBMX.

Alternativamente, procurou-se investigar se a via da fosfoquinase-A (PKA), que é ativada por AMPc, e a concentração intracelular de Ca^{2+} estariam envolvidas na diferenciação neuronal. Para tanto, adicionou-se àquele meio de cultivo que proporcionou maior concentração de células neuronais (BDNF, cAMP e IBMX) seletivamente PKAi (peptídeo inibidor da fosfoquinase A), Cd^{2+} , Ni^{2+} , e nifedipina. Foram quantificadas $15,68 \pm 0,91\%$ de células positivas para NF200 sob IBMX, AMPc e BDNF, o que, no caso, representou a condição controle, $5,73 \pm 0,42\%$ de células positivas com PKAi ($p = 2,418 \times 10^{-4}$ ao teste de Dunnett contra o controle), $0 \pm 0\%$ com Cd^{2+} ($p = 2,32 \times 10^{-6}$), $5,79\% \pm 0,98\%$ com nifedipina ($p = 2,718 \times 10^{-5}$) e $7,06 \pm 1,68\%$ com Ni^{2+} ($p = 3,0 \times 10^{-4}$). Vide tabela 3 e figura 15.

Tabela 3. Percentagens de células positivas para NF200 sob cada condição de cultivo. Meio básico representa a condição sem fatores de crescimento. Foram acrescidos PKAi (peptídeo inibidor da fosfoquinase A), Cd^{2+} , Ni^{2+} e nifedipina a IBMX, cAMP e BDNF, como tentativa de inibir a diferenciação neuronal

Percentagem de células positivas para NF200	Condições de cultivo					
	Meio básico	IBMX-cAMP-BDNF	PKAi	Cd	Nifedipina	Ni
	0,00	19,12	7,45	0,00	3,57	15,38
	0,00	14,96	4,76	0,00	5,26	4,88
	0,00	15,89	4,47	0,00	10,68	3,45
	0,00	15,28	6,69	0,00	6,99	3,13
	0,00	13,10	3,77	0,00	1,18	3,35
	0,00	20,83	5,06	0,00	3,08	5,44
	0,00	16,10	5,26	0,00	3,85	8,77
	0,00	11,69	6,63	0,00	5,66	17,50
	0,00	12,56	7,77	0,00	7,14	2,44
	0,00	17,24	5,48	0,00	10,53	6,25

Figura 15. Gráfico de *box plots* ilustrando as porcentagens de células positivas para NF200 nas condições da tabela 3. Nota-se que o inibidor de PKA e todos os bloqueadores de Ca^{2+} reduziram significativamente a percentagem de células neuronais na cultura.

Notou-se que o inibidor de PKA e todos os bloqueadores de Ca^{2+} utilizados reduziram significativamente a percentagem de células neuronais em relação à melhor condição de diferenciação. O efeito do Cd^{2+} foi o mais expressivo deles, possivelmente por ser potente bloqueador inespecífico de todas as correntes de Ca^{2+} . A nifedipina e o inibidor de PKA exercem efeito de mesma magnitude, o que talvez denote a mesma importância relativa da via PKA e das correntes de Ca^{2+} na diferenciação neuronal. O fato de que nenhum dos bloqueadores utilizados ter sido capaz de se equivaler à condição básica indica que talvez outros mecanismos coadunem-se para a diferenciação.

4.2.2.3 Análise estatística

Intencionou-se, a princípio, realizar análise de variância para comparar as médias dos grupos, haja visto que as medidas referem-se ao mesmo fenômeno biológico e em mesmas condições de registro, o que implica em mesma variância populacional (desconhecida) para os grupos estudados. No entanto, a análise de variância pressupõe distribuição normal dos dados para conclusões corretas. Como cada grupo apresenta valor limitado de observações ($n < 30$), o que foi, por sinal, suficiente para produzir altos níveis de significância, foi necessário analisar a distribuição de todas as observações para se saber se os dados tinham distribuição normal. Para tanto, procedeu-se à análise dos resíduos (diferença entre cada medida e a média do grupo). Para testar se os resíduos tinham distribuição normal, analisaram-se os gráficos QQ. Nessa representação, os círculos representam cada medida aferida, e a reta, a distribuição do padrão normal. Quanto mais os pontos aproximam-se da reta, mais a distribuição aproxima-se da curva normal. Adicionalmente, são também representadas as bandas de confiança a um coeficiente de 95%. No caso, analisando-se os dados originais, notou-se que alguns valores situados entre 1 e 3 desvios padrões positivos situam-se fora dos intervalos de confiança, ou seja, não apresentam distribuição gaussiana.

Alternativamente, poder-se-ia realizar teste estatístico não-paramétrico, como o de Wilcoxon ou Mann-Whitney U. No entanto, se a distribuição dos dados é conhecida, é possível a utilização de uma ferramenta estatística mais precisa.

Assim sendo, analisou-se a distribuição da transformação logarítmica dos dados originais por meio de gráficos QQ. Notou-se que todos os dados aproximaram-se da reta normal, inclusive aqueles situados entre 1 e 3 desvios padrões. A distribuição nos casos em que isso acontece é log-normal e segue a fórmula:

$$\begin{cases} f(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln x - \mu}{\sigma}\right)^2} & \text{Se } x > 0 \\ f(x) = 0 & \text{Se } x \leq 0 \end{cases}$$

Figura 16. Análise da distribuição dos dados a partir dos resíduos. Gráficos QQ ilustrando em A a distribuição dos dados originais. A partir de 1 desvio padrão, os dados afastam-se da reta, e, portanto, da distribuição normal. Em B, representa-se a distribuição da transformação logarítmica dos dados para ajustamento dos resíduos. Nesse caso, os pontos sobrepõem-se à reta normal, mostrando a adequação do modelo.

Ajustando-se os resíduos conforme o modelo proposto, pode-se proceder à análise de variância sem imprecisões conceituais.

Conclui-se da tabela 3 que o valor da estatística F, calculado dividindo-se o valor do quadrado médio entre os grupos pelo quadrado médio dentro dos grupos é

35,37. Considerando-se a distribuição de Fischer, deduziu-se que a probabilidade p de as diferenças entre as médias dos grupos estudados dever-se a um evento casual é de apenas $7,97 \cdot 10^{-31}$.

Tabela 4. Tabela ANOVA mostrando a análise de variância entre as condições de cultivo, com probabilidade p de a diferença entre os grupos observados dever-se a erro casual calculada em $7,97E-31$, ou seja, trata-se de evento extremamente improvável

ANOVA					
	graus de liberdade	$\sum$ quadrados	quadrados médios	estatística F	probabilidade p
Entre grupos	11	102,9	9,352	35,37	7,97E-31
Dentro dos grupos	108	28,55	0,2644		
Total	119	131,4	9,616		

4.2.2.4 Análise de morte e viabilidade celular

Ao se estudar a positividade para NF200 ao longo do tempo, percebeu-se que a porcentagem de células neuronais foi zero ao início da diferenciação, e aumentou para $16,76 \pm 2,31\%$ após 12 horas, diminuindo a seguir para $12,71 \pm 2,20\%$, após 24 horas, $10,65 \pm 2,12\%$, após 36 horas, e finalmente, para $4,99 \pm 0,93\%$ após 60 horas (figura. 17A). Além do mais, o número total de células determinado pela coloração nuclear com DAPI permaneceu constante durante todo o período, indicando que as células neuronais entraram em processo de desdiferenciação ou, alternativamente, degeneraram-se na mesma velocidade que novas células foram geradas no sistema. Para esclarecer tal questão, contou-se o número de células em degeneração nos mesmos intervalos e percebeu-se que houve pico de mortalidade após 36 horas de incubação, o que predominantemente afetou células com morfologia neuronal típica.

Mais especificamente, $1,38 \pm 0,59\%$ das células encontravam-se em degeneração após 12 horas de incubação, $1,76 \pm 0,62\%$, após 24 horas ($p = 0,9995$ ao teste de Tukey, comparado a 12 h), $28,54 \pm 4,30\%$, após 36 horas ($p = 1,106 \times 10^{-5}$ comparado a 24 h) e $9,31 \pm 1,76\%$, após 60 horas ($p = 3,792 \times 10^{-5}$ comparado a 36 h) (figura. 17B). Em suma, esses resultados indicam que a maioria das células neuronais degenerou nas primeiras 36 horas, e que novas células foram geradas no sistema a uma taxa equivalente. Concluiu-se que a redução na proporção de células positivas para NF200 observada deveu-se à degeneração preferencial das células neuronais, provavelmente induzida por AMPc.

Figura 17. Análise do curso da diferenciação neuronal e da viabilidade celular. Culturas foram expostas a IBMX e AMPc, e foram fixadas e coradas a intervalos controlados, ou seja, 12, 24, 36 e 60 horas após o plaqueamento. Em A, quantificações revelaram que após 12 horas cai progressivamente a porcentagem de células neuronais, sem que haja queda do número total de células. Em B, contagem das células em processo de degeneração. Nota-se que após 24 horas aumenta o número de células com membranas rompidas, cujos núcleos são positivos para etídio-homodímero.

4.2.2.5 Expressão de CREB

Uma vez demonstrado o efeito da via PKA e da concentração de Ca^{2+} na diferenciação neuronal, procurou-se verificar se o fator de transcrição CREB, relacionado ao AMPc, estaria envolvido no mecanismo de diferenciação. As medidas de fluorescência ($\Delta F/F$) de culturas diferenciadas e não diferenciadas revelou níveis de 68 ± 4 na cultura exposta a IBMX durante 7 dias e 29 ± 5 na condição basal ($p = 0.00047$ ao teste de Tukey). Notaram-se, portanto, níveis maiores de expressão de CREB fosforilado após a exposição ao IBMX, o que denotou que o AMPc contribua para fosforilação e ativação da proteína CREB, que por sua vez deve ser um dos fatores de transcrição envolvidos na neurogênese em nosso sistema (Figura 18).

Figura.18. Expressão de CREB antes e após a diferenciação. A, coloração imunocitoquímica e microscopia confocal para CREB fosforilado antes e depois da diferenciação neuronal. Observe marcação fraca dos núcleos em A, antes da diferenciação, em contraste com a forte marcação encontrada em B, após a diferenciação. Verde representa Alexa 488. Barras de escalas, 150 μm . Em C, níveis de fluorescência relativizados para as culturas antes e depois da diferenciação, expressos na forma $\Delta F/F$, em 3 experimentos consecutivos, médias $\pm$ erros padrões.

4.3 Diferenciação neuronal. Análise eletrofisiológica comparativa

4.3.1 Neurônios derivados de células mesenquimais

Foi realizada análise eletrofisiológica comparativa para se avaliar o grau de maturação funcional que as células mesenquimais atingiram após a indução da diferenciação neuronal. Para tanto, células neuronais obtidas a partir de outros tipos de células-tronco foram também mensuradas nas mesmas condições, e foram com as primeiras comparadas.

Em *voltage clamp*, foi possível medir o pico de influxo de Na^+ como sendo 119 ± 52 pA, cujo perfil de ativação revelou padrão dependente de voltagem típico das células neuronais. O máximo efluxo das correntes de K^+ foi de 825 ± 249 pA, cujo perfil de ativação também foi dependente da voltagem. Não foram evidenciados potenciais de ação espontâneos ou induzidos nas células diferenciadas, nem correntes sinápticas espontâneas ou evocadas. Esse padrão comprova a diferenciação neuronal, embora seja característico das células funcionalmente imaturas.

Figura 19. Eletrofisiologia das células estromais em diferenciação, revelando similaridade com o registro de neurônios. Em A, representam-se os pulsos de voltagem aplicados em *voltage clamp* e as correntes induzidas pelos pulsos de voltagem. Em B, apresenta-se o perfil de ativação das correntes de Na⁺ denotando a dependência da voltagem. Em C, perfil de ativação da condutância ao K⁺, também dependente de voltagem; em D, médias $\pm$ erros-padrões dos valores máximos registrados para as correntes de Na⁺ e de K⁺.

É interessante notar que parece ter havido discordância entre o que se considera células maduras pelo estudo imunocitoquímico e o que se considera células maduras pelo estudo eletrofisiológico.

4.3.2 Neurônios derivados do encéfalo fetal humano

A seguir, foi realizado registro eletrofisiológico das células-tronco neurais obtidas de fetos humanos. Foi possível registrar correntes da ordem de 2 nA, magnitude atingida a partir da quinta semana de cultivo. Foram também registrados potenciais de ação, porém não se obteve correntes sinápticas espontâneas ou evocadas, o que mostra que a maturação eletrofisiológica é um processo lento e gradativo.

Figura 20. Eletrofisiologia de células-tronco neurais humanas diferenciadas *in vitro*. Em A mostra-se célula imatura preenchida com biocitina durante o registro. Notam-se prolongamentos curtos e pouco ramificados. Em B e C, observa-se co-expressão de β III tubulina, comprovando a diferenciação neuronal. Em D, E e F, o mesmo é observado numa célula madura, onde se notam prolongamentos maiores e mais ramificados. Em G, observa-se registro de correntes evocadas na célula imatura (médias de 5 protocolos de estímulo por célula, com subtração de artefato). Em H, observam-se correntes de maior intensidade na célula madura, na mesma escala (média de 5 protocolos com subtração). Em I e J observa-se a evolução das correntes máximas e das densidades de correntes induzidas ao longo das semanas de cultivo. Em K, apresenta-se protocolo de estimulação para obtenção dos potenciais de ação mostrados em L, referentes à célula madura.

4.3.3 Neuônios derivados de encéfalo fetal murino

Também registrou-se a atividade elétrica das células-tronco neurais murinas durante a diferenciação, segundo o mesmo protocolo utilizado para as células mesenquimais. Observou-se na coloração imunocitoquímica que já a partir de uma semana *in vitro* houve positividade para sinaptofisina, proteína presente na superfície das vesículas pré-sinápticas. Registraram-se correntes de Na^+ e K^+ da ordem de 8 e 4 nA, respectivamente, além das salvas de potenciais de ação. Paralelamente, foi possível evocar correntes sinápticas por meio de pulsos extracelulares. Todas as nove células nas quais o protocolo foi completamente aplicado apresentaram correntes GABAérgicas, visto que foram bloqueadas total ou parcialmente com bicuculina; quatro dessas apresentaram componente de corrente resistente à bicuculina, que foi seqüencialmente bloqueada com CNQX, ou seja, era mediada por receptores glutamatérgicos do tipo AMPA.

Figura 21. Eletrofisiologia de células-tronco derivadas de fetos murinos diferenciadas segundo o mesmo protocolo usado para células mesenquimais. Em A, marcação de MAP2 em verde, típica de neurônios maduros, juntamente com marcação para sinaptofisina, evidenciando vesículas pré-sinápticas em vermelho. Em B, correntes de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem (média de 5 protocolos de estímulo, com subtração de artefatos). Em C, salvas de potenciais de ação em *current clamp*. Em D, correntes sinápticas evocadas com estímulo extracelular; o traço superior evidencia corrente GABAérgica bloqueada totalmente com bicuculina no traçado logo abaixo (média de 10 traçados com subtração de artefatos). A seguir, em outra célula, há componente de corrente resistente à bicuculina, com decaimento exponencial mais rápido que as correntes inibitórias. Essa corrente foi bloqueada totalmente por CNQX, mostrado no traçado inferior (corrente glutamatérgica).

5. DISCUSSÃO

A terapia baseada em transplante celular representa esperança importante para o tratamento de doenças neurodegenerativas, para muitas das quais, como a esclerose lateral amiotrófica ou a doença de Huntington, não se dispõe até hoje de terapia eficaz. Muito foi aprendido quanto ao desenvolvimento dessa possibilidade terapêutica, principalmente por meio de modelos experimentais de doença de Parkinson. Nesse sentido, é fundamental a escolha correta do tipo de célula a ser analisado. Sabe-se que células-tronco neurais derivadas de encéfalo de fetos são capazes de promover melhora funcional em modelos experimentais e em ensaios clínicos de doença de Parkinson. Contudo, as mesmas não sobrevivem durante mais de alguns meses no animal implantado e possuem potencial limitado de geração de diferentes subtipos neuronais, como por exemplo GABAérgicos e dopaminérgicos. Além disso, são necessários vários fetos para realizar o implante em um só doente, o que torna o tratamento praticamente inviável, pela dificuldade operacional associada. Outro aspecto importante são as questões éticas inerentes ao trabalho com fetos humanos, que é proibido na maioria dos países.

Em outra linha de pesquisa, trabalha-se com o desenvolvimento de células embrionárias, derivadas da camada interna de blastocistos, que possuem enorme potencial de diferenciação (inclusive a subtipos específicos de neurônios), mas que, por outro lado, apresentam crescimento muito rápido e de difícil controle, podendo gerar teratomas malignos em até 25% dos animais implantados. Além do mais, com

essa tecnologia não se evitam os dilemas éticos já mencionados. Células com alto poder replicativo auto-renovam-se com facilidade e geram contingente quase ilimitado de células a partir de poucas células iniciais, o que as tornam ideais para armazenamento em bancos de tecidos. Entretanto, trazem a preocupação sobre a taxa de crescimento após seu implante no SNC. É sabido que a interação célula-célula constitui potente sinal para cessar a divisão celular. No entanto, alguns tipos de células, como, por exemplo, as células embrionárias, possuem mecanismos que as tornam não-responsivas a esses sinais e propensas à degeneração maligna.

Alternativamente, procurou-se estabelecer a diferenciação de células-tronco neurais obtidas de encéfalos adultos, processo esse que, à despeito do enorme progresso técnico que vivenciamos, ainda é extremamente difícil. No entanto, é importante considerar que, para realizar auto-implantes, o encéfalo doador já apresenta a doença que motivou o tratamento, além do fato de a idade avançada que a maioria desses doentes apresenta ser fator ineditivo da adequada maturação desses enxertos *in vivo*. O principal problema dessa modalidade terapêutica é que as células obtidas desse modo, até pelo seu próprio estágio de desenvolvimento, apresentam potencial de diferenciação neuronal muito menor (tendem a formar astrócitos) e sobrevivem durante período muito menor no tecido hospedeiro.

Portanto, é animadora a perspectiva de obtenção de células-tronco capazes de gerar neurônios funcionantes a partir da medula-óssea. Acumulou-se larga experiência com o transplante de células mesenquimais para terapia de cânceres hematológicos, e não se descreveu a ocorrência de tumores malignos conseqüentes aos implantes. Contudo, a indução de diferenciação neuro-epitelial em um tipo de célula condicionada a gerar mesênquima é bastante complicado e não ocorre

espontaneamente como com outros tipos celulares. Por outro lado, o desenvolvimento dessa tecnologia poderá permitir a extração de células de doentes praticamente sem riscos e sem prejuízo de função, visto que o tecido é imediatamente regenerado. Adicionalmente, o auto-implante tornaria desnecessária a imunossupressão, que é a maior responsável pela morbimortalidade de doentes implantados. Por outro lado, quando descontinuada a imunossupressão, observa-se a ocorrência de rejeição e perda do efeito terapêutico.

Conforme o exposto, buscou-se com esse projeto a avaliação do potencial de diferenciação neuronal *in vitro* de células-tronco estromais da medula-óssea de seres humanos adultos. Os primeiros relatos de isolamento de células-tronco da medula óssea datam do início dos anos 1980 (Ohgushi e cols., 1989; Lennon e cols., 1983). Nesses trabalhos, os autores ressaltaram a importância do soro fetal no meio de cultivo. O soro é responsável pela adesão seletiva ao plástico da cultura, além de proporcionar ótima expansão mitótica e manutenção das células em estado indiferenciado (Haynesworth e cols., 1992). O protocolo de isolamento descrito no presente trabalho foi adaptado de Pittenger e cols. (1999) e é baseado na propriedade de as células estromais aderirem ao frasco de cultivo. Foi possível demonstrar satisfatoriamente o isolamento de células estromais, que após três semanas em cultura mostraram-se bastante homogêneas e positivas para vimentina e anticorpo anti-fibroblasto humano. A etapa subsequente de diferenciação condrocitária e osteocitária foi fundamental para se provar que foi isolada uma população de células-tronco capaz de gerar células maduras de dois tecidos diferentes. A análise FACS da população de células aqui isoladas foi muito similar àquela reportada pelos autores citados. Segundo a mesma, as células mesequimais expressam muitas moléculas da

família das β -integrinas, como CD29, 44, 49d e 49e, que são, em última instância, responsáveis pela aderência celular. Além do mais, após três semanas em cultura, as células isoladas revelaram-se negativas para CD34 e CD45. Assim sendo, podem ser consideradas não-hematopoiéticas. Após um período adicional na presença de bFGF e EGF, $97,85 \pm 0,25\%$ das células foram positivas para nestina, marcador de precursores neuroepiteliais. Consequentemente, assumimos que nosso protocolo é adequado para isolamento de células-tronco mesenquimais e, diferentemente de outros autores (Wislet-Gendebien e cols., 2005), consideramos desnecessários e dispendiosos procedimentos adicionais para purificação das células não-hematopoiéticas ou das células positivas para nestina.

A expansão subsequente de precursores neuroepiteliais na forma de esferas por meio de bFGF e EGF muito se assemelha ao previamente reportado com células mesenquimais por Kabos e cols. (2002), ou ao previamente descrito para a expansão de células-tronco neurais provenientes do tecido fetal. Complementarmente, as similaridades imunocitoquímicas e morfológicas entre células-tronco neurais e células mesenquimais expandidas com EGF e bFGF sugere que um mesmo mecanismo de diferenciação é responsável pela maturação de tipos diferentes de células-tronco. Demonstrou-se que, após a exposição ao EGF e bFGF, ocorreu positividade para a nestina, PSA-NCAM, SOX2, MAP2abc e β III-tubulina (o primeiro sendo marcador de precursores neuro-gliais, os dois seguintes, de progenitores neurais, e os dois últimos, de neurônios jovens). Tal estudo comparativo não encontra semelhança na literatura específica e representa hipótese bastante razoável para os achados aqui descritos.

Procuramos ainda esclarecer quais possíveis mecanismos estariam envolvidos na diferenciação neuronal. Vale ressaltar que descrevemos paralelamente alterações morfológicas, imunocitoquímicas e eletrofisiológicas durante a maturação celular que não podem ser explicadas por alterações osmóticas do meio de cultivo, como previamente proposto (Lu e cols., 2004; Neuhuber e cols., 2004), mas representam mecanismo específico dependente da via da fosfoquinase A (haja visto que foi inibida por um bloqueador específico dessa via enzimática) e do influxo de Ca^{2+} (já que bloqueadores de distintos canais de Ca^{2+} causaram redução no número de células diferenciadas). Adicionalmente, o controle da variação da osmolaridade não evitou as alterações descritas.

Quando se procura estudar diferenciação de células mesenquimais, deve-se ater à seleção do marcador ideal. Por meio do presente estudo demonstramos pioneiramente que alguns marcadores comumente usados são inadequados para se comprovar aquisição de fenótipo neuronal. Por exemplo, a β III tubulina é expressada em células que não apresentam morfologia neuronal típica. Reportou-se previamente que células mesenquimais em particular expressam genes e proteínas dos três folhetos embrionários em estágios precoces de seu desenvolvimento (Woodbury e cols., 2002; Lee e cols., 2003), e que esse fato pode ser fonte de erro ao se avaliar a diferenciação dessas células. No entanto, alguns desses marcadores são de fato hiperexpressos ao longo da maturação celular, conforme pudemos demonstrar.

Para se evitar inacurácia metodológica, é necessária a adoção de critérios morfológicos, imunocitoquímicos e eletrofisiológicos para se analisar a diferenciação celular. Somente assim pode-se comparar o grau de maturação funcional das células

mesenquimais com o de outras células-tronco. Desse modo, procuramos determinar matematicamente a especificidade dos diferentes marcadores calculando o coeficiente de correlação entre a morfologia neuronal e a marcação positiva, além do fator de incremento da expressão do marcador ao longo da maturação celular. Baseando-se nesses dados, escolhemos e propomos a adoção do NF200 como o marcador neuronal de escolha para células mesenquimais. Tal marcador é expresso tardiamente durante a maturação celular, posteriormente aos neurofilamentos de baixo e médio peso molecular.

A seguir, investigamos os possíveis mecanismos envolvidos na diferenciação celular, e concluímos que a adição de IBMX ao meio de cultivo aumentou substancialmente a proporção de células neuronais, e que a adição de AMPc tem efeito adicional. Em publicações similares, os autores utilizaram diferentes misturas de citocinas e fatores de crescimento, sem considerar, no entanto, a contribuição individual de cada substância. No presente trabalho, procuramos analisar essa questão de modo mais sistemático, e demonstramos assim o efeito neurogênico do AMPc em culturas de células mesenquimais, além de reportarmos a dependência da via enzimática da fosfoquinase A e de Ca^{2+} . Demonstraram-se alterações morfológicas que sofrem as células durante o processo de diferenciação, corroboradas pela positividade para NeuN, NF M, NF 200 e MAP2ab, marcadores esses de neurônios mais maduros. Ambas as vias culminam, seja diretamente, via AMPc, seja indiretamente, via Ca^{2+} e calmodulina-quinase II e IV, na fosforilação de CREB durante a diferenciação. CREB é um fator de transcrição ao qual se liga AMPc. Sua fosforilação transitória ocorre paralelamente à diferenciação de neuroblastos no bulbo olfatório de camundongos e é mais evidente na fase final de

migração tangencial, decrescendo após o alongamento dendrítico e formação de espículas dendríticas (Giachino e cols., 2005). A ativação da via de transcrição cAMP-CREB sabidamente promove proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurônios pós-mitóticos no hipocampo de animais adultos (Nakagawa e cols., 2002a e b). No entanto, o efeito de AMPc na maturação celular decai gradativamente nos três primeiros dias de observação. A concentração de AMPc intracelular é limitada por diferentes mecanismos; o AMPc é importante indutor de morte celular. A redução da população de células neuronais observada tardiamente em nossas culturas resultou de morte celular, provavelmente causada pelo efeito apoptótico do AMPc. Fatores que possam inibir tal efeito ainda precisam ser esclarecidos.

É bem sabido que contatos sinápticos e excitabilidade elétrica exercem importante efeito trófico nas células em diferenciação (Deisseroth e cols., 2004). Assim sendo, é razoável admitir que, ao se implantarem células mesenquimais num cérebro hospedeiro, possa-se influenciar positivamente a maturação funcional das mesmas. Usando tal estratégia, alguns autores reportaram melhora dos déficits neurológicos em roedores submetidos à isquemia experimental (Zhao e cols., 2002; Li e cols., 2005). No entanto, ainda está para ser demonstrada a restauração da via motora piramidal. Considerando a falta de tal demonstração, Bai e cols. (2007) propuseram que a discreta recuperação funcional observada em alguns modelos animais de isquemia talvez seja decorrente de algum fator trófico secretado por células mesenquimais ainda não identificado, mas que tenha a hipotética ação sobre a neurogênese local, e não seja propriamente resultante de diferenciação neuronal das células implantadas. Em conclusão, o potencial de diferenciação neuronal de células mesenquimais permanece como questão central no âmbito da neurorestauração.

Tanto quanto os autores puderam apurar, o presente estudo é o primeiro em que se avaliou eletrofisiologicamente a diferenciação neuronal de células mesenquimais em condições de monocultura, afastando assim a possibilidade de que a atividade elétrica neuronal ensurada seja decorrente da fusão com células neuronais adicionadas ao sistema. Em sistemas de co-cultura, pode ser adquirido fenótipo neuronal através da incorporação de material genético das células neuronais, o que deixa em aberto se a diferenciação neuronal é propriedade intrínseca das células-tronco mesenquimais. Interessantemente, notou-se que células mesenquimais diferenciam-se de fato a células neuronais, capazes de expressar canais iônicos dependentes de voltagem, mas incapazes de gerar potenciais de ação ou de formar contatos sinápticos funcionantes.

Estabeleceu-se análise eletrofisiológica comparativa entre o potencial das células-tronco mesenquimais gerarem neurônios maduros e o potencial das células-tronco neurais (tanto de seres humanos quanto de roedores). Concluiu-se que, embora as células mesenquimais assumam muitas características típicas de neurônios, seu desenvolvimento *in vitro* não pode ser equiparado àquele alcançado por células-tronco neurais. Esses achados muito acrescentam ao tópico da neurorestauração baseada em células adultas. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para se esclarecer sob quais condições as células mesenquimais podem gerar neurônios funcionantes, se é que o podem fazer.

Baseando-se nestes resultados, o uso de células mesenquimais humanas para fins restauradores merece investigação adicional. Até o momento, esforços têm sido dirigidos ao esclarecimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação neuronal, além da identificação dos genes que são ativados durante esse processo. O

esclarecimento dessas questões permitirá o desenvolvimento de linhas de células que hiper-expressam determinados genes pró-neurogênicos, o que pode contribuir para se aumentar a percentagem de células neuronais no meio de cultura. De acordo com o que foi exposto, destaca-se a importância de descrever o potencial e as limitações do trabalho com determinada linha de células, com o intuito de se avançar na direção da tão desejada neurorestauração.

6. CONCLUSÕES

A partir do que foi exposto, podemos concluir que:

- i) Células-tronco mesenquimais de seres humanos adultos adequadamente isoladas são capazes de se trans-diferenciar em células neuronais por meio de um processo independente da fusão com células neuronais maduras.
- ii) O fenótipo neuronal foi induzido aumentando-se a concentração de AMPc no meio de cultivo ou inibindo a sua degradação.
- iii) A avaliação da diferenciação neuronal deve contemplar critérios morfológicos, imunocitoquímicos e eletrofisiológicos. Quanto à análise imunocitoquímica, propomos que o neurofilamento de alto peso molecular (NF200) seja o marcador de escolha, tendo por base seu perfil de especificidade, a sua baixa expressão antes da diferenciação e o sensível aumento da expressão pós-diferenciação.
- iv) A diferenciação neuronal depende da concentração intracelular de Ca^{2+} e de AMPc, e parece culminar na fosforilação de CREB.
- v) A maturidade de células-tronco mesenquimais se situa muito aquém do grau de maturidade eletrofisiológica atingido por células-tronco neurais quer humanas quer murinas. Pesquisas complementares são necessárias para se superar as dificuldades inerentes ao método, a fim de que poder-se dispor de terapia celular eficaz baseada em células-tronco adultas.

7. REFERÊNCIAS

- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C, and Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95 (7): 3908-3913.
- Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res.* 2007; 32:353-362.
- Bentlage C, Nikkhah G, Cunningham MG, Bjorklund A. Reformation of the nigrostriatal pathway by fetal dopaminergic micrografts into the substantia nigra is critically dependent on the age of the host. *Exp Neurol.* 1999; 159 (1): 177-190.
- Bischofberger J, Geiger JRP, Jonas P. Timing and efficacy of Ca^{2+} channel activation in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci.* 2002; 22(24): 10593-10602.
- Bjorklund A, Stenevi U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 1979; 177 (3): 555-560.
- Bjorklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand. (Suppl).* 1983; 522: 9-18.

Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 2002; 99 (4): 2344-2349.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000; 290 (5497): 1775-1779.

Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol.* 2001; 19 (5): 475-479.

Carlsson T, Winkler C, Lundblad M, Cenci MA, Bjorklund A, Kirik D. Graft placement and uneven pattern of reinnervation in the striatum is important for development of graft-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis.* 2006; 21 (3): 657-668.

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2001; 171 (1): 98-108.

Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science.* 2002; 297 (5585): 1299

Cejas PJ, Martinez M, Karmally S, McKillop M, McKillop J, Plunkett JA, Oudega M, Eaton MJ. Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete brain-derived neurotrophic factor attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain*. 2000; 86 (1-2): 195-210.

Christophersen NS, Meijer X, Jorgensen JR, Englund U, Gronborg M, Seiger A, Brundin P, Wahlberg LU. Induction of dopaminergic neurons from growth factor expanded neural stem/progenitor cell cultures derived from human first trimester forebrain. *Brain Res Bull*. 2006; 70 (4-6): 457-466.

Dass B, Olanow CW, Kordower JH. Gene transfer of trophic factors and stem cell grafting as treatments for Parkinson's disease. *Neurology*. 2006; 66:S89-103.

Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*. 2004; 42 (4): 535-552.

Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 2006; 24 (4): 1054-1064.

Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282 (1): 148-152.

- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, varez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 97 (6): 703-716.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Schmidt RH, Stenevi U, Iversen SD. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites. *Acta Physiol Scand. (Suppl)*. 1983a; 522: 29-37.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Schmidt RH, Stenevi U, Iversen SD. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions. *Acta Physiol Scand.(Suppl)*. 1983b; 522: 39-47.
- Eaton MJ, Santiago DI, Dancausse HA, Whittemore SR. Lumbar transplants of immortalized serotonergic neurons alleviate chronic neuropathic pain. *Pain*. 1997; 72 (1-2): 59-69.
- Forssman J. Zur Kenntniss des Neurotropismus. *Zeigler's Beiträge zur Pathologischen Anathomie*. 1900;XXVII: 407-430.
- Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*. 1988; 1 (6): 439-448.

- Frederiksen K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* 1988; 8 (4): 1144-1151.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2001; 344 (10): 710-719.
- Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1995; 38 (3): 379-388.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003; 23 (28): 9357-9366.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000; 287 (5457): 1433-1438.
- Gage FH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. VIII. Survival and growth of implants of nigral and septal cell suspensions in intact brains of aged rats. *Acta Physiol Scand. (Suppl).* 1983; 522: 67-75.

Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 1995; 18: 159-192.

Giachino C, De MS, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schutz G, Fasolo A, Peretto P. cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 2005; (25):10105-10118.

Goolsby J, Marty MC, Heletz D, Chiappelli J, Tashko G, Yarnell D, Fishman PS, Dhib-Jalbut S, Bever CT, Jr., Pessac B, Trisler D. Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100 (25): 14926-14931.

Grothe C, Timmer M, Scholz T, Winkler C, Nikkhah G, Claus P, Itoh N, Arenas E. Fibroblast growth factor-20 promotes the differentiation of Nurr1-overexpressing neural stem cells into tyrosine hydroxylase-positive neurons. *Neurobiol Dis.* 2004; 17 (2): 163-170.

Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2002; 5 (7): 627-628.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 1992; (13):81-88.

Hains BC, Johnson KM, McAdoo DJ, Eaton MJ, Hulsebosch CE. Engraftment of serotonergic precursors enhances locomotor function and attenuates chronic central pain behavior following spinal hemisection injury in the rat. *Exp Neurol*. 2001; 171 (2): 361-378.

Hains BC, Yucra JA, Eaton MJ, Hulsebosch CE. Intralesion transplantation of serotonergic precursors enhances locomotor recovery but has no effect on development of chronic central pain following hemisection injury in rats. *Neurosci Lett*. 2002; 324 (3): 222-226.

Hamby, WB. The case reports and autopsy records of Ambroise Paré, Springfield: Charles C. Thomas. 1960.

Hung SC, Cheng H, Pan CY, Tsai MJ, Kao LS, Ma HL. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells*. 2002; 20 (6): 522-529.

Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*. 1995; 15 (1): 35-44.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418 (6893): 41-49.

- Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100 (Suppl 1):11854-11860.
- Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL, Yu JS. Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. *Exp Neurol.* 2002; 178 (2): 288-293.
- Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport.* 2002; 13 (9): 1185-1188.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature.* 2002; 418 (6893): 50-56.
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5 (3): 755-766.
- Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM, Martel L, Levey AE, Mufson EJ, Freeman TB, Olanow CW. Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol.* 1996; 370 (2): 203-230.

- Lee J, Elkahoul AG, Messina SA, Ferrari N, Xi D, Smith CL, Cooper R, Jr., Albert PS, Fine HA. Cellular and genetic characterization of human adult bone marrow-derived neural stem-like cells: a potential antiglioma cellular vector. *Cancer Res.* 2003; 63 (24): 8877-8889.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2000; 18 (6): 675-679.
- Lennon DP, Osdoby P, Carrino DA, Vertel BM, Caplan AI. Isolation and characterization of chondrocytes and non-chondrocytes from high-density chick limb bud cell cultures. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1983; (3):235-251.
- Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 2005; 49:407-417.
- Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1997; 8 (14): iii-ix.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.* 1990; 247 (4942): 574-577.

- Lindvall O, Hagell P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 2000; 127: 299-320.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature.* 2006; 441 (7097): 1094-1096.
- Lindvall O, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol.* 1992; 31 (2): 155-165.
- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol.* 1998; 149 (2): 411-423.
- Liu Y, Rao MS. Transdifferentiation--fact or artifact. *J Cell Biochem.* 2003; 88 (1): 29-40.
- Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res.* 2004; 77 (2): 174-191.
- Ma Y, Feigin A, Dhawan V, Fukuda M, Shi Q, Greene P, Breeze R, Fahn S, Freed C, Eidelberg D. Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann Neurol.* 2002; 52 (5): 628-634.

- Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P. Functional and molecular differences between voltage-gated K⁺-channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci*. 1998; 18(20): 8111-8125.
- Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7 (5): 395-406.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000; 290 (5497): 1779-1782.
- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2003; 100 (3): 1364-1369.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005; 28: 223-250.
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Chen J, Fujioka T, Malberg J, Tsuji S, Duman RS. Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci*. 2002a; (22):9868-9876.
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*. 2002b (22):3673-3682.

- Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 2004; 11 (14): 1155-1164.
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res.* 2004; 77 (2): 192-204.
- Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci.* 1994a; 14 (6): 3449-3461.
- Nikkhah G, Brandis A. Neurotransplantation in Mobus Parkinson. Experimentelle und klinische Ergebnisse der funktionellen Wiederherstellung des dopaminergen Systems . *Zentralbl Neurochir.* 1995a; 56 (4): 153-160.
- Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD, Bjorklund A. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci.* 1995b; 15 (5 Pt 1): 3548-3561.

- Nikkhah G, Cunningham MG, Jodicke A, Knappe U, and Bjorklund A. Improved graft survival striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 1994b; 633 (1-2): 133-143.
- Nikkhah G, Cunningham MG, McKay R, Bjorklund A. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery. *J Neurosci.* 1995c; 15 (5 Pt 1): 3562-3570.
- Nikkhah G, Duan WM, Knappe U, Jodicke A, Bjorklund A. Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model. *Neuroscience.* 1993; 56 (1): 33-43.
- Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989; 60:334-339.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev.* 1996; 59 (1): 89-102.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003; 54 (3): 403-414.

- Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*. 1979; 204 (4393): 643-647.
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101 (34): 12543-12548.
- Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehnström S, Widner H, Lindvall O. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 1999; 2 (12): 1137-1140.
- Piccini P, Pavese N, Hagell P, Reimer J, Bjorklund A, Oertel WH, Quinn NP, Brooks DJ, Lindvall O. Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease. *Brain*. 2005; 128 (Pt 12): 2977-2986.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284 (5411): 143-147.
- Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, Galli R, Del C, Amadio S, Bergami A, Furlan R, Comi G, Vescovi AL, Martino G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*. 2003; 422 (6933): 688-694.

Pluchino S, Zanutti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature*. 2005; 436 (7048): 266-271.

Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. 1992; 12 (11): 4565-4574.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255 (5052): 1707-1710.

Saltykow S. Versuche über Gehirntransplantation, zugleich ein Beitrag zur Kenntniss der Vorgänge an den zelligen Gehirnelementen. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1905. 40: 329-388.

Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO, McKay RD. In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res*. 2001; 65 (4): 284-288.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000; 164 (2): 247-256.

- Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and metabolism. *Acta Physiol Scand. (Suppl)*. 1983; 522: 19-28.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*. 2004; 429 (6988): 184-187.
- Shetty AK, Turner DA. Neurite outgrowth from progeny of epidermal growth factor-responsive hippocampal stem cells is significantly less robust than from fetal hippocampal cells following grafting onto organotypic hippocampal slice cultures: effect of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurobiol*. 1999; 38 (3): 391-413.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 2002a; 417 (6884): 39-44.
- Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci*. 2002b; 5 (5): 438-445.
- Sorensen AT, Thompson L, Kirik D, Bjorklund A, Lindvall O, Kokaia M. Functional properties and synaptic integration of genetically labelled dopaminergic neurons in intrastriatal grafts. *Eur J Neurosci*. 2005; 21 (10): 2793-2799.

- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*. 2000; 20 (19): 7377-7383.
- Svendsen CN, Fawcett JW, Bintlage C, Dunnett SB. Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Exp Brain Res*. 1995; 102 (3): 407-414.
- Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T, Caldwell MA. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods*. 1998; 85 (2): 141-152.
- Tabar V, Studer L. Novel sources of stem cells for brain repair. *Clin Neurosci Res*. 2002; 2 (1-2): 2-10.
- Thompson L, Barraud P, Andersson E, Kirik D, Bjorklund A. Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci*. 2005; 25 (27): 6467-6477.
- Thompson WG. Successful brain grafting. *N Y Med*. 1890. J. 51, 701-702.
- Timmer M, Muller-Ostermeyer F, Kloth V, Winkler C, Grothe C, Nikkhah G. Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal

- dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Exp Neurol*. 2004; 187 (1): 118-136.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*. 2005; 47 (6): 803-815.
- Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002; 297 (5590): 2256-2259.
- Wehner T, Bontert M, Eyupoglu I, Prass K, Prinz M, Klett FF, Heinze M, Bechmann I, Nitsch R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, Priller J. Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2003; 23 (12): 5004-5011.
- Whittemore SR, Morassutti DJ, Walters WM, Liu RH, Magnuson DS. Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp Cell Res*. 1999; 252 (1): 75-95.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci*. 2005; 28 (2): 86-92.

- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*. 2005a; 23:392-402.
- Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull*. 2005b; 68:95-102.
- Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res*. 2002; 69 (6): 908-917.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000; 61 (4): 364-370.
- Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature*. 2002; 416 (6880): 485-487.
- Yan J, Studer L, McKay RD. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem*. 2001; 76 (1): 307-311.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*. 1998; 93 (5): 755-766.

Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002; 174 (1): 11-20.

Zhu W, Mao Y, Zhao Y, Zhou LF, Wang Y, Zhu JH, Zhu Y, Yang GY. Transplantation of vascular endothelial growth factor-transfected neural stem cells into the rat brain provides neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 2005; 57 (2): 325-333.

8. ANEXO

Reprodução do manuscrito em processo de submissão à revista *Journal of Neuroscience*, segundo as normas da revista.

Section: Development/ Plasticity/ Repair

Senior Editor: Dr. Moses Chao

Title: Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells depends on PKA-pathway and on intracellular Ca^{2+} -concentration.

Abbreviated title: neurodifferentiation of hMSC

Authors and addresses:

Guilherme Lepski

Division of Functional Neurosurgery

Medical School, University of São Paulo

R. Cristiano Viana 505 ap.81

05411-001 Sao Paulo SP Brazil

Cinthia Elim Jannes

Laboratory of Molecular Biology LIM15

Medical School, University of São Paulo

Av. Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho 455

01246-093 São Paulo SP Brazil

Dr. Anna Papazoglou

Laboratory of Molecular Neurosurgery
Neurocentre, Albert-Ludwig University
Breisacherstrasse 64
79106 Freiburg Germany

Dr. Alexander T. Mehlhorn
Department of Orthopaedic and Trauma Surgery
University Medical Centre
Hugstetterstrasse 55
79106 Freiburg, Germany

Stefan Kaiser
Department of Haematology/Oncology
University Medical Centre
Hugstetterstrasse 55
79106 Freiburg Germany

Manoel Jacobsen Teixeira
Division of Functional Neurosurgery
Medical School, University of São Paulo
R. Ovidio Pires de Campos 785
01060-970 São Paulo SP Brazil

Suely Kazue Nagahashi Marie

Laboratory of Molecular Biology LIM15
Medical School, University of São Paulo
Av. Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho 455
01246-093 São Paulo SP Brazil

Josef Bischofberger
Institute of Physiology I
Albert-Ludwig University
Hermann-Herder-Strasse 7
79104 Freiburg Germany

Guido Nikkhah
Department of Stereotactic and Functional Neurosurgery
Neurocentre, Albert-Ludwig University
Breisacherstrasse 64
79106 Freiburg Germany
guido.nikkhah@uniklinik-freiburg.de
(corresponding author)

Figures: 10

Pages: 33

Key words: mesenchymal stem cells; neuronal differentiation; electrophysiology; cell therapy; neurorestoration; bone marrow

Acknowledgements

The authors thank Jarek Maciaczyk and Alex Klein for the fruitful discussions and ideas brought to the paper and Johanna Wessoleck, Brunhilde Baumer, and Donata Maciaczyk for excellent technical support. This work was supported by (DAAD) Deutscher Akademischer Austausch Dienst, DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

Abstract

Neuronal differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) is a matter of controversy, and the mechanisms involved in differentiation are largely unknown. The derivation of mature neurons from MSCs has been described in co-culture systems, raising the possibility that differentiation resulted from MSC fusion with mature neurons. We isolated MSCs from humans and characterized them by FACS. Cells were differentiated in medium containing either cAMP, IBMX, BDNF, combinations of the three, or no cytokine. Different Ca^{2+} channel blockers or protein kinase A inhibitor (PKAi) were used to impair differentiation, which was quantified with NF200 immunostaining. Patch clamp recording was used to confirm the neuronal phenotype. Control cells were not positive for NF200. On the other hand, $10.75\% \pm 1.35$ ($p < 0.0001$) of the cells were NF200 positive after IBMX was added the culture medium, and $15.18\% \pm 1.12$ were NF200 positive after a combination of cAMP and IBMX was added ($p < 0.0001$). Na^+ and K^+ voltage-gated currents were recorded, but action potentials were not observed. Differentiation was impaired by PKAi ($5.73\% \pm 0.42$, $p < 0.0001$), nifedipin ($5.79\% \pm 0.98$, $p < 0.0001$), Ni ($7.06\% \pm 1.68$, $p < 0.0001$), and Cd (0 ± 0 , $p < 0.0001$). Neuronal differentiation was not due to fusion with other cell types, and it seemed to depend on the PKA pathway and intracellular concentration of Ca^{2+} . Understanding the mechanisms of MSC differentiation will increase the efficiency of the method and provide a powerful clinical tool against many neurodegenerative conditions.

Introduction

Many neurological conditions, such as degenerative diseases, stroke, neuropathic deafferentation, and trauma, create severe functional deficits in patients, for which currently available treatments are ineffective. Cell therapy is a promising treatment option that promotes neurorestoration and functional recovery in animals models of neurological disorders (Lindvall and Kokaia, 2006). However, the ability of specific types of stem cells to generate neurons, their biological safety, and the practical feasibility of their use are under intense investigation and remain very controversial (Dass et al., 2006).

Mesenchymal stem cells (MSCs) are easily obtained from adult tissue and isolated from other cell types in the bone marrow. They are biologically safe, and they have been used extensively in bone marrow transplanted patients suffering from hematologic cancer (Reyes et al., 2001;Mezey et al., 2003). Furthermore, the availability of MSCs allows for transplant of a patient's own cells and eliminates the need for immunosuppression and its inconvenient side effects. To date, many authors have described *in vitro* neuronal differentiation of MSCs (Black and Woodbury, 2001;Woodbury et al., 2000;Sanchez-Ramos et al., 2000;Jiang et al., 2002). Nevertheless, controversy persists in terms of the neuronal markers, culture protocols, and methods used to confirm the acquisition of neuronal phenotype. Some reports were based on morphological criteria and few markers (Kim et al., 2002), and some authors claimed that the initial morphological changes of differentiating cells were due to increased osmolarity of the culture media and did not imply neuronal differentiation (Lu et al., 2004b;Neuhuber et al., 2004a). Additionally, the few reports with electrophysiologically verified differentiation were based on co-culture

conditions that included mature neurons (Jiang et al., 2003; Wislet-Gendebien et al., 2005b). Considering the ability of mesenchymal cells to fuse and incorporate genomic material, it is important to determine if neuronal differentiation is an intrinsic characteristic of MSCs or if it results from fusion with neurons that are present in the system (Wurmser and Gage, 2002). The possibility that cell fusion is responsible for the electrophysiological maturity that has been reported must be considered. Accordingly, we sought to determine whether MSCs can forsake their mesenchymal heritage and acquire morphological, immunocytochemical, and electrophysiological traits of neurons in monoculture systems. Furthermore, we evaluated possible biochemical pathways that are involved in neuronal differentiation.

Material and Methods

Tissue. Fifteen healthy blood donors between 20 and 40 years of age, registered at the Hemocenter at the Uniclinic in Freiburg, Germany, were selected for the study. All procedures were in accordance with the guidelines established by the Ethics Committee at Albert-Ludwig University, Freiburg. Informed consent was obtained from all donors. Blood was screened to rule out asymptomatic HIV 1 and 2, HTLV 1 and 2, HCV, HBV, CMV, and syphilis infection. Inclusion criteria included normal hemograms and coagulograms, to rule out hemathologic disease that could restrict differentiation of the marrow stem cells. In a small surgery unit, the donors layed in a horizontal position, and a puncture was made at the level of the iliac crest under aseptic conditions. Marrow (100 mL) was aspirated from each donor.

Isolation of MSCs. MSCs were purified as previously described (Zimmermann et al., 2003; Mehlhorn et al., 2006b). Briefly, the donor material was diluted 1:1 in phosphate buffered saline (PBS; Gibco, Karlsruhe, Germany), and centrifuged at 2500 rpm and 20°C for 25 minutes with Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin, Germany). The mononuclear cell layer was aspirated, diluted in PBS, filtered through 40 µm cell strainers (DB Labware, Franklin Lakes, NJ), and seeded in 175 cm² non-treated polystyrene culture flasks at a density of 0.2-1.0 x 10⁶ cells/cm² with 25 mL stem cell basal medium supplemented with MSCGM SingleQuots (Cambrex, Walkersville, MD), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, and incubated at 37° C at 95% humidity with 5% CO₂ and 21% O₂. Medium was changed every other day, and all non-adherent cells were washed out. After 3 weeks, adherent cells were ~70% confluent. Cells were detached with trypsin-EDTA (Sigma, Steinheim, Germany) and seeded at a density of 2.5 x 10³ cells/cm². Cells were passaged once a week. Cultures included in this study were expanded for at least 3 months (i.e., ~12 passages) and up to 2 years (i.e., 96 passages).

Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis. For flow cytometric analysis of *in vitro* expanded MSCs, cells were detached with trypsin-EDTA, washed with PBS, and stained with fluorescent human-specific antibodies conjugated with either phycoerythrin or fluorescein against CD13, 29, 34, 44, 45, 49d, 49e, 51/61, 90, 105, HLA-DR, HLA-class I, and corresponding isotype controls (all purchased from BD-Pharmingen, San Diego, CA) at a concentration of 20 µL for 1 million cells and incubated for 20 min at 4°C. After successive washes with PBS, cells were counted

in a FACS-Scalibur hemocytometer up to 30,000 events. Log-transformed data are shown together with negative controls.

Differentiation culture. For induction of a neuronal phenotype, isolated MSCs were suspended with trypsin-EDTA and seeded in uncoated T75 culture flasks in serum-free culture medium comprised of DMEM, F12, 2 mM L-glutamine, 2% B27 serum supplement, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 0.25 µg/mL amphotericin (all purchased from Gibco), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF, PeproTech, London, UK), and 5 µg/mL heparin (Sigma) and incubated at 37°C in 95% humidity with 5% CO₂ and 21% O₂. Medium was changed every other day, and passages were performed once a week by light mechanical dissociation of the formed spheres. After 1 week, cells were plated at 10,000 cells/cm² on human fibronectin-coated coverslips (Sigma) and placed in 24-well plates under serum-free conditions in medium comprised of MEM (Sigma), 1% N2 serum supplement, 1% sodium piruvate, 2 mM L-glutamine, 4 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 0.25 µg/mL amphotericin, supplemented with 25 ng/mL brain-derived neurotrophic factor (BDNF; R&D Systems, Minneapolis, USA), and/or 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and/or 1 mM cyclic adenosine monophosphate (cAMP; Sigma). In order to block neuronal differentiation, 50 µM Ni (Merck, Darmstadt, Germany), 50 µM Cd (Merck), 5 µM nifedipine (Sigma), or 3.4 nM protein kinase A inhibitor (PKAi) fragment 6-22 amide (Sigma) were added to the media containing cAMP and IBMX during the differentiation period. Medium was changed every other day.

Cell viability assay. To evaluate cell viability during differentiation, we used the Live/dead® Viability/Cytotoxicity kit (Molecular Probes, Karlsruhe, Germany). Cells were processed after 12, 24, 36, and 60 h incubation in differentiation medium. Initially, cells were incubated in darkness for 15 min with Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 2 µL of SYTO 10 green fluorescent nucleic acid stain (Molecular Probes) and 2 µL of ethidium homodimer-2. Afterwards, cells were washed in HBSS, fixed in fresh 4% glutaraldehyde for 15 min at room temperature, and washed again in HBSS just prior to microscopic observation.

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. To analyze BrdU incorporation, we added 10 µM BrdU (Sigma) to the culture medium and washed it out following a 6 h incubation at 37°C. For staining, cells were fixed in fresh 4% paraformaldehyde for 1 h and rinsed with PBS. DNA was denaturated by incubation with 2 M HCl for 1 h at 37°C, followed by acid inactivation with borate buffer, pH 8.5. After successive washes in PBS, cells were blocked and stained with anti-BrdU (1:200, Oxford Biotechnology, Oxford, UK) as a primary antibody and anti-rat goat Alexa-Fluor 488 (1:150, Molecular Probes) as a secondary antibody.

Fixation and immunostaining. Immunostaining of cell cultures was carried out as previously described (Singec et al., 2006). Briefly, culture was fixed in fresh 4% paraformaldehyde, pH 7.2 for 1 h at room temperature. After successive washes in PBS, cells were incubated in blocking solution containing 4% goat serum (Sigma), and 0.1% Triton X-100 (Sigma) in PBS. Cells were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After washing, cells were incubated in secondary antibodies and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 1:10000, Sigma) on a shaker for 1 h at room temperature. Cells were washed in PBS, and

coverslips were embedded with fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark). We used the following primary antibodies and dilutions: anti-MAP2ab (1:200, mouse monoclonal, Chemicon, Temecula, CA), anti-MAP2 (1:600, rabbit polyclonal, Chemicon), anti-GFAP (1:600, rabbit polyclonal, Dako), anti-nestin (1:200, mouse monoclonal or rabbit polyclonal, Chemicon), anti-PSA NCAM (1:200, mouse, monoclonal, Chemicon), anti-SOX2 (1:100, mouse monoclonal, Sigma), anti- β III tubulin (1:400, mouse monoclonal, Sigma, or 1:600, rabbit polyclonal, Covance, Princeton, NJ, USA), anti-neurofilament M, NF-M (1:2000, rabbit polyclonal, Chemicon), anti-Tau (1:50, mouse monoclonal, Abcam, Cambridge, UK), anti-NF200 (1:200, mouse monoclonal, Chemicon), anti-NeuN (1:50, mouse monoclonal, Chemicon), anti-GABA (1:1000, rabbit polyclonal, Chemicon), anti-NeuroD (1:1000, rabbit polyclonal, Chemicon), anti-vimentin (1:1000, mouse monoclonal, Chemicon), anti-human fibroblast (1:200, mouse monoclonal, Chemicon), anti-BrdU (1:200, rat monoclonal, Oxford Biotechnologies), anti-phosphorylated cAMP response element binding (pCREB) protein (1:1000, rabbit polyclonal, Chemicon). The secondary antibodies used were Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit or anti-mouse (1:150, Molecular Probes) and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit or anti-mouse (1:150, Molecular Probes).

Confocal microscopy, quantification, and fluorescence measurement. Images were obtained with a Leica TCS SP2 confocal system (405 nm diode, Ar/ArKr, HeNe 543/594 lasers), with 20x/0.7 or 63x/1.2 objectives, and the airy unit set to 1, were digitized at 2048 x 2048 pixels and assembled with Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). For quantification, 10 consecutive images across the horizontal diameter of each coverslip were systematically scanned from

left to the right for each culture condition. Cells positive for a specific marker were counted relative to the total number of DAPI-stained nuclei by using ViewFinder 2.1 software (ERDAS Imagine, Leica, Norcross, GA, USA). Experiments were done in triplicate, and counting was performed in a double-blind manner. For quantification of the fluorescence signal, regions of interest (ROIs) were defined on the scanned pictures, whereby the entire frame was the first ROI, and a blank region, for determining background fluorescence, was the second ROI. The mean signal intensity was expressed as a value ranging from 0 to 255 per μm^2 . Data were calculated as the difference between the mean values of each ROI, divided by the background fluorescence ($\Delta F/F$).

Electrophysiology. Standard whole-cell patch clamp recording methods were used to examine the physiological properties of cultured human marrow-derived neuronal cells during *in vitro* differentiation. Patch pipettes were made from thick-walled borosilicate glass tubing (2 mm outer diameter, 1 mm inner diameter) and pulled on a Sutter pipette puller (model P97). Pipette resistances ranged from 3 to 5 M Ω . The pipettes were filled with an intracellular saline that consisted of 140 mM KCl, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na₂ATP, and 10 mM Hepes. The standard extracellular recording saline was comprised of 125 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM glucose, 2 mM CaCl₂, and 1 mM MgCl₂ (equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂). Recordings were made under visual control with a phase contrast microscope (Zeiss model IM35, Jena, Germany). Voltage-clamp and current-clamp recordings were obtained by using an Axopatch 200A patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA), filtered at 5-10 KHz and digitized at 10-20 KHz using a 1041plus interface (Cambridge Electronic

Design, Ltd., Cambridge, UK). In voltage clamp mode, Na⁺ and K⁺ currents were evoked by applying 15 voltage pulses of 100 ms duration from a holding potential of -80 mV, starting at -70mV with 10mV increments up to +70mV. To demonstrate the voltage dependence of the activation, peak Na⁺ and K⁺ currents were plotted against the voltage step. The fitting model used for K⁺ conductance used a Boltzmann function as follows:

$$g(v) = \frac{g_{max}}{1 + e^{\frac{(V_{1/2} - V)}{k}}} \quad (1)$$

For Na⁺ currents, the recorded values were fitted to a Boltzmann function multiplied with the Nernst equation as follows:

$$I(v) = \frac{I_{min_{Na}}(V - E_{Na})}{1 + e^{\frac{(V_{1/2} - V)}{k}}} \quad (2)$$

Maximal Na⁺ currents were determined based on the average of 5 consecutive data points at the lowest level of the averaged current trace from 5 protocols. Similarly, the maximal K⁺ current was calculated from 100 data points at the plateau. In current clamp mode, action potentials were induced by clamping the cells at -80mV and applying 10 voltage pulses, starting from -20 pA and increasing to +70 pA at 10 pA increments. Off-line analyses and graphic representations of the data were performed with Igor software, version 5.04 (Wavemetrics, Portland, OR, USA).

Statistical analysis. We first analyzed the distribution of the residues to select the appropriate test. For the cell counting with NF200 staining, we used the logarithmic transformed data to adjust the residues to a Gaussian distribution, which allowed us

to use ANOVA for comparing the means, together with post hoc Dunnett's test for controls or Tukey's HSD test for between group differences. In cases in which the distribution was Gaussian, we used the raw data and compared the means with ANOVA. To analyze correlations between morphology and staining, we determined the Spearman's rho non-parametric coefficient, since the distribution was unknown; and we show the dispersion in ellipse-density graphs. All data are shown as mean $\pm$ SEM. For computation, we used JMP 5.1 Software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Graphs were made with JMP or Igor.

Results

Isolation of stem cells derived from human bone marrow.

We successfully isolated a population of stem cells from human bone marrow. As we previously described, we were able to differentiate the cells into chondrocytes and osteocytes based on responsiveness to TGF β (Mehlhorn et al., 2006a). Furthermore, $98.7 \pm 0.4\%$ of the cells incorporated BrdU during 6 h of incubation (n=3, see supplemental Fig. 2A). Their multipotent and self-renewing properties indicated that the cells were stem cells. During the exponential phase, the calculated doubling time in three consecutive experiments with material from three donors was 121 ± 9 hours. After isolation, cells were flat with large somata and did not have processes (Supplemental Fig. 1B). Using FACS analysis, we observed that the isolated cells expressed high surface levels of HLA-class I, CD13, 29, 44, 49d and 49e, 90, and 105; low levels of the CD51/61 complex; and did not express CD34 or 45. This profile suggests a non-hematopoietic origin (Supplemental Fig. 1).

Expansion of neural precursor cells.

We used a combination of bFGF and EGF in the culture medium, in a similar manner to that currently used for expansion of fetal-derived neural stem cells (NSCs) (Caldwell et al., 2001b). After 1 week, we observed aggregates of cells that closely resembled neurospheres of fetal tissue. The aggregates were positive for many markers of neural stem cells, such as nestin, vimentin, GFAP, the young neuronal transcription factor SOX2, and the neuronal cell adhesion molecule PSA-NCAM (Fig. 1). After plating the aggregates onto poly-L-lysine coated coverslips, some cells began to migrate away from the sphere in a radial manner, similar to that described for NSCs (Caldwell et al., 2001a). The migrating cells assumed a distinct morphology, with small, pyramidal-shaped somata, from which a few ramified processes arose. At that stage, the cells were positive for vimentin, GFAP, β III tubulin, nestin, and PSA-NCAM (Fig. 2). At the end of some of the processes we observed small dilatations that resembled the growth cones of NSCs, from which more ramified neurites grew. Quantification revealed that $97.85 \pm 0.25\%$ of the cells were positive for nestin, and $92.88 \pm 0.38\%$ were positive for β III tubulin (Fig. 4A). The cells were not positive for markers of mature neurons, including MAP2ab, NeuN, Tau, and NF200 (data not shown).

Neuronal differentiation of stem cells derived from the bone marrow.

After a period of 1 week in the presence of bFGF and EGF, which was enough time for morphological changes to appear, cells were plated onto fibronectin-coated coverslips and cultivated in medium containing cAMP and IBMX, which blocks phosphodiesterase, thereby increasing intracellular levels of cAMP. The medium

osmolarity did not significantly increase ($n=3$; 292 ± 2.0 mOsm in basal medium to 309 ± 3.0 mOsm in differentiation medium), and a few microliters of distilled water was sufficient to return osmolarity to previous levels. After 12 h under those conditions, drastic morphological changes were observed in the cells. At this stage, the somata became spherical, the neuritic processes grew longer and more ramified (Fig. 3), and the cells became positive for MAP2ab, NeuN, and NF200. Expression levels of the different markers were quantified before and after differentiation ($\Delta F/F$, without unit). Expression of nearly all neuronal markers increased after differentiation. For example, NF200 increased from 0.12 ± 0.02 to 0.63 ± 0.03 (factor 5.25), NeuN increased from 0.17 ± 0.07 to 0.51 ± 0.04 (factor 3.00), MAP2abc increased from 0.25 ± 0.03 to 0.72 ± 0.03 (factor 2.88), NeuroD increased from 0.31 ± 0.06 to 0.67 ± 0.03 (factor 2.16), MAP2ab increased from 0.42 ± 0.04 to 0.71 ± 0.05 (factor 1.69), β III tubulin increased from 0.71 ± 0.05 to 0.90 ± 0.02 (factor 1.27), and NF-M increased from 0.50 ± 0.04 to 0.62 ± 0.08 (factor 1.24) (Fig. 4B). This was not the case for nestin, which decreased from 0.56 to 0.38 (factor 0.68). The greatest increase we observed was 5.25-fold for NF200. Interestingly, NF200 had the lowest expression levels prior to differentiation. Taken together, the data suggest that NF200 is a good marker for neuronal differentiation. To confirm this, we assessed the relationship between positivity for a given marker and neuronal morphology of the stained cells. We defined a neuron as a cell with a small soma and processes that extended the length of two cell bodies, with secondary ramifications. Based on this definition, we calculated the Spearman's rho correlation coefficient for nonparametric data, since a histogram of the residues revealed a nonparametric distribution (data not shown). We observed a nearly linear relationship between

marker positivity and neuronal morphology for NF200 ($p = 0.9072$), whereas the coefficients for the other markers were considerably smaller (MAP2ab, 0.3935; β III tubulin, 0.5719; NF-M, 0.4041; Tau, 0.6866) (Supplemental Fig. 3).

To analyze the relative influence of each factor added to the culture medium on differentiation, we further quantified NF200 positivity under a basal condition, with BDNF alone, cAMP alone, IBMX alone, IBMX and cAMP together, and IBMX, cAMP, and BDNF together. We counted $0 \pm 0\%$ NF200-positive cells under the basal medium condition ($n=10$ experiments), $2.31 \pm 0.54\%$ with BDNF (versus control in Dunnett's test $p = 0.06$), $2.09 \pm 0.39\%$ with cAMP ($p = 0.03$), $10.75 \pm 1.35\%$ with IBMX ($p = 2.32 \times 10^{-6}$), $15.18 \pm 1.12\%$ with IBMX and cAMP ($p = 2.32 \times 10^{-6}$), and $15.68 \pm 0.91\%$ with a combination of IBMX, cAMP, and BDNF ($p = 2.32 \times 10^{-6}$) (Fig. 5C)

Mechanisms involved in neuronal differentiation.

Considering that optimal differentiation was obtained with a combination of cAMP, IBMX, and BDNF we attempted to impair differentiation by adding PKAi fragment 6-22 amide, and different Ca^{2+} channel blockers to the culture medium, including Cd^{2+} , a non-specific, potent Ca^{2+} channel blocker; Ni^{2+} , a non-specific T-type Ca^{2+} channel blocker; and nifedipin, a selective L-type Ca^{2+} channel blocker. We counted $15.68 \pm 0.91\%$ of NF200-positive cells for controls incubated with IBMX, cAMP, and BDNF, $5.73 \pm 0.42\%$ when PKAi was added to the control medium ($p = 2.418 \times 10^{-4}$ with Dunnett's test against control), $0 \pm 0\%$ for Cd^{2+} ($p = 2.32 \times 10^{-6}$), $5.79 \pm 0.98\%$ for nifedipin ($p = 2.718 \times 10^{-5}$), and $7.06 \pm 1.08\%$ ($p = 3.0 \times 10^{-4}$) for Ni^{2+} (Fig. 5D). The results confirmed that the profound morphological and

immunocytochemical changes we observed were not due to non-specific mechanisms or technical problems. Rather, the changes represented a specific cascade of events that was dependent upon the PKA pathway and intracellular Ca^{2+} concentration.

Time course of differentiation.

To determine if differentiation was a permanent or transitory event in cultivated mesenchymal cells, we counted NF200-positive cells at 12, 24, 36, and 60 h after incubation in differentiation medium. Surprisingly, we found that the yield of differentiated cells, which was zero at the time zero, increased to $16.76 \pm 2.31\%$ after 12 h and decreased to $12.71 \pm 2.20\%$ at 24 h, $10.65 \pm 2.12\%$ at 36 h, and $4.99 \pm 0.93\%$ at 60 h (Fig. 5A). Furthermore, the total number of cells remained constant throughout the observation period, indicating either that differentiated cells underwent de-differentiation, or died at the same rate that new cells were generated. To clarify this point, we assessed the viability of the differentiating cells with SYTO 10 green fluorescent nucleic acid stain, which is a highly permeant dye that stains all cells, including those with intact plasma membrane, and ethidium homodimer-2, which is a cell-impermeant red fluorescent nucleic acid stain that labels only cells with compromised membranes. Interestingly, we observed peak cell mortality 36 h after incubation in differentiation medium that predominantly involved cells with neuronal morphology. Specifically, $1.38 \pm 0.59\%$ of the cells were degenerating at 12 h, $1.76 \pm 0.62\%$ were degenerating at 24 h (Tukey's test, $p = 0.9995$ compared to 12 h), $28.54 \pm 4.30\%$ were degenerating at 36 h ($p = 1.106 \times 10^{-5}$ compared to 24 h), and $9.31 \pm 1.76\%$ were degenerating at 60 h ($p = 3.792 \times 10^{-5}$ compared to 36 h) (Fig. 5B). Taken together, the results indicated that the majority of neuronal cells

died after 36 h, and new cells were generated at a similar rate. The degeneration of neuronal cells was responsible for the decrease in the percentage of NF200-positive cells after 24 h.

Increased levels of pCREB during differentiation.

We were interested in knowing the mechanisms by which cAMP and PKA pathways promote neuronal differentiation. It is well described that neurogenesis in the dentate gyrus involves activation of pCREB protein (Nakagawa et al., 2002b). We wondered if a similar mechanism was active in cultivated MSCs. Thus, we cultivated cells with standard differentiation medium or basal medium and fixed and stained the cultures for pCREB. Fluorescence measurements ($\Delta F/F$) of the two cultures revealed increased expression of pCREB in the differentiated medium culture compared to the basal medium culture (68 ± 4 in differentiation medium and 29 ± 5 in basal medium, Tukey's test, $p = 0.00047$).

Electrophysiological properties of neuronal cells derived from bone marrow.

Based on our results, one could imagine that the differentiated cells died because they reached a final maturation stage at which maintenance in culture is extremely complicated, in part due to higher metabolic needs of the neuronal cells. To address the question of the extent to which MSCs differentiate, we performed patch clamp experiments in whole cell configuration. We recorded Na^+ and K^+ currents with voltage-dependent activation resembling that of neuronal cells (Fig. 7). The mean peak Na^+ current was 119 ± 52 pA, and the mean peak K^+ current was 825 ± 249 pA. On the other hand, the magnitude of the evoked currents was 10 times smaller in

MSCs than evoked currents in mature neurons. Additionally, we failed to observe firing activity or spontaneous synaptic currents or potentials. Therefore, despite the relatively mature differentiation stage that cells reached based on the morphological and immunocytochemical data, the electrophysiological results prevent us from concluding that the cells were fully mature neurons. The dissociation between immunocytochemistry and electrophysiology emphasizes the importance of functional criteria for determining neuronal differentiation.

Discussion

The first reports of isolating stem cells from bone marrow date to the early 1980s (Ohgushi et al., 1989;Lennon et al., 1983). In those reports, the authors described the importance of serum in the culture medium. Serum accounts for selective attachment of bone marrow cells to the plastic culture flasks and promotes optimal mitotic expansion and maintenance of cells in an undifferentiated state (Haynesworth et al., 1992). The protocol used in the present study was adapted from (Pittenger et al., 1999) and is based on the ability of stromal cells to adhere to the culture flask. Pittenger et al. (1999) described precisely the rate of stromal cell growth, their multipotency, and their phenotype patterns by using FACS-analysis. According to our results, which are in agreement with those previous reports, isolated MSCs express many molecules from the β -integrin family, such as CD29, 44, 49d, and 49e, which are responsible for the adherence properties. Furthermore, after 3 weeks in culture, isolated adherent cells were negative for CD34 and CD45. Thus, they were considered non-hematopoietic. After an additional 1 week of culture with bFGF and EGF, $97.85 \pm 0.25\%$ of the cells expressed nestin, a marker of neuroepithelial

progenitor cells. Thus, we assume that our protocol is adequate for proper isolation of MSCs. Furthermore, under the conditions we used, additional expensive and time-consuming procedures for separating non-hematopoietic cells or nestin-positive cells could be dispensed, which was not the experience of others (Wislet-Gendebien et al., 2005).

The previously reported (Kabos et al., 2002) bFGF- and EGF-induced expansion of marrow-derived neuronal precursors as spheres, closely resembles the expansion procedure for NSCs from fetal tissue. Furthermore, the similarities in immunocytochemical and morphological properties of NSCs and those of MSCs reported here suggest that a common differentiation mechanism is responsible for neuronal development in different stem cell populations. The present results provide some insight into what those mechanisms might be. Importantly, we demonstrated changes in the morphological, immunocytochemical, and electrophysiological properties of cells that were associated with neurodifferentiation. The changes were not a consequence of osmotic changes in the culture medium, as previously proposed (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004), but rather a specific mechanism dependent upon the PKA pathway (i.e., differentiation was impaired when PKAi was added to the medium) and Ca^{2+} influx (i.e., Ca^{2+} channel blockers reduced the number of neuronal cells). Furthermore, a change in medium osmolarity did not explain the alterations in immunostaining patterns that we observed.

When assessing neuronal differentiation of MSCs, care must be taken to select an ideal neuronal marker. Here we demonstrated for the first time that some markers that have been used as neuronal markers are, in fact, inadequate to determine a neuronal phenotype. For instance, β III tubulin is expressed in cells without a typical

neuronal morphology. It has also been reported that MSCs express genes and proteins from the three embryonic layers in the early stages of maturation (Woodbury et al., 2002; Lee et al., 2003), and this may be misinterpreted as evidence that the cells are differentiating. In fact, many markers were present prior to differentiation. However, they increased as differentiated cells matured. In order to avoid misinterpretation, it is important to adopt morphological, immunocytochemical, and electrophysiological criteria for assessing neuronal maturation. Only by doing so will it be possible to compare the differentiation potential of MSCs to that of other stem cells. In this sense, we attempted to mathematically determine the specificity of different markers for our specific proposes. To that end, we calculated a correlation coefficient for neuronal morphology and marker positivity and chose NF200 as the standard neuronal marker. NF200 is expressed late in cell maturation and later in relation to neurofilaments of low and medium molecular weigh.

We investigated possible mechanisms involved in cell maturation and found that the addition of IBMX to the culture media substantially increased the yield of neuronal cells and that cAMP had a small additional effect. In differentiation protocols published to date, a mixture of cytokines and growth factors is typically added to the culture medium, without considering the contribution of each substance to the final effect. In the present study, we addressed this issue in a systematic manner, and we demonstrated the neurogenic contribution of cAMP in MSC cultures, and the dependence of differentiation upon PKA and Ca^{2+} . Additionally, we described phosphorylation of CREB during differentiation. CREB is a transcription factor that binds cAMP, and its transient phosphorylation parallels neuronal

differentiation in the olfactory bulb of mice, increasing during the late phase of tangential migration and decreasing after dendrite elongation and spine formation (Giachino et al., 2005). Activation of the cAMP-CREB transcription pathway is known to promote proliferation, differentiation, and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus (Nakagawa et al., 2002a; Nakagawa et al., 2002b). Nevertheless, the effects of cAMP on cell maturation gradually decreased during the first 3 days of observation. cAMP is downregulated by most cells through many different mechanisms. Additionally, cAMP is an important inducer of cell death. The reduction of the neuronal cell population that we observed at late stages in our cultures was a result of increased cell death that was most likely due to the apoptotic effect of cAMP. Factors that might impair this effect remain to be clarified.

It is well known that synaptic contact and electrical excitability exert an important trophic effect on differentiating cells (Deisseroth et al., 2004). Thus, it is reasonable to believe that implanting MSCs in the brain could positively influence maintenance of the differentiated state. Using this strategy, some authors have reported amelioration of neurological deficits in rodents with experimental brain ischemia (Zhao et al., 2002; Li et al., 2005). Nevertheless, unequivocal demonstration of restoration of the cortical pyramidal motor pathway is still lacking. Bai et al., 2007 proposed that the functional recovery seen in animal models of ischemia transplanted with MSCs was due to the trophic activity of MSCs on local neurogenesis, through the release of unidentified soluble factors, rather than neuronal differentiation of the implanted cells. In conclusion, the potential for MSCs to differentiate into neurons remains a central issue in the field of neurorestoration.

As far as we know, ours is the first study to evaluate neuronal differentiation of MSC electrophysiologically in a monoculture system and rule out the possibility that neuron-like activity in marrow-derived cells resulted from fusion with mature neuronal cells added in the culture. In co-culture systems, the neuronal phenotype can occur through incorporation of genomic material of neurons, which leaves the question of whether or not neuronal differentiation is an intrinsic property of mesenchymal stem cells open for consideration. Interestingly, we found that MSCs differentiated into neurons, but were limited in that they expressed voltage dependent ion channels but were unable to generate action potentials or form functional synaptic contacts. Our findings give new insight into the topic of neurorestoration based on mesenchymal stem cells, and further experiments are needed to clarify under what conditions mesenchymal stem cells alone can give rise to functional neurons, if they can do so.

Based on the current results, the use of MSCs for neuroregenerative purposes deserves further study. To this end, efforts directed toward understanding the mechanisms of neuronal differentiation and identifying the genes that are activated during neuronal differentiation could lead to the production of cell lines that over express the genes of interest and increase the yield of mature neurons in culture systems. Accordingly, it is important to describe the potential and limitations of a given stem cell line, in order to advance toward the goal of neurorestoration.

Bibliography

1. Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH (2007) Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res* 32:353-362.
2. Black IB, Woodbury D (2001) Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis* 27:632-636.
3. Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN (2001) Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19:475-479.
4. Dass B, Olanow CW, Kordower JH (2006) Gene transfer of trophic factors and stem cell grafting as treatments for Parkinson's disease. *Neurology* 66:S89-103.
5. Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535-552.
6. Giachino C, De MS, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schutz G, Fasolo A, Peretto P (2005) cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:10105-10118.
7. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88.

8. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM (2003) Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1:11854-11860.
9. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
10. Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL, Yu JS (2002) Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. *Exp Neurol* 178:288-293.
11. Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS (2002) Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport* 13:1185-1188.
12. Lee J, Elkahoul AG, Messina SA, Ferrari N, Xi D, Smith CL, Cooper R, Jr., Albert PS, Fine HA (2003) Cellular and genetic characterization of human adult bone marrow-derived neural stem-like cells: a potential antiglioma cellular vector. *Cancer Res* 63:8877-8889.
13. Lennon DP, Osdoby P, Carrino DA, Vertel BM, Caplan AI (1983) Isolation and characterization of chondrocytes and non-chondrocytes from high-density chick limb bud cell cultures. *J Craniofac Genet Dev Biol* 3:235-251.
14. Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M (2005) Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 49:407-417.

15. Lindvall O, Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441:1094-1096.
16. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH (2004) Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 77:174-191.
17. Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP (2006) Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng* 12:1393-1403.
18. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B (2003) Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1364-1369.
19. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Chen J, Fujioka T, Malberg J, Tsuji S, Duman RS (2002a) Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci* 22:9868-9876.
20. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS (2002b) Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22:3673-3682.
21. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I (2004a) Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 77:192-204.

22. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI (1989) Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 60:334-339.
23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
24. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.
25. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247-256.
26. Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhah G, Frotscher M, Snyder EY (2006) Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* 3:801-806.
27. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B (2005a) Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 23:392-402.
28. Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B (2005) Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull* 68:95-102.

29. Woodbury D, Reynolds K, Black IB (2002) Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 69:908-917.
30. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370.
31. Wurmser AE, Gage FH (2002) Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 416:485-487.
32. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174:11-20.
33. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM (2003) Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17:1146-1149.

Figure legends

Figure 1. Clonal expansion of neuronal precursor cells. Isolated mesenchymal stem cells cultivated for at least 1 week in the presence of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor gave rise to spherical structures similar to the neurospheres observed in clonal expansion of fetal neural stem cells. The cell aggregates were positive for SOX2, PSA-NCAM, nestin, β III tubulin (Tuj-1), GFAP, and vimentin. Green is Alexa Fluor®-488, red is Alexa Fluor®-594, blue is DAPI. Scale bars = 40 μ m.

Figure 2. Neuronal precursor cells derived from mesenchymal stem cells. Spheres cultivated in the presence of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor were plated on poly-L-lysine coated coverslips, fixed, and immunostained 2 h after plating. During that time, some cells migrated from the core of the spheres, adhered to the surface, and assumed a morphology that differed from the original mesenchymal cells. The somata became pyramidal, and two to three short processes with few ramifications formed. Arrows indicate terminal dilatation of the processes, so called growth cones, from which more robust ramifications formed. Green is Alexa Fluor®-488, red is Alexa Fluor®-59, and blue is DAPI. Scale bars = 20 μ m.

Figure 3. Neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. After neuronal induction by cultivation in basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor for 1 week, cells were cultivated in the presence of cAMP and IBMX for 3 d, fixed,

and immunostained. Compare with Fig. 2. Note the drastic morphological changes in the cells. The somata became smaller, and long, ramified processes formed from growth cones. At that stage, cells were positive for β III tubulin and later became positive for MAP2ab, NeuN, NF-M, and NF200. Most of the differentiated cells were positive for GABA. Note that the markers differ in their specificity for cells with typical neuronal morphology. β III tubulin stained neuronal and non neuronal cells, NF200 was restricted to cells with long, ramified processes. Green is Alexa Fluor®-488, red is Alexa Fluor®-59, and blue is DAPI. Scale bars = 50 μ m.

Figure 4. Immunocytochemical changes after differentiation. Expression of neuronal markers changed during neuronal induction and differentiation. In **A**, cultures were fixed after induction of the neuronal phenotype by cultivation in basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor for 1 week. Cells positive for nestin and β III tubulin were counted, and the result was expressed as percentage of the total number of cells, estimated with DAPI. $97.85 \pm 0.25\%$ of the cells were positive for nestin, and $92.88 \pm 0.38\%$ of the cells were positive for β III tubulin at the onset of differentiation. In **B**, the fluorescence intensity signal was measured and expressed as $\Delta F/F$ (See Materials and Methods) before and after differentiation in the presence of cAMP and IBMX for 3 d. The following markers were evaluated: MAP2ab, β III tubulin, nestin, NF-M, NeuN, NeuroD, NF200, MAP2. The numbers over the bars indicate the factor by which expression levels increased or decreased. They were obtained by dividing signal intensity after differentiation by the signal intensity before differentiation. With the exception of nestin, the signal intensity increased for all markers, with NF200 showing the greatest increase. Additionally,

NF200 had the lowest signal intensity (0.12 ± 0.02) prior to differentiation, confirming the specificity of the marker for neuronal cells.

Figure 5. Differentiation time course and mechanisms involved. **A**, NF200 positivity was evaluated during the first 3 d in differentiation medium. Cultures were fixed and stained at 12, 24, 36, and 60 h. The total number of cells was determined with DAPI. The percentage of NF200 positive cells decreased from $16.76 \pm 2.31\%$ at 12 h to $4.99 \pm 0.93\%$ at 60 h. The decrease could not be explained by greater mortality of all cell types, since the total number of cells remained constant. **B**, Mortality of cultured cells was assessed. At 36 h cell mortality increased to $28.54 \pm 4.30\%$ and gradually decreased to $9.31 \pm 1.76\%$ by 60 h. Cells with a typical neuronal morphology were primarily, but not exclusively, affected. **C**, Box plots showing quantification of NF200 positive cells under different culture conditions. Note that there was 0% positive cells in basal medium, and NF200 positive cells reached a maximum when cAMP and IBMX were added to the culture medium. Outliers are identified by circles. **D**, Box plots showing impaired differentiation when protein kinase A inhibitory fragment, or Ca^{2+} channel blockers (Ni, nifedipin, Cd) were sequentially added to the medium. Outliers are identified by circles.

Figure 6. Electrophysiology of neuronal cells derived from mesenchymal stem cells. After addition of cAMP and IBMX to the medium, cultures were transferred to a recording chamber. **A**, Voltage clamp stimulation protocol. Patched cells were clamped at -80 mV and 15 pulses of 100 ms duration with increasing intensity (-70 mV to +70 mV in 10 mV increments) were applied (upper panel). We recorded

evoked inward (Na^+) and outward (K^+) currents (lower panel). **B**, Current-voltage relationship for the inward Na^+ current, showing maximal activation at +10 mV. The smooth trace represents the fitting model (i.e., Boltzmann multiplied with Nernst equation). **C**, Activation of K^+ conductance and its voltage dependence, fitted to a Boltzmann function. **D**, Maximal Na^+ and K^+ currents evoked in six cells.

Figure 7. Expression of phosphorylated cAMP response element binding (pCREB) protein increases during differentiation. **A**, Immunostaining with anti-pCREB antibody before differentiation. **B**, The same staining procedure performed in parallel with a sister culture and differentiated for 3 d in the presence of cAMP and IBMX demonstrated increased expression of pCREB. **C**, Fluorescence signal intensity was quantified in three experiments and expressed as $\Delta F/F$ (See Materials and Methods) before and after differentiation. Green is Alexa Fluor®-488, scale bars = 150 μm .

Supplemental Material

Figure 1. FACS analysis of stem cells isolated from human bone marrow.

Marrow was obtained through an iliac crest puncture in healthy human donors. The cell suspension was centrifuged, and the mononuclear cell layer was cultivated for an additional 3 weeks. A homogeneous cell population was selected by adherence to the culture flask. After isolation, cells were suspended and stained with antibodies against superficial markers and counted in an FACS-Scalibur® hemocytometer up to 10,000 events. Traces shown are from one representative experiment. Cells were positive for HLA class I, CD44, CD49d and e, CD13, 105, 29, and 90 and partially positive for CD51/61 and negative for CD34, 45, and HLA-DR.

Figure 2. Stem cell-like properties of mesenchymal cells isolated from human bone marrow.

A, 10 μ M bromodeoxyuridine (BrdU) was added to the culture medium for 6 h, and cells were subsequently fixed and immunostained for vimentin (red), which stains mesenchymal stromal cells, and BrdU (green). Quantification with confocal microscopy revealed that $98.7 \pm 0.4\%$ of the cells incorporated BrdU during the 6 h incubation. **B**, General appearance of the stromal cells isolated from bone marrow. Compare with the morphology of the same cells in late stages of the differentiation process shown in Figures 1, 2, and 3 of the main text. Note that the large, flat somata do not have processes. Scale bar = 50 μ m.

Figure 3. Specificity of the neuronal markers. In order to verify the specificity of commonly used neuronal markers, we performed Spearman's rho correlations for

positivity for each marker and typical neuronal morphology. Marker-positive cells and cells with small soma and long, ramified processes were counted. The higher the correlation coefficient, the stronger the relationship between marker positivity and typical neuronal morphology. Results are plotted in ellipse density graphs, in which the red trace represents the 95% confidence interval expected for the distribution. Note the nearly diagonal distribution for NF200 (narrower ellipse) and its high coefficient (0.9072), demonstrating the higher specificity of NF200 for differentiating neurons. Based on these data we used NF200 for further quantification, as shown elsewhere.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Supplementary Info- Figure 1

Supplementary Info- Figure 2

Supplementary Info- Figure 3