

Cynthia Elim Jannes Lepski

**Sobrevivência, integração e diferenciação neuronal de células-tronco
mesenquimais murinas da medula óssea em ratos normais**

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

Programa de: Neurologia

**Orientadora: Profa. Suely Kazue Nagahashi
Marie**

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lepski, Cinthia Elim Jannes

Sobrevivência, integração e diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea em ratos normais / Cinthia Elim Jannes Lepski. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Transplante de células-tronco mesenquimais 2.Células-tronco
3.Diferenciação celular 4.Hipocampo 5.Sobrevivência celular 6.Ratos

USP/FM/DBD-122/10

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. 2^a.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 você Guilherme,
meu amigo, parceiro e amor,
por me fazer acreditar que tudo é possível,
pela sua inquietude,
por ter iniciado o caminho.*

*À Nina e ao Julian,
os nortes da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Guilherme Alves Lepski, parceiro inseparável e principal responsável pelo meu início na vida científica, pela parceria e orientação durante todo o projeto, por acreditar que sempre podemos nos superar.

Ao Prof. Dr. med Guido Nikkhah, por ter não só apoiado este projeto, como também ter me recebido tão calorosamente em seu grupo de pesquisa, pelo acompanhamento e orientação do trabalho, sempre me motivando e me dando total respaldo e apoio.

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, por ter aceito o desafio dessa idéia, pela orientação primorosa, por ter me incentivado tão bravamente na minha formação científica.

À Dra. Sueli M. Oba, colega e amiga, que além da excelente contribuição científica me deu o prazer de sua convivência, ética e sabedoria.

Às colegas do Lim 15, Roseli, Mazé, Renata, Mussia, Myuke, pelo maravilhoso ambiente de trabalho, pela troca de conhecimento e pela ajuda em todas as adversidades.

À 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.

Ao Dr. Bryan Eric Strauss, pela doação dos lentivírus eGFP usados nesse projeto.

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.

À minha mãe, Carmen, por estar sempre do meu lado nos momentos que mais precisei, por ser tão grande no seu amor e por nunca me deixar desistir.

À Zilda, Sonia, Roberto, Carla e Stefan pelo carinho e apoio incondicional.

Aos amigos Sandra e Cássio, pela inestimável amizade e pela contribuição sempre crítica ao projeto.

Aos amigos Silvia e Alexandre, pela ajuda e acolhida durante a qualificação e defesa, pelo anorme carinho e apoio.

Aos amigos e colegas Eder Santos, André Messias, Roberto Portz, Carla Celedônio, Cleberson Fernandes, Sabrina Pancera, James Varela, Helena Nunes, Luiraima Salazar, Claudia Schallenmüller e Sebastian Ens, Esther e Marcelo Bertazzo, Sabrina Bettio e Kristofer Ramina, Cristina e Francesco Dellaqua, pela agradável e memorável convivência numa terra estrangeira.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Histórico da neurogênese	6
2.1.2 Neurogênese em mamíferos adultos	8
2.2 Perspectivas históricas sobre transplante neural	12
2.3 Fontes de célula-tronco em investigação	14
2.3.1 Célula-tronco neural fetal.....	14
2.3.2 Célula-tronco embrionária	16
2.3.3 Célula-tronco pluripotente induzida.....	17
2.3.4 Célula-tronco mesenquimal adulta.....	19
2.3.4.1 Transplante de célula-tronco mesenquimal em modelos de doenças neurológicas	21
2.3.4.1.1 Isquemia cerebral	21
2.3.4.1.2 Lesão medular	22
2.3.4.1.3 Neurooncologia.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção de células-tronco da medula óssea.....	25
3.2 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais.....	26
3.3 Transfecção lentiviral.....	27
3.4 Diferenciação neuronal <i>in vitro</i>	28
3.5 Implante estereotáxico	30
3.5.1 Preparação dos capilares	30
3.5.2 Preparação cirúrgica.....	31
3.6 Manutenção dos animais	35
3.7 Perfusão e corte histológico	38
3.8 Imunohistoquímica de fluorescência	38
3.9 Microscopia confocal	40
3.10 Estereologia.....	41
3.11 Análise estatística.....	42
4. Resultados	44
4.1 Isolamento e caracterização de CTMs murinas	44
4.2 Transfecção lentiviral.....	44
4.3 Diferenciação neuronal <i>in vitro</i>	46
4.4 Diferenciação neuronal <i>in vivo</i>	48
4.4.1 Análise imunohistoquímica descritiva	48
4.4.2 Análise estereológica	52
4.4.2.1 Análise da diferenciação em função do alvo.....	58
4.4.2.2 Análise da diferenciação em função da sobrevivência	59
4.4.2.3 Análise da diferenciação em função do estágio de evolução.....	60
4.4.2.3.1 nas duas regiões implantadas	60
4.4.2.3.2 no hipocampo	62
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	73

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8. ANEXOS	
Anexo 1 - “English version”	96
Anexo 2 - Quantificação de células NeuN-GFP+ no hipocampo x estriado dos ratos implantados	132
Anexo 3 - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq).....	142

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

®	marca registrada
AMPe	adenosina-monofosfato cíclico
B27	suplemento sérico
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BMR	banda migratória rostral
BrdU	5-bromo 3'-deoxiuridina
bFGF	fator de crescimento básico de fibroblasto
CA3	cornu de Amon 3
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTM	célula-tronco mesenquimal
CTN	célula-tronco neural
DAPI	4'6'-Diamidina- 2' fenilindol-dihidrochlorido
Dcx	doblecortina
DNA	ácido desoxiribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
E14	embrião com 14 dias de vida
EGF	fator de crescimento epitelial
F12	suplemento de Ham
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FGF8	<i>fibroblast growth factor 8</i>
GABA	ácido gama-amino-butírico
GD	giro denteado
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Hip	hipocampo
HIV	<i>Vírus da imunodeficiência humano</i>
HPLC	<i>high pressure liquid cromatography</i>
IBMX	<i>3-Isobutyl-1-methylxanthin</i>
iPS	célula-tronco pluripotente induzida
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>

MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MEM	<i>minimal essencial medium</i>
MSCBM	<i>mesenchymal stem cell basal medium</i>
Neu N	<i>neuronal nuclear protein</i>
NF 200	neurofilamento de 200 KD (Kilodaltons)
PBS	<i>phosphated buffered saline</i>
piPSCs	proteínas-indutoras de células-tronco pluripotentes induzidas
PSA	penicilina-estreptomicina-anfotericina
PSA-NCAM	<i>poly-sialylated- neuronal- cell-adhesion molecule</i>
rpm	rotações por minuto
RSV	região subventricular
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SNC	sistema nervoso central
Str	estriado
TH	tirosina-hidroxilase
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Tuj-1	β III tubulina (microtúbulo neuronal)
RSG	região subgranular
RSV	região subventricular

Unidades de medida seguem a padronização do Sistema Internacional de Unidades.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração de novos interneurônios no bulbo olfatório a partir de células-tronco da região subventricular (RSV).....	11
Figura 2: Geração de novos neurônios granulares no giro dentado do hipocampo, ou na região subgranular	12
Figura 3: Extração de células-tronco mesenquimais(CTMs) de ratos Sprague-Dowley. A e B: ressecação dos fêmures e tíbias.....	26
Figura 4: Transplante de CTMs.....	32
Figura 5: Gaiolas de enriquecimento.....	36
Figura 6: Banda migratória rostral de ratos com 8 semanas	37
Figura 7: Destaque do estriado e giro dentado do hipocampo em corte com marcação com DAPI.	42
Figura 8: CTMs vistas em microscópio invertido.....	44
Figura 9: Eficiência da transfecção lentiviral em CTMs <i>in vitro</i>	45
Figura 10: Expansão e neurodiferenciação das CTMs <i>in vitro</i>	47
Figura 11: Implante de CTMs no estriado e no hipocampo.....	49
Figura 12: Local do implante das CTMs na região do estriado.....	50
Figura 13: Cortes de cérebro de rato implantado com CTMs na região do estriado.	51
Figura 14: Córtex pré-frontal de rato implantado com CTMs no estriado.	52
Figura 15: Cortes de cérebros de animais implantados com CTMs no hipocampo....	52
Figura 16: Corte do córtex temporal de rato implantado com CTMs no hipocampo.	53
Figura 17: Microscopia confocal mostrando células neuronais maduras duplamente positivas para NeuN e GFP na região CA1 do hipocampo.....	54
Figura 18: Microscopia confocal mostrando células neuronais maduras duplamente positivas para Neurofilamento 200 e GFP no hipocampo.....	54
Figura 19: Microscopia confocal demonstrando síntese de neurotransmissor GABA.....	55
Figura 20: Microscopia confocal ilustrando síntese de neurotransmissor glutamato	55
Figura 21: Diferenciação das CTMs em função do alvo de implante.....	58
Figura 22: Diferenciação das CTMs em função da sobrevivência.....	59
Figura 23: Diferenciação das CTMs em função do estágio de evolução.....	61
Figura 24: Diferenciação das CTMs em função do estágio de evolução somente no hipocampo.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ratos implantados.....	34
Tabela 2: Anticorpos primários e secundários	40
Tabela 3: Contagem das células transplantadas (NeuN-GFP-positivas)	57

RESUMO

LEPSKI, C.E.J. **Sobrevivência, integração e diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea em ratos normais.** São Paulo, 2010. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Introdução. A possibilidade de restauração do Sistema Nervoso Central representa um desafio em Neurociências, e a integração bem sucedida de células-tronco no cérebro adulto tem se tornado um importante objetivo. **Objetivo.** Testar a hipótese de que a sobrevivência e diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTMs) sejam dependentes de condições microambientais de acordo com o alvo de implante no cérebro. **Métodos.** CTMs foram isoladas de ratos adultos e geneticamente modificadas por meio de transfecção lentiviral para expressarem GFP. O fenótipo neuronal foi satisfatoriamente induzido *in vitro*. Uma suspensão de células foi implantada estereotaxicamente no cérebro de 40 ratos da mesma linhagem, em uma área neurogênica (hipocampo) e outra não-neurogênica (estriado). Os animais foram sacrificados 6 e 12 semanas após a cirurgia, e os cérebros foram corados com marcadores de neurônios maduros. Células co-expressando NeuN e GFP foram contadas estereologicamente nos dois alvos. **Resultados.** A população de célula isolada foi capaz de gerar $14,5 \pm 1,1$ % de neurônios NF200-positivos *in vitro*. Uma vez implantados no hipocampo, as células migraram além do enxerto e geraram neurônios maduros (1634 ± 231 células GFP/NeuN+). Por outro lado, maciça degeneração celular foi vista no estriado, onde não ocorreu migração significativa, sendo que somente 108 ± 24 NeuN/GFP+ neurônios ($p < 0.001$) foram contados. **Conclusão.** Nossos dados demonstraram que a sobrevivência e diferenciação de CTMs são altamente dependentes do sítio de implante no cérebro hospedeiro, indicando assim a importância de um microambiente permissivo. Futuros estudos para identificação dos fatores pró-neurogênicos presentes no hipocampo poderão subsequentemente permitir a integração de células-tronco em áreas do SNC não-permissivas, assim contribuindo para se alcançar o objetivo de introduzir a restauração do SNC na prática clínica.

Descritores: transplante de células-tronco mesenquimais, células-tronco, diferenciação celular, hipocampo, sobrevivência celular, ratos.

SUMMARY

LEPSKI, C.E.J. **Neuronal survival, integration and differentiation of mesenchymal stem cells in normal rats.** Sao Paulo, Brazil. Laboratory of Molecular Biology, Department of Neurology, University of Sao Paulo.

The possibility of CNS restoration represents a challenge in Neuroscience, and the successful integration of stem cells in adult brain has become an important goal. The working hypothesis of the present study is that survival and neurodifferentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) may be dependent upon microenvironmental conditions according to the site of implant in the brain. **Methods:** MSCs were isolated from adult rats and labeled with eGFP lentivirus. The neuronal phenotype was successfully induced *in vitro*. A cell suspension was implanted stereotactically into the brain of 40 young rats of the same strain, in neurogenic (hippocampus) and non-neurogenic (striatum) areas. Animals were sacrificed six or twelve weeks after surgery, and brains were stained for mature neuronal markers. Cells co-expressing NeuN-GFP were counted stereologically at both targets. **Results:** The isolated cell population was able to generate $14.5 \pm 1.1\%$ of NF200⁺-neurons *in vitro*. Once implanted into the hippocampus, cells migrated away from the graft and gave rise to mature neurons (1634 ± 231 cells GFP/NeuN⁺). By contrast, massive cell degeneration was seen in the striatum, with no significant migration, while only 108 ± 24 NeuN/GFP⁺ neurons ($p < 0.001$) were counted. **Conclusions:** Our data demonstrated that survival and differentiation of MSCs are strongly dependent upon the site of implant in the brain, thus indicating the importance of a permissive microenvironment. Future studies for identification of the pro-neurogenic factors present in the hippocampus could subsequently allow the integration of stem cells into non-permissive areas of the CNS and thus contribute for the challenging goal of introducing CNS repair in the clinical practice.

Descriptors: mesenchymal stem cells transplantation, stem cells, cell differentiation, hippocampus; cell survival, rats.

1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças neurológicas acarretam incapacitação importante, contra a qual não se dispõe de qualquer tratamento efetivo. Dentre elas destacam-se a doença de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington, o acidente vascular cerebral, a dor neuropática crônica e a lesão medular. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas para essas condições, objetivando-se melhora clínica após transplante de células-tronco. Tais células podem ser obtidas da camada interna de blastocistos (células embrionárias), de encéfalo de fetos (células fetais), de tecido maduro neuronal (substância periventricular ou giro denteado do hipocampo) ou de tecido maduro não-neuronal (medula ósea) (Tabar e cols., 2002). Quanto ao tecido fetal, esse pode ser implantado logo após sua extração (também chamado de tecido primário, que contém, além de células-tronco, progenitores e células maduras), ou após o isolamento de células-tronco por meio de cultivo celular com fatores de crescimento. Cada fonte de células aqui considerada apresenta suas vantagens e desvantagens.

As células fetais primárias são capazes de sobreviver no cérebro hospedeiro e de gerar neurônios maduros, que por sua vez geram axônios longos que podem atingir estruturas relativamente distantes, gerar novas sinapses e liberar neurotransmissores como dopamina, além de promover reinervação do corpo estriado desnervado, o que explica a melhora em testes comportamentais usados para a avaliação do modelo animal de Parkinson (Nikkhah e cols., 1995a; Nikkhah e cols., 1995c; Nikkhah e cols., 1993). Alguns ensaios clínicos em humanos parkinsonianos implantados com mesencéfalo fetal mostraram haver significativa

melhora dos sintomas motores e da captação de F18-fluordopa no estriado (Freed e cols., 2001; Lindvall O., 1997; Piccini e cols., 2005). Todavia, o uso de tecido fetal humano para fins terapêuticos é impraticável, não apenas pelo alto número de embriões necessários, mas também pela logística necessária e pelas numerosas limitações éticas que se impõem. Não obstante, procura-se há muito tempo contornar essas dificuldades e promover neurorestauração usando-se outras fontes de células.

Em 1992, uma população de células-tronco neurais foi isolada do encéfalo de ratos adultos (Reynolds e cols., 1992), o que foi possível por meio de cultivo celular com EGF (fator de crescimento epitelial) e bFGF (fator de crescimento básico de fibroblasto). Esse método permitiria o isolamento de células-tronco do tecido neural adulto para fins terapêuticos, que poderiam ser usadas em auto-transplantes. Porém, se coloca a questão de quão freqüente seria o processo de neurogênese num encéfalo já acometido por uma afecção degenerativa.

Outros autores observaram que a densidade de células-tronco e progenitores neurais é muito maior no encéfalo em desenvolvimento, durante o período intra-uterino (Shetty e cols., 1999), sendo muito mais fácil o seu isolamento nesta fase. Esta descoberta foi importante no sentido de se permitir a expansão clonal de células-tronco neurais, diminuindo assim a necessidade de múltiplos embriões para um transplante bem sucedido, embora não se contorne o problema ético envolvido no uso de embriões humanos provenientes de aborto para pesquisa. Além disso, o potencial de neurogênese a partir dessas células diminui a favor de gliogênese, à medida em que se aumenta o tempo em expansão (Whittemore e cols., 1999).

Uma outra linha de pesquisa, bastante promissora, envolve a tentativa de neurorestauração utilizando células-tronco embrionárias, obtidas da camada interna de blastocistos. Como células primordiais totipotentes, o potencial de diferenciação dessas células em diferentes linhagens teciduais é vastíssimo; porém, paralelamente, e até como consequência de sua imaturidade funcional, também é vasto seu potencial replicativo, o que as torna extremamente oncogênicas. De fato, existem relatos de ocorrência de até 25% de teratomas malignos (tumores imaturos compostos por diferentes tecidos) em animais submetidos a implantes de células embrionárias (Kim e cols., 2002). Dessa forma, apesar de estar relativamente bem descrita a geração de diversos tipos de neurônios maduros a partir dessas células, de ter sido mostrada sua sobrevivência e diferenciação no cérebro hospedeiro, inclusive a neurônios dopaminérgicos (Lee e cols., 2000), seu uso está longe de ser seguro, e a implementação desse conhecimento envolverá necessariamente o controle sobre sua velocidade de replicação, o que em última análise significa inibir a transformação maligna.

Todos esses aspectos indicam que, embora o processo de neurorestauração seja possível, ainda não se dispõe de uma fonte de células-tronco segura e eficaz cujo uso possa ser recomendado na prática clínica.

Células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem a vantagem de serem abundantes mesmo no animal adulto (o que não ocorre com células-tronco neurais), de serem facilmente obtidas por simples punção da crista ilíaca, além de trazerem a possibilidade de uso em auto-transplantes, o que nos desobrigaria da terapia imunossupressora, que em última instância é causa importante de morbimortalidade. Complementarmente, existe vasta experiência clínica com o

transplante desse tipo de células no âmbito terapêutico dos cânceres hematológicos, de tal modo que a sua segurança está bem estabelecida. O grupo de Pittenger (Pittenger e cols., 1999) isolou uma população de células-tronco multipotentes da medula-óssea de humanos. Pouco tempo depois, outro grupo (Brazelton e cols., 2000), reportou a diferenciação neuronal espontânea de células mesenquimais implantadas em camundongos irradiados, o que em 2003 foi confirmado em humanos com leucemia submetidos a transplante de medula óssea; nesse estudo, observaram-se neurônios e células gliais maduros derivados do tecido implantado (Mezey e cols., 2003). A seguir, numerosos autores reportaram o isolamento de subtipos de células mesenquimais capazes de transdiferenciação (não-hematopoiéticas), bem como sua diferenciação neuronal *in vitro* (Jiang e cols., 2002; Sanchez-Ramos e cols., 2000; Woodbury e cols., 2000). Entretanto, a geração de neurônios a partir de células-tronco mesenquimais com capacidade de gerar potencial de ação e de formar sinapses funcionantes ainda é motivo de controvérsia. Ademais, a capacidade de integração desse tipo de célula no cérebro hospedeiro, bem como a quantificação dos neurônios gerados a partir de CTMs, ainda não foi demonstrada.

1.1 OBJETIVOS

Embora existam evidências da multipotencialidade de células-tronco da medula óssea, os fatores que condicionam sua capacidade de transdiferenciação neuronal tanto *in vitro* quanto *in vivo*, bem como os mecanismos que regem tal processo permanecem largamente obscuros. Pressupõe-se que uma correta

integração e maturação funcionais dessas células-tronco num tecido hospedeiro dependam de uma complexa interação entre esses dois elementos. O presente trabalho tem os seguintes objetivos: i) desenvolver e avaliar o potencial de diferenciação neuronal de células-tronco obtidas da medula óssea de animais adultos, uma vez implantadas no cérebro de ratos adultos normais; ii) comparar o potencial de diferenciação das células implantadas no hipocampo, onde sabidamente ocorre neurogênese durante toda a vida do animal, com o potencial de diferenciação das células implantadas no corpo estriado, onde não ocorre neurogênese na fase adulta. A hipótese central é de que a diferenciação possa ser potencializada na região neurogênica, rica em fatores neurotróficos; iii) avaliar o período necessário para maturação das células-tronco *in vivo*; iv) observar se diferentes meios de pré-cultivo interferem no potencial de diferenciação das células implantadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da neurogênese

Durante mais de um século a idéia da imutabilidade cerebral, com a inexistência de qualquer atividade mitótica em neurônios no cérebro adulto, foi preponderante no meio científico. Até o final do século 19, as principais figuras da época como Koelliker, His, e Cajal defendiam a teoria da permanência constante da arquitetura cerebral (apud Gross, 2000).

Entretanto, no final do século 19 e início do século 20, alguns grupos relataram a ocorrência de neurogênese pós-natal em mamíferos adultos. Em 1897, o grupo de Schaper (Schaper, 1897) demonstrou a existência de células indiferenciadas que poderiam sofrer diferenciação tanto a neurônios como a células gliais. Nesta mesma época, também foi demonstrada a ocorrência de mitose em neurônios pequenos, mas não em neurônios grandes, em porcos-da-índia com lesão cerebral (Levi, 1898). Outros pesquisadores (Allen, 1912; Hamilton, 1901) também detectaram a ocorrência de mitose em cérebros de ratos neonatos com 4 dias de vida e adultos com pelo menos 120 dias de idade, respectivamente. Estas novas observações, contrárias às idéias preponderantes da época, foram pouco reconhecidas. Infelizmente, nenhum dos investigadores dispunha de um método experimental adequado para comprovação da existência de multiplicação de células neurais ou da formação de novos neurônios.

Nos finais da década de 50, uma nova técnica, a autorradiografia com [³H]-timidina, que é incorporada ao DNA das células em mitose, possibilitou avanços no estudo da neurogênese.

O surgimento de novos neurônios em ratos jovens e adultos foi descrito pela primeira vez por Joseph Altman (Altman, 1962). Estas células foram chamadas de microneurônios e encontradas em várias estruturas, como neocórtex, bulbo olfatório e outras. Para Altman, novos neurônios eram incorporados ao giro denteado no hipocampo de adultos. Entretanto, os resultados apresentados por ele foram desprezados. Primeiramente, as técnicas disponíveis eram ineficientes para se distinguir neurônio de glia; segundo, o trabalho mostrava uma migração desigual de células do ventrículo lateral para, por exemplo, o bulbo olfatório e para o córtex cerebral. A idéia vigente na época, de ausência de produção neuronal no animal adulto, ainda era preponderante e a teoria proposta por Altman foi rejeitada pela comunidade científica (apud Gross, 2000).

Em 1977 Kaplan e Hinds (Kaplan e cols., 1977) mostraram a presença de células marcadas com [³H]-timidina no giro denteado e no bulbo olfatório de ratos adultos. Estas células também apresentavam características de neurônios, como dendritos e sinapses. Mais uma vez as evidências da neurogênese não ganharam muita repercussão, e o dogma se manteve forte por mais um tempo.

Nos anos seguintes três fatores importantes levaram ao fortalecimento e à aceitação da neurogênese adulta. Em primeiro lugar, foi demonstrada a geração de milhares de novos neurônios diariamente no cérebro de canários machos adultos usando marcação com timidina (Burd e cols., 1985). Em segundo lugar, foi também demonstrada evidência ultra-estrutural de formação sináptica em resposta

dos novos neurônios ao som (Paton e cols., 1984). Em terceiro lugar, o desenvolvimento de métodos de coloração com BrdU (5-bromo 3'-deoxiuridina), um análogo da timidina que é incorporado pelas células durante a fase S da mitose, concomitante com outros marcadores de diferenciação neuronal, permitiram provar indubitavelmente a hipótese da neurogênese na idade adulta (Gratzner, 1982).

2.1.2 Neurogênese em mamíferos adultos

Nos mamíferos adultos, incluindo o ser humano, a neurogênese (processo no qual novos neurônios são formados a partir de células progenitoras) ocorre durante toda a vida do indivíduo. Esse processo ocorre em duas regiões principais do cérebro: na camada subgranular do giro denteado do hipocampo e na região ântero-lateral da região subventricular dos cornos frontais dos ventrículos laterais; dessa última estrutura, neuroblastos migram, através da banda migratória rostral, até o bulbo olfatório, onde as células progenitoras originam neurônios granulares e periglomerulares (Ming e cols., 2005).

Nessas regiões, um tipo especial de astrócitos, estrelados e duplamente positivos para proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e nestina, representam as verdadeiras células-tronco neurais fisiológicas (células tipo B ou tipo 1); essas dividem-se assimetricamente com baixa taxa de duplicação, originando uma célula semelhante a si mesma e uma 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 doublecortina (Dcx), que migram para seu lugar definitivo no SNC à medida em que se diferenciam. Nessa fase, neuroblastos jovens apresentam maior plasticidade sináptica (Schmidt-Hieber e cols., 2004) o que condiciona maior sensibilidade às aferências sinápticas que recebem, facilitando assim a integração em novos circuitos. A integração sináptica dos novos neuroblastos é condição imprescindível para que ocorra diferenciação neuronal e completa maturação funcional (Tozuka e cols., 2005). Tal evidência motivou a hipótese central do presente trabalho, segundo a qual a completa maturação se dá no tecido cerebral facilitada pelas aferências sinápticas e fatores de crescimento locais. Entretanto, o papel fisiológico que a neurogênese desempenha para o organismo ainda é assunto de investigação. Uma hipótese seria a existência de uma relação entre a neurogênese e a memória. Segundo essa hipótese, o fato de haver *turnover* celular no hipocampo aumentaria 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 (Deisseroth e cols., 2004).

O conhecimento dos mecanismos fisiológicos que condicionam, no animal adulto intacto, a geração espontânea de neurônios é de uma importância igual ou maior que o entendimento da diferenciação *in vitro*. De fato, se pudessemos acelerar ou estimular esse processo, poderíamos promover neurorestauração sem a necessidade de implantes biológicos de qualquer natureza.

Diversos estudos têm mostrado que a neurogênese é modulada por uma grande quantidade de fatores. Em ratos, a criação dos mesmos em um ambiente enriquecido, com o aumento da atividade física e a busca ativa por água e alimentos foi capaz de estimular a aprendizagem e o desenvolvimento da memória, consequência de uma maior produção de neurônios no giro denteado (Wu e cols., 2008). Ademais, foi visto que roedores que sofrem de epilepsia, acidentes vasculares e traumatismo também apresentam um aumento na produção de neurônios no GD (Vandenbosch e cols., 2009). Estudos realizados pelo grupo de Fred Gage (Kuhn e cols., 1996) mostraram que o envelhecimento é um fator responsável pela diminuição da neurogênese no GD de ratos e, em 1998, o grupo de Gould também notou a diminuição da produção de neurônios no GD de macacos adultos submetidos a situações de estresse (Gould e cols., 1998).

Como já mencionado, na região subventricular de ratos adultos, as células-tronco neurais (CTN), na verdade um sub-conjunto de astrócitos (GFAP+, nestin+), originam uma célula chamada amplificadora transitória (GFAP-, nestin+, Dcx+, PSA-NCAM+) a qual, por sua vez, gera neuroblastos (GFAP-, nestin-, Dcx+, PSA-NCAM+, β III-tubulina+, MAP2-, NeuN-). Esses neurônios imaturos irão migrar através da banda migratória rostral (BMR) até o bulbo olfatório. A migração é orientada por astrócitos e, uma vez no bulbo olfatório, novos neurônios se locomovem radialmente até as camadas celulares mais externas. Esses neurônios imaturos se diferenciam então em neurônios granulares ou em neurônios periglomerulares (β III-tubulina+, MAP2+, NeuN+). Os estágios

de proliferação, especificação, migração e integração sináptica duram, em média, 4 semanas (Ming e cols., 2005). Vide figura 1.

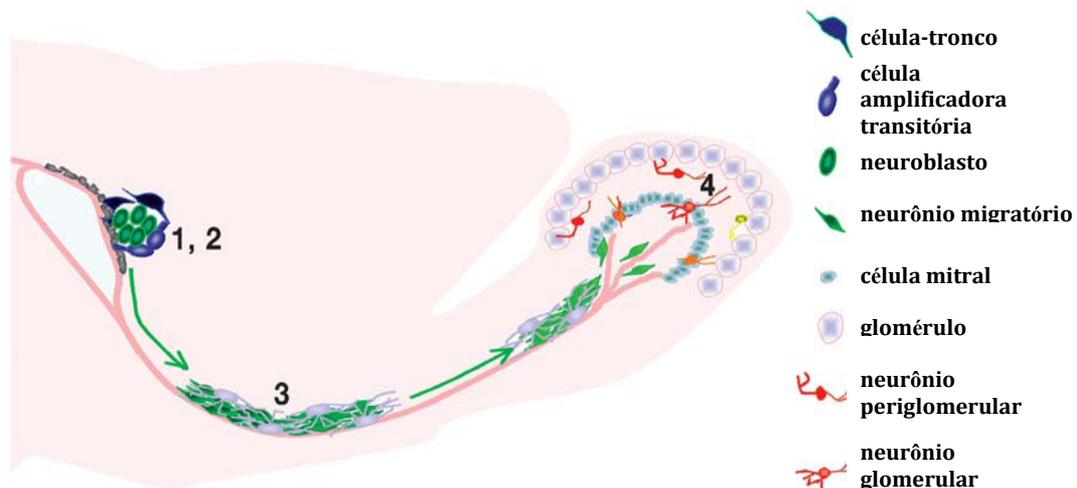


Figura 1: Geração de novos interneurônios no bulbo olfatório a partir de células-tronco da região subventricular (RSV). A Neurogênese na RSV/sistema olfatório passa por quatro estágios essenciais. Estágio 1. Proliferação: células tronco (*azul*) na RSV dos ventrículos laterais dão origem a células amplificadoras transitórias (*azul claro*). Estágio 2. Especificação: células amplificadoras transitórias dão origem a neurônios imaturos (*verde*). Células endimais adjacentes (*cinza*) do ventrículo lateral são essenciais para a especialização neuronal por promover inibidores de gliogênese. Estágio 3. Migração: Neurônios imaturos (*verde*) migram através da banda migratória rostral (BMR) até o bulbo olfatório. Os neurônios em migração estão circundados por astrócitos. Uma vez no bulbo, novos neurônios migram radialmente até as camadas celulares mais externas. Estágio 4: Integração sináptica: Neurônios imaturos se diferenciam a neurônios granulares (Gr,*laranja*) ou neurônios periglomerulares (PG,*vermelho*). Adaptado de Ming e Song, 2005.

De modo similar, na camada subgranular do giro dentado do hipocampo ocorre a geração de neurônios granulares. As células-tronco neurais, aqui também um subgrupo de astrócitos, se localizam na região subgranular e sofrem um processo de migração radial do hilo do giro dentado através da camada granular. Estas CTN dão origem a células amplificadoras transitórias, que sofrerão diferenciação a neurônios imaturos. Estes pré-neurônios estendem projeções axonais até a camada de células piramidais CA3 e enviam seus dendritos em direção oposta à camada molecular. A maturação dessas células origina neurônios

granulares que recebem aferências do córtex entorrinal e enviam eferências a CA3 e outras regiões hipocâmpais (Figura 2) (Ming e cols., 2005)

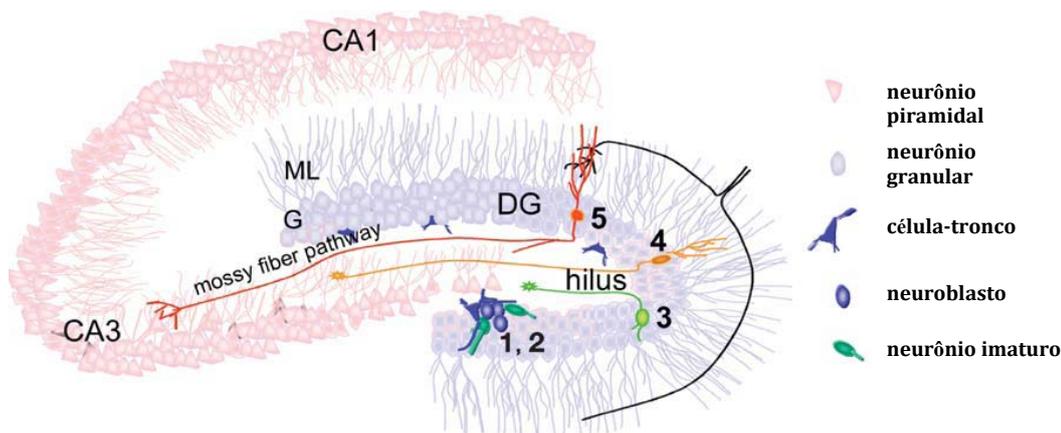


Figura 2: Geração de novos neurônios granulares no giro denteado do hipocampo, ou na região subgranular (RSG). A Neurogênese no giro denteado do hipocampo se processa em cinco estágios. Estágio 1. Proliferação de células-tronco (*em azul*) que se localizam na região subgranular do giro denteado. Essas células-tronco dão origem a células amplificadoras transitórias (*azul claro*). Estágio 2. Diferenciação: células amplificadoras transitórias se diferenciam a neurônios maduros (*verde*). Células progenitoras na RSG intimamente associadas a astrócitos e estruturas vasculares Estágio 3. Migração: Neurônios imaturos (*verde claro*) migram a uma curta distância pela camada de células granulares. Estágio 4: Neurônios imaturos (*laranja*) estendem projeções axonais ao longo da região CA3 e prolongamentos dendríticos em direção oposta à camada molecular. Estágio 5. Integração sináptica de novos neurônios granulares (*vermelho*). DG, giro denteado; ML, camada das células moleculares; GL, camada de células granulares. Adaptado de Ming e Song, 2005.

2.2 Perspectivas históricas sobre transplante neural

Thompson (Thompson, 1890) foi um dos pioneiros no transplante de tecido neural ao realizar transplante de tecido cortical de gatos adultos para gatos adultos. A seguir, dois outros pesquisadores (Forssman, 1900; Saltykow, 1905) analisaram a viabilidade do tecido neural implantado em um encéfalo hospedeiro bem como a propriedade dos enxertos em estimular a regeneração.

Somente setenta anos depois o assunto foi novamente retomado, quando Bjorklund e Stenevi (Bjorklund e Stenevi, 1979) reportaram a regeneração da via nigro-estriatal por meio de implante de tecido fetal. No mesmo ano outro grupo (Perlow e cols., 1979) descreveu a melhoria dos sintomas motores após transplante de tecido fetal contendo precursores dopaminérgicos em ratos parkinsonianos que sofreram lesão na via nigro-estriatal. No início da década de 80, vários trabalhos mostraram a sobrevivência de células transplantadas em encéfalos adultos e fetais. O grupo de Bjorklund (Bjorklund e cols., 1983) relatou a sobrevivência de células nervosas quando o tecido mesencefálico fetal era implantado em diversas regiões do encéfalo e também mostrou um aumento 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 (Schmidt e cols., 1983).

Também foi observado (Gage e cols., 1983) que o crescimento de fibras dopaminérgicas era da ordem de 1mm no estriado e de 3mm no hipocampo em animais adultos implantados com células precursoras do mesencéfalo ventral. Entretanto, a regeneração completa da via nigro-estriatal foi mostrada por Nikkhah (Nikkhah e cols., 1995) ao se implantar precursores fetais na substância negra de ratos neonatos. Nestes animais, ocorreu crescimento de fibras até o estriado denervado. Os fatores que levam ao estímulo de crescimento das fibras em neonatos são determinantes para facilitar a integração do enxerto. A identificação desses fatores poderia teoricamente promover a integração do enxerto também em animais adultos. Tal evidência suporta a idéia de que o microambiente onde o enxerto é implantado, no caso influenciado pela idade do animal, desempenha

papel importante na integração e diferenciação celular. Em 2004, o mesmo grupo (Timmer e cols., 2004), seguindo essa linha de pensamento, mostrou que, quando a solução de precursores neurais é implantada com células de Schwann que hiperexpressam bFGF, ocorre uma melhor sobrevivência do implante, maior integração funcional e melhor recuperação do padrão motor.

2.3 Fontes de célula-tronco em investigação

2.3.1 Célula-tronco neural fetal

As primeiras células-tronco neurais isoladas (Frederiksen e cols., 1988a; Frederiksen e cols., 1988b) eram provenientes do cerebelo de ratos neonatos e, quando cultivadas em condições especiais, eram capazes de formar neurônios e glia. A seguir, outros autores trabalharam com células multipotentes isoladas do corpo estriado de camundongos adultos e fetais com 14 dias de vida intra-uterina (Reynolds Weiss, 1992). Estas células foram cultivadas em meio livre de soro e, quando colocadas em contato com fator de crescimento epitelial (EGF), aumentaram a velocidade de reprodução por volta do 5º dia de cultura e, após 13 dias, as células formaram esferas de células indiferenciadas positivas para nestina. O contato contínuo com o EGF estimulou a diferenciação dessas células a neurônios e astrócitos.

Após a publicação de Reynolds e Weiss, outros grupos trabalharam de forma a conseguir uma maior geração neurônios *in vitro* (Caldwell e cols., 2001; Svendsen e cols., 1998). Os fatores de crescimento EGF e bFGF foram, então,

definidos como os principais fatores responsáveis pela indução de fenótipo neuronal e expansão de precursores neurais.

Dois grupos (Hynes e cols., 1995; Ye e cols., 1998) mostraram a influência do fator de crescimento de fibroblasto 8 (FGF8) e *sonic hedgehog* (SHH), ambas proteínas expressas na notocorda, na diferenciação neuronal. O ácido ascórbico foi implicado no aumento da geração de neurônios dopaminérgicos *in vitro* a partir de extratos de encéfalo fetal ou adulto (Yan e cols., 2001). Outros autores demonstraram a influência do baixo teor de oxigênio (Studer e cols., 2000) e do AMPc (Sanchez-Pernaute e cols., 2001) para o aumento da proliferação, sobrevivência e diferenciação de precursores neuronais. Particularmente o AMPc consideramos de fundamental importância, haja visto que 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., 2002 a e b). Adicionalmente, foi reportado que AMPc extra-celular atua aumentando correntes iônicas em CTMs por meio de receptores P2X e P2Y metabotrópicos (Coppi e cols., 2007).

A síntese de neurotransmissores como dopamina foi demonstrada a partir de células-tronco neurais em cultivo, tanto de origem murina (Carvey e cols., 2001; Ling e cols., 1998) quanto humana (Christophersen e cols., 2006). O grupo de Song (Song e cols., 2002b) demonstrou por meio de eletrofisiologia a completa maturação funcional de células-tronco neurais *in vitro*, com disparo de potenciais de ação e neo-sinaptogênese, acrescentando que esse processo depende da interação com astrócitos e neurônios maduros eletricamente ativos presentes no sistema de cultivo. Essa idéia foi complementada com a demonstração que a

ultimação do processo de maturação depende da atividade elétrica das células em desenvolvimento e esses autores sugeriram que haja necessidade de sinalização elétrica, além da química, para o correto desenvolvimento sináptico (Deisseroth e cols., 2004). Essa sinalização poderia ser propiciada pelo implante das células no tecido neural, em acordo com a hipótese central desse trabalho.

2.3.2 Célula-tronco embrionária

Devido à sua pluripotencialidade, isto é, a capacidade de originar qualquer célula do organismo menos a placenta e anexos, células-tronco embrionárias são um tipo celular bastante promissor para restauração tecidual. Estas células são extraídas 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 e são capazes de gerar células maduras dos três folhetos embrionários (Gage, 2000). Entretanto, e até em consequência de seu alto potencial de diferenciação, possuem também altíssimo poder replicativo, o que torna extremamente difícil controlar seu crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Inicialmente, dois grupos (Lee e cols., 2000; Okabe e cols., 1996) descreveram a diferenciação *in vitro* de células-tronco embrionárias de camundongos a neurônios funcionantes e descreveram positividade para TH (tirosina-hidroxilase, enzima da cascata de síntese de dopamina) e para Tuj-1 (proteína do citoesqueleto neuronal) em 35% das células cultivadas na presença de

SHH, FGF8 e ácido ascórbico. Complementarmente, o grupo de Studer (Perrier e cols., 2004) relatou a diferenciação dopaminérgica de células embrionárias humanas em condições semelhantes, o que foi comprovado com imunocitoquímica, além de medirem a liberação de dopamina em cultura por meio de análise HPLC; análise eletrofisiológica subsequente por meio de *patch clamp* revelou atividade elétrica compatível com neurônios maduros.

Posteriormente, foi reportada a reversão dos sintomas parkinsonianos em animais de experimentação, ao implantá-los com células-tronco embrionárias, além de constatarem imunorreatividade para TH nas células transplantadas no estriado (Bjorklund e cols., 2002). Complementarmente, um outro grupo (Kim e cols., 2002) mostrou maturação eletrofisiológica típica de células dopaminérgicas em células embrionárias implantadas, além da melhora dos testes rotacionais em animais parkinsonianos tratados com anfetamina. Entretanto, o grupo de Bjorklund relatou a ocorrência de teratomas malignos em 5 de 19 animais implantados, o que levantou a questão sobre a biossegurança das células-tronco embrionárias para uso clínico. Controlar seu potencial replicativo equivale a diminuir seu potencial de diferenciação e assim diminuir sua eficácia na gênese neuronal. Além do mais, devido às questões éticas que envolvem o uso de células embrionárias humanas para pesquisa, o seu uso é proibido ou fortemente limitado em muitos países, o que torna problemático o seu uso em larga escala.

2.3.3 Célula-tronco pluripotente induzida

Uma nova linha de célula-tronco, supostamente com as mesmas características pluripotentes de células-tronco embrionárias, vem sendo bastante investigada nos

últimos tempos; trata-se de células-tronco pluripotentes induzidas, ou iPS. Em 2006, Takahashi e Yamanaka mostraram que fibroblastos adultos podiam ser induzidos a adquirirem pluripotencialidade, comportando-se assim como uma célula-tronco embrionária, através da transfecção lentiviral de determinados genes, mais especificamente Oct3 ou 4, Sox2, Klf4 e c-Myc (Takahashi e cols., 2006). As iPS possuiriam basicamente todas as características de uma célula-tronco embrionária. O grupo de Wernig (Wernig e cols., 2007) mostrou a produção de um feto de camundongo originário inteiramente de uma iPS, critério este importante para se definir totipotencialidade. A esperança em torno destas células é que no futuro seja possível a produção de iPS humanas a partir de biópsias de qualquer tecido somático maduro, e assim, gerar-se células-tronco paciente-específicas compatíveis imunologicamente. Outra vantagem não menos importante é a ausência de questionamentos éticos relacionados a esse tipo celular.

Embora o estudo com essas células mostrou resultados bastante promissores, há ainda algumas limitações que indicam a necessidade de estudos mais aprofundados, principalmente referentes à diferenciação neuronal de iPS.

Um dos problemas relacionado às iPS é a formação de tumores em 20% dos camundongos quimeras (Okita e cols., 2007), provavelmente devido á ativação de c-myc, um oncogene. Uma questão importante é como direcionar a diferenciação em detrimento da proliferação celular, e, secundariamente, qual seria o melhor estágio, dentro do processo de maturação, para se realizar o transplante celular com fins restauradores, favorecendo a integração no tecido hospedeiro. Outro obstáculo importante é que ainda não se sabe se a reprogramação celular para a produção das iPS ocorre de forma eficiente. Reprogramações aberrantes podem

resultar em uma diminuída capacidade de diferenciação e podem aumentar o risco de teratomas (Yamanaka, 2009).

Recentemente, uma nova técnica mostrou ser possível a derivação de uma iPSC através de alteração proteômica, e não genômica (Zhou e cols., 2009): trata-se da ativação de proteínas-indutoras de células-tronco pluripotentes induzidas, ou piPSCs. As proteínas são produzidas por bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas e adicionadas ao meio de cultura das células a serem induzidas. Assim sendo, abdica-se da transformação gênica, evitando-se com isso o elevado potencial de malignização secundária.

2.3.4 Células-tronco mesenquimais adultas

As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (ou, como sugerido pela Sociedade Internacional de Citoterapia: *multipotent mesenchymal stromal cells*) são células multipotentes que possuem a capacidade de se expandir clonalmente de maneira assimétrica, de se auto-renovar e de gerar ao mesmo tempo células maduras de diferentes folhetos embrionários (Filip e cols., 2004).

A existência de uma população de células-tronco na medula óssea do adulto foi descrita há mais de 30 anos por Friedenstein (Friedenstein e cols., 1974), que demonstrou a existência de um grupo de células com anatomia similar a fibroblastos na medula óssea que tinham a capacidade de gerar células hematopoiéticas *in vitro*. Posteriormente, foi demonstrado que essas células eram capazes de originar linhagens diferentes do seu tecido de origem, tais como células musculares esqueléticas (Ferrari e cols., 1998), células-musculares

cardíacas (Orlic e cols., 2001), células endoteliais, hepatócitos (Petersen e cols., 1999), e células neuroectodérmicas (Sanchez-Ramos e cols. 2000).

O grupo de Pittenger (Pittenger e cols., 1999) foi o responsável pelo isolamento e caracterização dessas células por FACS (separação celular ativada por fluorescência). Na verdade, do total das células presentes na medula óssea, apenas 0,001-0,01% preenchem critérios de células-tronco (Galotto e cols., 1999). Portanto, para fins restauradores, o isolamento seguido da expansão clonal *in vitro* da subpopulação de interesse se torna fundamental.

As CTMs são fusiformes com fenótipo similar ao de fibroblastos. São negativas para marcadores hematopoiéticos tais como CD45, CD34, CD14 e glicoforina A, e positivas para, CD73, CD90 e CD105 (Dominici e cols., 2006). Tradicionalmente, as CTMs são isoladas do restante das células da medula-óssea por sua capacidade de adesão a superfícies plásticas, diferentemente das células hematopoiéticas, que crescem em suspensão. Segundo alguns autores, esse método tem o inconveniente de selecionar células-tronco heterogêneas, com diferentes graus de pluripotencialidade, e que apenas 30% das células isoladas seriam verdadeiramente multipotentes (Abdallah e cols., 2008). Entretanto, não há ainda a descrição de marcadores de membrana específicos de células mesenquimais multipotentes para permitir o isolamento direto.

Geração de neurônios, demonstrada por meio da expressão de proteínas neurais ou aquisição de morfologia neuronal, foi descrita por vários autores (Jiang e cols., 2002a; Sanchez-Ramos e cols., 2000; Woodbury e cols., 2000). No entanto, a maturação funcional com comprovação de disparos de potenciais de ação só foi descrito em co-cultura com tecido neuronal maduro (Jiang e cols.,

2003; Wislet-Gendebien e cols., 2005). Hipotetiza-se, a partir dessas observações, que o tecido neural maduro ou em desenvolvimento favoreça a completa maturação neuronal, pelo menos *in vitro*.

2.3.4.1 Transplante de células-tronco mesenquimais em modelos de doenças neurológicas

2.3.4.1.1 Isquemia cerebral

Em 2005, foi descrita (Zhu e cols., 2005) a recuperação motora de ratos submetidos a isquemia central após terem recebido implante de células-tronco neurais derivadas de embriões de ratos E14, isto é, 14 dias de vida intra-uterina, modificadas para produzir VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Em relação ao transplante de CTMs, foi relatada a melhora dos sinais motores após implante de CTMs derivadas da medula-óssea (Zhao e cols., 2002). Entretanto, a explicação estrutural para a resposta clínica observada não foi relatada. Nesse modelo, existiria a possibilidade de o VEGF ter induzido a neoangiogênese, e assim ter permitido a recuperação de zonas de penumbra isquêmica indiretamente por melhoria da perfusão tecidual, e não por geração de células neuronais. Em 2007, foi levantada a hipótese de que CTMs seriam capazes de secretar fatores humorais ainda não identificados, e que esses fatores seriam responsáveis por um aumento na diferenciação de células-tronco neurais endógenas a neurônios e oligodendrócitos (Bai e cols., 2007). No entanto, esses mecanismos não

propiciaram a recuperação completa da atividade neuronal em regiões acometidas por lesões isquêmicas.

2.3.4.1.2 Lesão medular

O transplante de células-tronco para tratamento de lesão da medula espinhal (LME) tem sido vista como uma terapia bastante promissora. Recentes evidências apontam a viabilidade de CTMs para esse tipo de lesão. Estudando-se a sobrevivência de CTMs implantadas em ratos demonstrou-se a formação de um arcabouço na medula espinhal do hospedeiro, que favoreceria a regeneração de axônios próprios (Hofstetter e cols., 2002). Similarmente, outros autores verificaram a remielinização de axônios desmielinizados da medula espinhal de ratos Wistar, após transplante de CTMs, e que a região remielinizada apresentava condutividade elétrica próxima do normal. Entretanto, a melhora funcional dos animais transplantados não foi averiguada (Akiyama e cols., 2002).

Os efeitos terapêuticos das CTMs se devem principalmente à secreção de fatores solúveis e da formação de uma matriz extracelular que proporciona proteção e apoio para que seja efetivado o reparo (Paul e cols., 2009). Entretanto, a recuperação funcional ainda não foi alcançada, e mais estudos ainda precisam ser realizados.

As CTMs oferecem inúmeras vantagens em relação a outros tipos de células-tronco, para possível uso em transplantes terapêuticos em humanos. Entre essas vantagens, destaca-se sua fácil obtenção por simples punção óssea, seu fácil isolamento em cultura, rápida expansão *in vitro*, e possibilidade de transplante

autólogo, eliminando a necessidade de imunossupressão. Além disso, já se acumula larga experiência clínica com esse tipo celular, que é usado corriqueiramente no tratamento de cânceres hematológicos, provando sua biossegurança.

Um dos fatores que dificultam a comparação dos resultados entre os diferentes grupos de trabalho que se ocupam com a restauração medular usando CTMs é a variedade de métodos usados para veiculação das células. Além do implante direto no local da lesão, considerado o método padrão pelo absoluto controle da quantidade de células implantadas e do correto local de implante, muitos autores utilizam a inoculação intratecal por punção lombar ou até mesmo a administração intravenosa, admitindo uma propriedade não absoluta de quimiotaxia de CTMs por áreas de lesão tecidual. Evidentemente, somente uma pequena fração de células atinge o local desejado com essas duas técnicas. A eficiência das diferentes técnicas em estudos comparativos ainda está para ser estudada (Paul e cols., 2009).

2.3.4.1.3 Neurooncologia

A terapia oncológica com uso de células-tronco baseia-se na utilização de algumas propriedades intrínsecas de células imaturas, uma vez implantadas no encéfalo acometido por um tumor. Células-tronco indiferenciadas possuem a capacidade de migração extensa e predileção por áreas de quebra de barreira hemato-encefálica. É justamente nessas áreas que o tumor infiltra o tecido cerebral circunjacente e cresce com mais velocidade. Ao se combinar essas propriedades

com uma transformação genética que condicione a síntese de um quimioterápico, têm-se um transportador ideal para liberação de droga justamente nas áreas de maior infiltração tumoral. Usando esse princípio, foi reportada maior sobrevivência de ratos com glioma implantados com CTMs produtoras de fator plaquetário 4, inibidor de angiogênese (Lee e cols., 2003). Iniciativas semelhantes vêm sendo tentadas por meio da transfecção de células-tronco com adenovirus anti-tumorais (Komarova e cols., 2006; Nakamura e cols., 2004). Evidências recentes mostram que alguns tumores cerebrais se formariam a partir de transformação maligna de células-tronco neurais, presentes no cérebro adulto (Vescovi e cols., 2006). Dessa forma, o conhecimento da biologia celular de células-tronco permitirá também o avanço dos conhecimentos sobre oncogênese no tecido cerebral. Em uma outra linha de atuação, a identificação de marcadores de superfície próprios de células-tronco cerebrais, vistas atualmente como iniciadoras do processo oncogênico, como por exemplo CD133, permitiria a conjugação de um quimioterápico a anticorpos específicos contra esses marcadores, que funcionariam como vetores da droga, acarretando o desenvolvimento de terapias dirigidas (ou "terapia imuno-dirigida").

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de células-tronco da medula óssea

O protocolo de extração e isolamento de CTMs da medula-óssea de roedores foi adaptado de Azizi, Stokes e cols., 1998. Resumidamente, ratos Sprague-Dowley normais de 4 semanas de idade foram submetidos à anestesia intraperitoneal com cetamina e então operados por via microcirúrgica para ressecção dos dois fêmures e tíbias. Após sacrifício por incisão cardíaca, as epífises dos ossos longos ressecados foram removidas e as diáfises perfundidas com tampão fosfato (PBS, Gibco, Karlsruhe) e coletadas em frasco Falcon® 15 mL. Após a dissecação de 10 animais, a solução foi filtrada em filtro Falcon® de 40 µM para remoção de espículas ósseas e agregados celulares. A seguir, a suspensão de células foi transferida cuidadosamente sobre solução de Biocoll® (Biochrom AG, Berlim) com densidade 1,077 g/mL e centrifugada por 25 minutos a 1500 rpm. Ao final desse processo, obteve-se uma solução tetrafásica sendo a camada mais superficial composta por PBS e plasma, seguida por, mais profundamente, uma fina camada de células mononucleares, seguida por Biocoll e, finalmente, hemácias ao fundo (Figura 3). A camada de células mononucleares foi então removida por aspiração e coletada em frascos Falcon® de 15 mL. A seguir, as mesmas foram centrifugadas novamente por 5 minutos a 1200 rpm e ressuspensas em meio de cultivo como se segue.

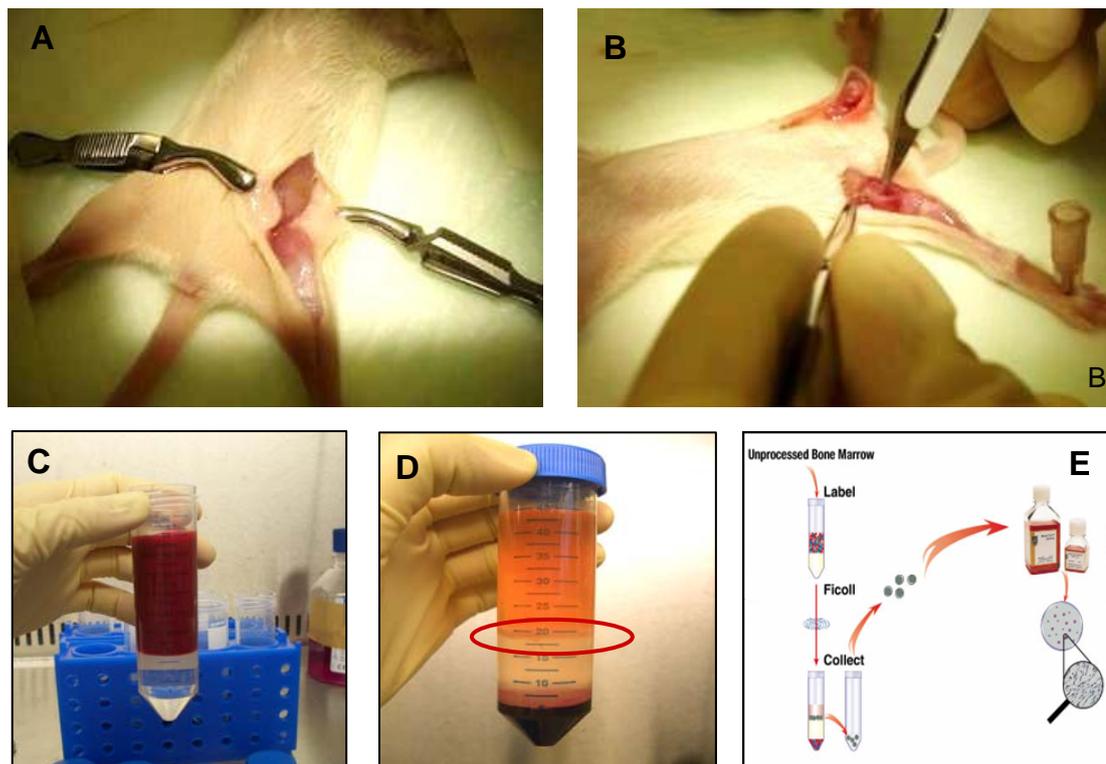


Figura 3: Extração de células-tronco mesenquimais de ratos Sprague-Dowley. A e B: ressecação dos fêmures e tíbias. C: Foto de Falcon contendo Biocoll e material perfundido antes da centrifugação e D: material após a centrifugação como seleção das células mononucleares. E: resumo da seleção de CTMs, mostrando a centrifugação e a expansão *in vitro* em meio específico.

3.2 Isolamento e cultivo de CTMs

As células isoladas como descrito foram ressuspensas em meio MSCBM®, "*marrow stem cell basal medium*", (Cambrex-Poietics Cambrex, Walkersville, USA) complementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina, 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 umidade. O meio foi renovado após 24 horas e, a seguir, a cada 48 horas. A passagem das células foi realizada semanalmente, tempo este necessário para que se atinja aproximadamente 80% de

confluência, re-semeando-se as mesmas a cada passagem a 3000 células por cm^2 em frascos de 150 cm^2 contendo 30 mL de meio. Nessa fase, observam-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, aderem-se à superfície do frasco de cultivo, devido à expressão de β -integrinas, e assumem morfologia plana, com soma relativamente grande, com alguns prolongamentos não ramificados e com núcleo de cromatina frouxa. Nas três semanas subseqüentes, esse tipo celular (células estromais) passa a predominar no meio de cultivo, em detrimento das células hematopoiéticas, que crescem em suspensão e são removidas a cada aspiração do meio. Conseguiu-se assim uma população de 5 a 40 milhões de células estromais por ocasião da segunda passagem, por mL de aspirado medular.

3.3 Transfecção lentiviral

Como o intuito do trabalho foi a avaliação do potencial de diferenciação de células isogênicas, ou seja, provenientes da mesma espécie animal, houve a necessidade da marcação das células-tronco isoladas antes do implante. Dentre os inúmeros métodos disponíveis para tal fim, optou-se pela marcação com proteína verde fluorescente (GFP), transferida às células isoladas por meio de transfecção viral com lentivírus derivado do HIV, gentilmente cedidas pelo Dr. Bryan Strauss, INCOR, HC-FMUSP. O *construct* viral é caracterizado por um gene produtor de

GFP acoplado ao promotor de ubiquitina-C humana, e amplificado por uma seqüência derivada do citomegalovirus. Assim sendo, garantiu-se expressão de altos níveis de GFP por célula transfectada, a qual se manteve por longo prazo (4 meses).

Para a transfecção viral necessitou-se de ambiente de trabalho em nível de segurança S2, tendo sido essa parte da experimentação realizada no Laboratório de Neurocirurgia Funcional da Universidade Albert-Ludwig, em Freiburg, Alemanha. Mais precisamente, cultivou-se um frasco T75 de células até a confluência, removeu-se o meio de cultivo e adicionou-se uma solução de partículas virais previamente tituladas, suspensas em 2 a 3 mL de meio de cultivo, de modo a se obter 5 partículas virais por célula, juntamente com 8 μ g/mL de polibrene (da Sigma, uma substância redutora para otimizar a eficiência da transfecção); esse volume foi suficiente para cobrir toda a superfície do frasco de cultivo. As células e os lentivirus foram incubados por 6 horas, completando-se a quantidade de meio a 12mL após esse período. No dia seguinte, foi realizada a troca completa do meio. Após 2 a 3 passagens, os níveis de expressão foram satisfatórios para o restante do experimento, obtendo-se com o protocolo aqui proposto uma eficiência de $82,5 \pm 3,4\%$ de taxa de transfecção.

3.4 Diferenciação neuronal *in vitro*

Para comprovar a multipotencialidade e capacidade de diferenciação neuronal das células isoladas, foi primeiramente realizado um ensaio de

diferenciação *in vitro* adaptado de trabalhos prévios realizados em nosso Laboratório (Lepski, 2009b). Resumidamente o protocolo ocorreu em três etapas.

Em primeiro lugar, selecionou-se as células-tronco estromais por adesão ao frasco de cultivo, em meio MSCBM conforme já mencionado. Em segundo lugar, foi induzido fenótipo neuronal por meio de um meio básico composto por DMEM 70%: F12 30%, suplemento B27 a 1%, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina (todos da Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescidos de 20ng/ml de bFGF (Sigma), 20ng/ml de EGF (Peprotech, Londres, Reino Unido) e 10ng/ml de fator inibidor de leucemia recombinante murino LIF (Millipore, Billerica, MA, EUA). Para tanto, as células estromais aderentes foram re-suspensas com tripsina-EDTA (Gibco, Karlsruhe, Alemanha) e re-semeadas em frascos de 75cm² de superfície, não-revestidos. Após uma semana, pôde-se observar a formação de estruturas esferóides que se assemelhavam a neuroesferas, conforme descrito por Kabos (Kabos e cols., 2002). A diferentes intervalos de tempo, as esferas formadas foram dissociadas, contadas e plaqueadas a 10.000 células/cm² em placas 24 orifícios (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) previamente revestidas com fibronectina (Sigma). Na terceira etapa a diferenciação final foi promovida por acréscimo de 25ng/ml de BDNF (R&D Systems, Minneapolis, EUA), 1mM de dibutilil-AMPc (Sigma) e 0,5mM de isobutil-metil-xantina, IBMX (Sigma) em meio básico composto por α-MEM (Sigma), 200mM de L-glutamina, 0,1% de glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1% de PSA (Gibco) e 2% de suplemento sérico (Gibco). As células mesenquimais foram expandidas durante períodos de 5 a 100 passagens, perfazendo o mínimo de cinco semanas e o máximo de 2 anos.

3.5 Implante estereotáxico

3.5.1 Preparação dos capilares

Para realização dos implantes estereotáxicos foi de fundamental importância a minimização da lesão e da reação inflamatória relacionadas ao procedimento cirúrgico de implante. Para tanto, usamos a técnica de microimplante desenvolvida e descrita por Nikkhah (Nikkhah, Olsson e cols., 1994; Brandis, Kuder e cols. 1998). Resumidamente, capilares de borosilicato de precisão (Drummond Scientific Co., Broomall, PA, EUA, número de catálogo 1-000-0500, 100mm de comprimento, diâmetro externo 1,09mm, diâmetro interno 0,8mm) foram afilados e cortados por calor em aparelho próprio da Sutter Instruments (Novato, CA, EUA), modelo P97 equipado com filamento FB245B de 2,5x4,5mm, de acordo com os seguintes parâmetros: P350 ou 400, H780, P30, V50, T150 ou 200, L1 ou 3. Posteriormente, uma ponta biselada a 40° foi cortada em polidor Narishige EG-40 (Analytical Instruments, Golden Valley MN, EUA), de modo que o diâmetro externo fosse 50-70µm, numa ponta afilada de 8-10mm de comprimento, que foi a seguir novamente polida em polidor Narishige MF900 (Analytical Instruments) para remoção de imperfeições na superfície do vidro. A seguir, adaptou-se a cânula a uma seringa de Hamilton de 1µL (Hamilton Company, Bonaduz, Suíça) por meio de um tubo de polietileno (Intramedic®, Becton Dickinson 427411, diâmetro interno 0,58mm e externo 0,965mm).

3.5.2 Preparação cirúrgica

Ratos Sprague-Dowley adultos jovens de 6 semanas de idade (190g aproximadamente) foram submetidos a anestesia geral com cetamina intraperitoneal e diazepam, e a seguir fixados a um aparelho Cunningham de estereotaxia para ratos (Stoelting Co., Dublin, Irlanda), de modo que o plano da abóbada craniana se coloque paralelamente ao plano do solo, com o bregma e o lambda situados na mesma altura. Realizou-se uma incisão longitudinal mediana na cabeça do animal, para exposição do osso, do qual se removeu o periósteo. Após identificação das suturas coronária e sagital, e o Bregma na sua intersecção, anotou-se esse ponto como referência estereotáxica. As coordenadas utilizadas para o corpo estriado foram: antero-posterior (AP) +0,5mm, lateral (L) +2,5 e horizontal (H) -4,7 (a partir da dura-máter). E para o hilo do giro denteado hipocampal, AP -3,3mm, L +1,2, H -3,4 (a partir da dura-máter). Para o teste da hipótese, a precisão do alvo de implante no hilo do giro denteado hipocampal, de onde as células-tronco neurais se originam, representa um fator crucial. Como os atlas de estereotaxia se referem a animais neonatos ou adultos, e portanto, fora da faixa etária em questão, fez-se necessária uma correção das coordenadas do animal adulto, realizada com base em experimentos prévios nos quais azul tripan foi aplicado estereotaxicamente para verificação do alvo em cortes histológicos (Figura 4).

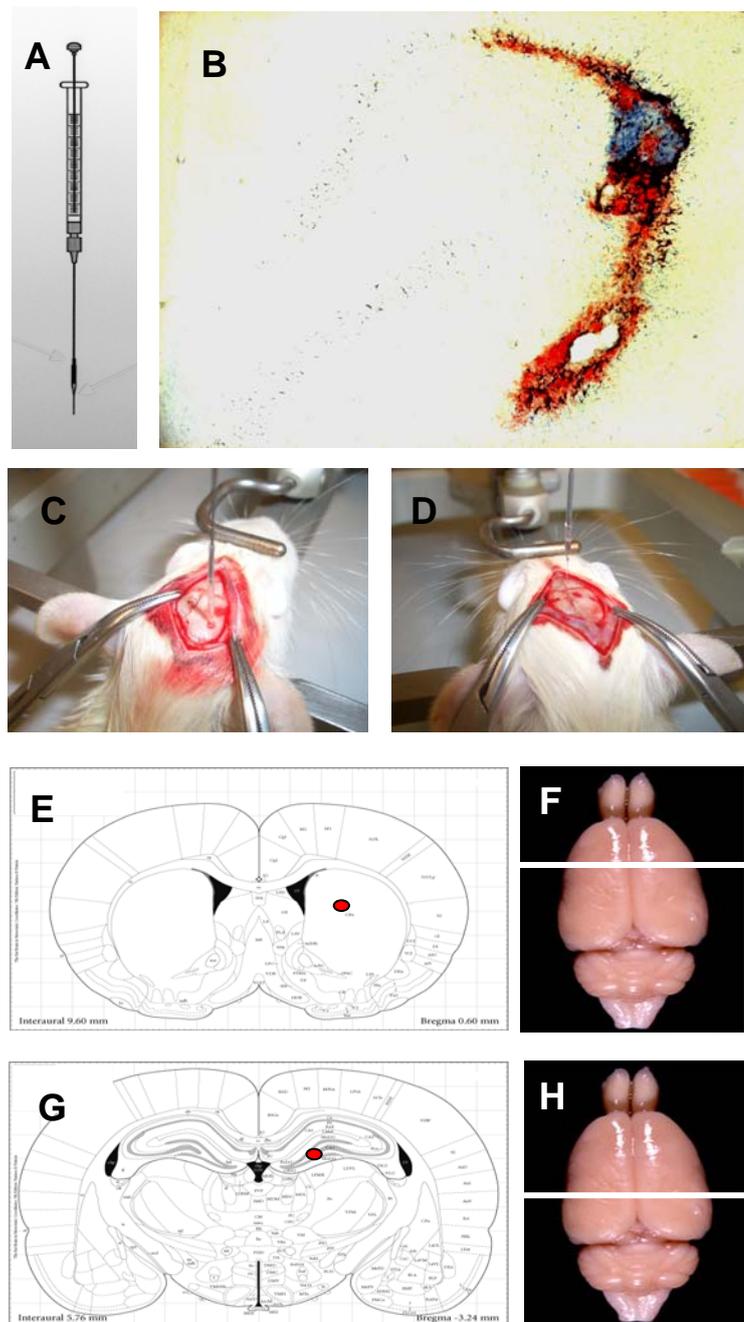


Figura 4: Transplante de células-tronco mesenquimais. A: seringa de Hamilton. B: implante teste com azul de tripan para correção das coordenadas do animal adulto para jovem. C e D: tranplante das células com capilares e seringa de Hamilton. Os locais dos tranplante são mostrados em E-F (estriado) e G-H (giro dentado do hipocampo).

Assim sendo, 20 animais receberam implantes no hilo do giro denteado no hipocampo por meio de uma trepanação parietal e 20 animais receberam implantes no corpo estriado, em um ponto situado 2,5mm da linha média, portanto distante da parede ventricular, onde se inicia a banda migratória rostral. As células implantadas foram ressuspensas após breve tripsinização de 3 minutos com tripsina-EDTA (Gibco), lavadas em PBS e ressuspensas a 100.000 células por μL diluídas em meio DMEM (Gibco) com 0,05% DNase (Sigma) para se evitar agregação. Foram implantadas 150.000 células por alvo, ou 1,5 μL da solução. A viabilidade imediatamente após a tripsinização e antes do implante foi acessada por meio da incorporação de azul-tripan, para se quantificar o número de células viáveis. A estabilidade da transfecção lentiviral após o período de expansão foi também analisada em microscopia de epifluorescência imediatamente antes do implante para se avaliar a porcentagem de células que efetivamente expressavam o marcador GFP.

Os 20 ratos implantados no hipocampo e os 20 no estriado foram subdivididos em 4 grupos como se segue, cada um recebendo implantes de células em estágios diferentes do processo de maturação.

Subgrupo 1 - Grupo controle: 10 ratos (5 implantados no hipocampo e 5 no estriado) receberam implante de meio sem células (4 com meio básico, 4 com meio bFGF-EGF e 2 com meio AMPc-IBMX). Desses, 6 foram utilizados para estereologia e 4 para outras colorações imunohistoquímicas.

Subgrupo 2 – Grupo implantado com células indiferenciadas: 10 ratos (5 implantados no hipocampo e 5 no estriado) implantados com 150.000 céls. GFP+ cultivadas em meio básico, após expansão de no mínimo 3 semanas. Desses, 8

foram utilizados para estereologia e 2 para demais colorações.

Subgrupo 3 – Grupo implantado com células induzidas à diferenciações neuronais: 10 ratos (5 implantados no hipocampo e 5 no estriado) implantados com 150.000 céls. GFP+ cultivadas durante 1 semana em meio de indução neuronal contendo bFGF, EGF, heparina e LIF, sendo que 8 foram utilizados para estereologia e dois para demais colorações.

Subgrupo 4 – Grupo implantado com células diferenciadas: 10 ratos (5 implantados no hipocampo e 5 no estriado) implantados com 150.000 céls. GFP+ cultivadas durante 1 semana em meio de indução neuronal contendo bFGF/EGF/hep/LIF e 12hs em meio de diferenciação contendo AMPc e IBMX, sendo que 8 foram utilizados para estereologia e 2 para demais colorações.

Grupo	implante	Nº de ratos	Alvo	Semanas de sobrevida
1	meio	3	hipocampo	6
		2	hipocampo	12
		3	estriado	6
		2	estriado	12
2	células estromais	3	hipocampo	6
		2	hipocampo	12
		3	estriado	6
		2	estriado	12
3	células induzidas	3	hipocampo	6
		2	hipocampo	12
		3	estriado	6
		2	estriado	12
4	células diferenciadas	3	hipocampo	6
		2	hipocampo	12
		3	estriado	6
		2	estriado	12

Tabela 1: Grupos de animais de estudo indicando os grupos experimentais em função do tipo de implante recebido, o número de animais implantados, o alvo do implante e o tempo de sobrevida de cada animal.

3.6 Manutenção dos animais

A escolha da idade dos animais, adultos jovens de 6 semanas de vida, se baseou no fato observado também em experimentos prévios de que animais mais velhos que 8 semanas não apresentam neurogênese significativa, principalmente se cultivados em condições habituais, a dois, em gaiolas tipo III, de 810cm², ou a cinco ou sete animais em gaiolas tipo IV, de 1800cm².

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP e todos os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos preconizados para experimentação animal.

Após o transplante, durante três meses os ratos foram mantidos em gaiolas de enriquecimento (Figura 5), que possibilita os ratos se exercitarem, brincarem com diferentes objetos e buscarem caminhos alternativos para a obtenção de alimento e água. Comprovou-se que esse modo de manutenção favorece o aprendizado visuo-espacial e motor, atribuído a uma alta taxa de geração de novos neurônios no hipocampo (Praag H. e cols., 1999).

Experimentos iniciais no escopo desta tese demonstraram significativa marcação de doublecortina (marcador de neuroblastos), em ratos com 8 semanas de vida, por toda extensão da banda migratória rostral (desde a parede lateral do ventrículo lateral até o bulbo olfatório) e também na camada subgranular do giro denteado hipocampal (Figura 6).



Figura 5: Gaiolas com meio enriquecido. As gaiolas nas quais os ratos foram mantidos durante 3 meses possibilitam os ratos percorrerem uma série de obstáculos na busca de alimento e água, além de se exercitarem fisicamente, favorecendo o aprendizado visuo-espacial e a neurogênese hipocampal.

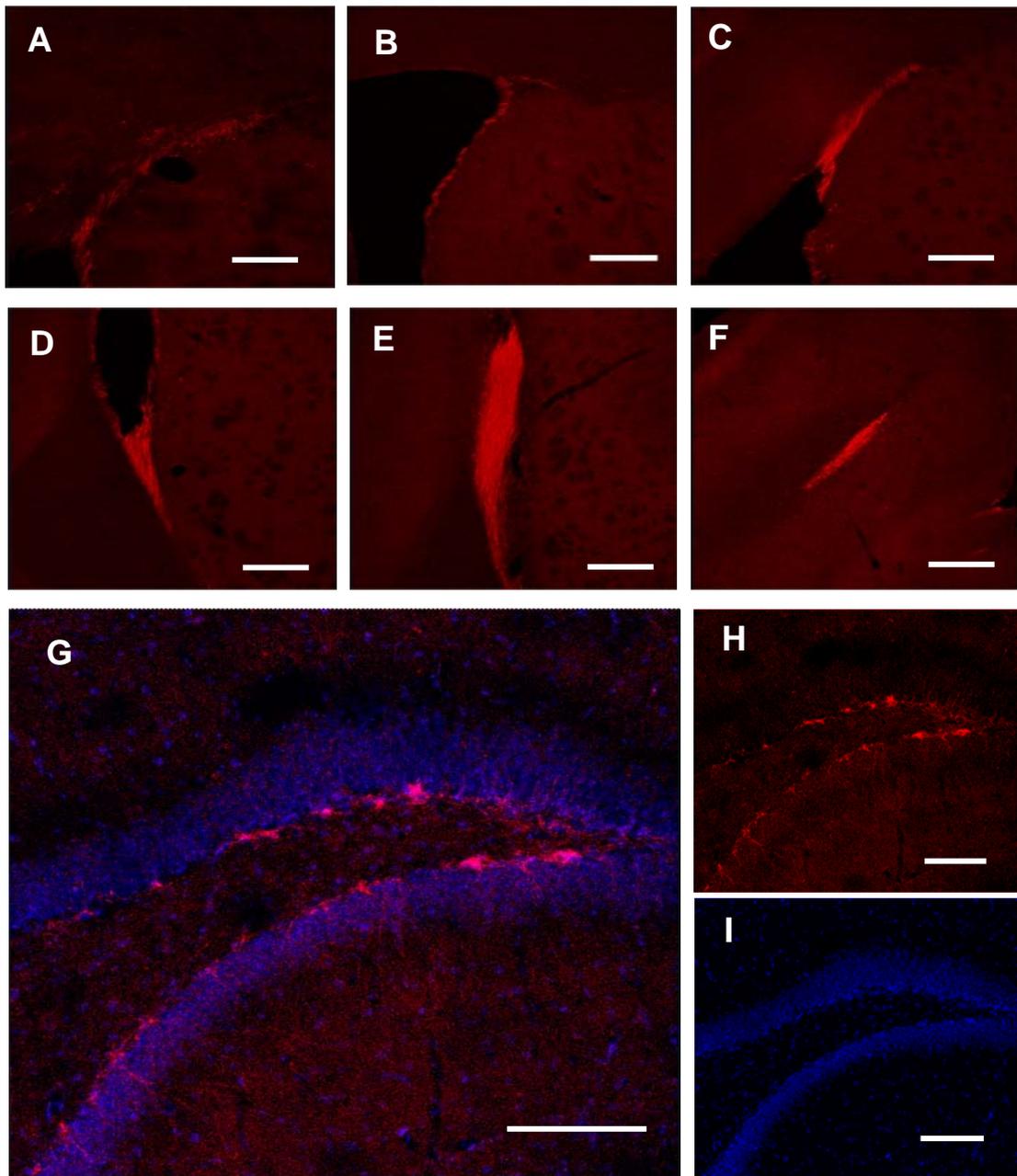


Figura 6: A-F: Banda migratória rostral de ratos com 8 semanas de vida mantidos em gaiolas de enriquecimento. Coloração: doublecortin. G-I: camada subgranular do giro denteado do hipocampo. Coloração: doublecortin em vermelho e Dapi em azul. Barra de escala: A – F : 300 μ m; G – I: 150 μ m

3.7 Perfusão e corte histológico

Após 6 e 12 semanas do implante, os animais foram anestesiados com cetamina intraperitoneal, incisados por toracofrenolaparotomia mediana, perfundidos continuamente com 500mL de solução fresca de PBS gelado, seguido de 500mL de paraformaldeído gelado a 4%. Os encéfalos foram retirados da caixa craniana e pós-fixados por uma noite em paraformaldeído (PFA) 4%. A seguir, foram imersos em solução glicosada a 30% até o decantamento do cérebro no frasco, o que em geral ocorreu após 2 a 3 dias, e preservados em solução de anti-congelamento (contendo 30% de glicerina e 30% de etilenoglicol em PBS) a -20°C até o momento do corte. Para secção do cérebro em fatias, os mesmos foram lavados em PBS, colocados sobre criótomo, recongelados a -20°C e cortados coronalmente a 40µm de espessura em toda a sua extensão. Os cortes foram organizados em 5 séries de maneira seqüencial, e preservados a -20 °C em solução anticongelamento até o momento da coloração.

3.8 Imunohistoquímica de fluorescência

A coloração foi realizada no tecido em suspensão. Inicialmente, os cortes foram lavados 5 vezes com solução de PBS com Tween 0,05% (Merck, Darmstadt, Alemanha), cada lavagem durando 10 minutos, removendo-se a solução do frasco com a ajuda de um pequeno filtro e de um pincel para a máxima preservação do tecido. Após as sucessivas lavagens ocorreu incubação em 10 mL de solução bloqueadora contendo 5% de soro de cabrito (Sigma) e 0,3% de Triton X-100

(Sigma) em PBS durante uma hora em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados durante 24 horas a 4°C sobre um agitador, em solução com anticorpos primários diluídos em 0,3% de Triton X-100 e PBS. Os cortes foram novamente lavados 5 vezes com a solução PBS-Tween e, a seguir, incubados por 24 horas a 4°C com os anticorpos secundários diluídos juntamente com 0,3% de Triton X-100 e DAPI (1:10.000) para a coloração do núcleo. Passadas as 24 horas os cortes foram novamente lavados 4 vezes com a solução PBS-Tween. Após coloração, os cortes foram ordenados anatomicamente em direção ântero-posterior sobre lâminas previamente lavadas com glicerina e recobertos com solução conservante (DAKO S3023, Carpinteria, CA, EUA) para preservação da reação de imunofluorescência.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: para marcação astrocitária, anti-GFAP (proteína glial fibrilar ácida, policlonal de coelho, 1:600, Millipore); para neuroblastos anti-Dcx (doublecortina, policlonal de porco-da-índia, 1:3.000, Santa Cruz); para neurônios jovens anti- β III tubulina (proteína do citoesqueleto, monoclonal de camundongo, 1:400, Sigma); para neurônios maduros: anti-MAP2ab (proteína associada ao microtúbulo II, monoclonal de camundongo, 1:200, Millipore), anti-NeuN (proteína neuronal nuclear específica, monoclonal de camundongo, 1:250, Millipore), anti-NF-200 (neurofilamento de alto peso molecular, 200KDa, monoclonal de camundongo, 1:200, Millipore), além de anti-GAT-1 (transportador N° 1 de ác. gama-amino-butírico, GABA, policlonal de coelho, 1:500, Millipore) e anti-glutamato (monoclonal de camundongo, 1:5000, Millipore). Os anticorpos secundários foram anti-camundongo, anti-coelho ou anti-porco-da-índia Alexa Fluor 594 (Molecular

Probes, Karlsruhe, Alemanha), usados a 1:200, e os núcleos foram marcados com 4,6'-diamino-fenil-indol-di-hidroclorido, DAPI (Sigma, 1:10.000). Tabela 2.

Tipo celular	anticorpo	fornecedor	hospedeiro	tipo	concent.
Astrócitos	GFAP	DAKO	coelho	policlonal	1:600
Neurônio imaturo	β III tubulina	Sigma	camundongo	monoclonal	1:400
	Dcx	Santa Cruz	porco da índia	policlonal	1:3000
Neurônio maduro	MAP 2ab	Millipore	camundongo	monoclonal	1:200
	NF 200	Millipore	camundongo	monoclonal	1:200
	NeuN	Millipore	camundongo	monoclonal	1:250
	glutamato	Millipore	camundongo	monoclonal	1:5000
	GAT-1	Millipore	coelho	policlonal	1:500
Secundários					
Anti-camundongo	Alexa 594	Mol.Probes	cabrito	policlonal	1:200
Anti-coelho	Alexa 594	Mol.Probes	cabrito	policlonal	1:200
Anti-porco da índia	Alexa 594	Mol.Probes	cabrito	policlonal	1:200

Tabela 2: Anticorpos primários e secundários utilizados na imunohistoquímica de fluorescência, com respectiva especificidade, fornecedor, hospedeiro, tipo e concentração.

3.9 Microscopia confocal

Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio confocal de fluorescência a *laser* SMP2 Leica® (Munique, Alemanha) equipado com *laser* diodo de 405nm, Ar-Kr 488nm, Ar 594 e Xn633. O tecido foi escaneado a cortes de 2 μ m e a aquisição de imagens foi feita com *airy-unit* 1, garantindo confocalidade máxima com regulagem variável do *pinhole*, em objetiva de 60x. A seguir, as mesmas foram digitalizadas a 2048 por 2048 *pixels* e gravadas em formato “tif” para ulterior compilação no programa Adobe-Photoshop CS2. Foram então documentadas figuras representativas da diferenciação neuronal em alguns cortes selecionados.

3.10 Estereologia

Para quantificação das células neuronais derivadas das células implantadas, os encéfalos de 30 animais (6 do grupo 1, 8 do grupo 2, 8 do grupo 3 e 8 do grupo 4) corados com NeuN (marcador do núcleo de neurônios maduros) foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX61 (Olympus Europe, Hamburgo, Alemanha) equipado com câmera digital de alta sensibilidade DP70 e sistema de estereologia Olympus C.A.S.T. (*computed assisted stereological toolbox*). Foram contadas células que co-expressam NeuN e GFP, em cada uma das duas áreas de interesse (hipocampo e estriado), vide Figura 7. Este processo foi realizado por meio de estereologia, varrendo-se sistematicamente, por meio de uma mesa automática, todos os cortes de uma das 5 séries de cada animal, na seqüência rostro-caudal, albergando-se toda a extensão do hipocampo dorsal e do corpo estriado, perfazendo um total de 8 a 13 cortes por estrutura, a uma magnificação de 40x e em uma janela de 50 x 50 μ m de tamanho, varrendo-se toda a espessura de corte (40 μ m) em cada campo visual.

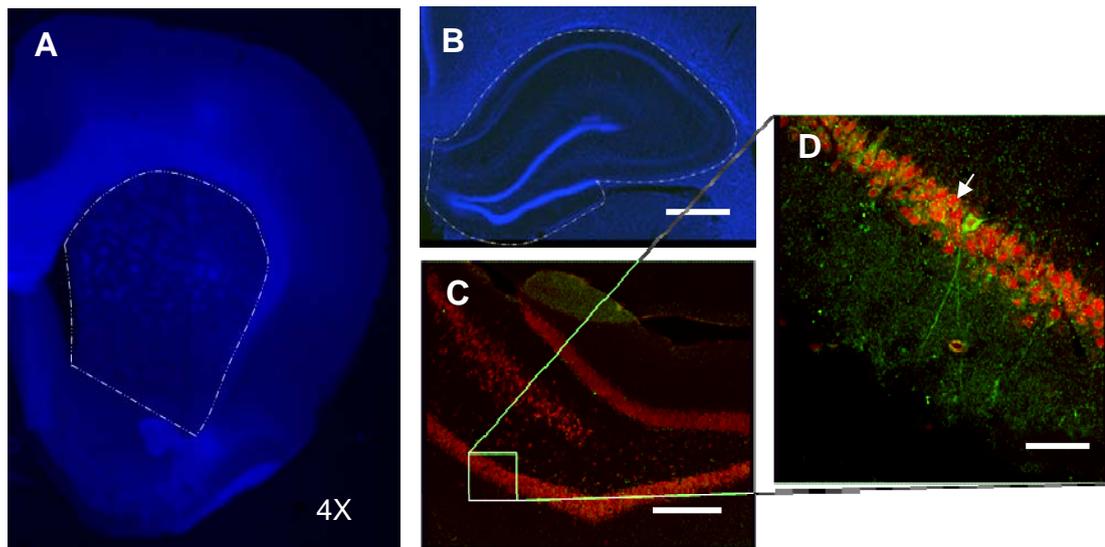


Figura 7: Destaque do estriado(A) e giro dentado do hipocampo (B) em corte com marcação com DAPI. Em C as células foram marcadas com NeuN e em D observam-se célula com marcação com GFP. Barra de escala B e C: 250 μm e D: 60 μm .

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada em *software* JMP 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), gráficos foram compilados em JMP ou em Igor 5.04 (Wavemetrics, Portland, EUA). Para análise estatística, foram calculadas primeiramente as medidas-resumo dos dados iniciais por métodos convencionais (média, mediana, quantis, 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 e leva em conta o tamanho da amostra. Adicionalmente, os dados são apresentados na forma de *box-plots* e diamantes médios, para facilitar a comparação visual entre os grupos. Na representação em *box-plots*, a altura dos retângulos representa a distância interquartil 25-75%, a linha horizontal a mediana, e as linhas verticais os extremos da distribuição. No gráfico de diamantes médios, a altura do losango

reflete o intervalo de confiança 95%, a largura remete ao tamanho da amostra, a linha horizontal central é a média aritmética, e as linhas superiores e inferiores marcam uma zona na qual intersecção com outro diamante marca não-rejeição da hipótese nula para um erro α de 5%. Em situações especiais foi mostrada a distribuição cumulativa. Avaliou-se a seguir a distribuição dos dados experimentais por meio de gráficos de histogramas e por meio de gráficos de quantis normais, onde a aproximação da reta representa distribuição gaussiana. Para comprovação ou rejeição da hipótese de distribuição normal foi usado o teste de Shapiro-Wallis, onde um baixo valor de W significa distribuição não-normal. Em função dessa análise selecionou-se o teste Mann-Whitney U, ideal para dados não-paramétricos, e seu correspondente Kruskal-Wallis para comparações múltiplas (equivalente à ANOVA, porém adequado para dados de distribuição não-normal). Os testes de comparação de médias foram ilustrados graficamente por intersecção de círculos, onde um ângulo na intersecção menor que 90° indica significância estatística para um erro α de 5%. Os valores de significância foram representados por asteriscos, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4. Resultados

4.1 Isolamento e caracterização de CTMs murinas

Com o protocolo descrito, foi possível isolar uma população homogênea de células estromais medulares com corpo celular volumoso e achatado, poucos prolongamentos e núcleo de cromatina frouxa. Adicionalmente, as células foram caracterizadas do ponto de vista imunocitoquímico e se revelaram intensamente positivas para o marcador mesenquimal vimentina, além de duplamente positivas para nestina e GFAP, marcadores que são normalmente co-expressos em células-tronco neurais derivadas de tecido fetal ou embrionário. Quanto à capacidade replicativa, $99.3 \pm 0.5\%$ captaram BrdU após 6 horas de exposição (Figura 8).

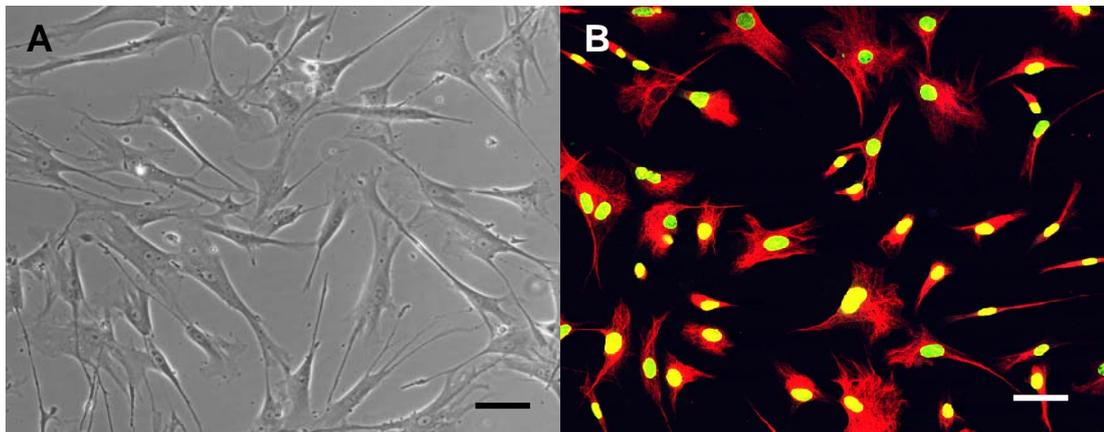


Figura 8: A: Células-tronco mesenquimais vistas em microscópio invertido. A replicação celular é mostrada em B, onde a marcação positiva amarelo mostra que a maioria das células captou bromodeoxiuridina após 6 horas de exposição. Barra de escala em A e B: 50

4.2 Transfecção lentiviral

A taxa de sucesso da transfecção lentiviral foi de $82,5 \pm 3,4\%$, o que foi acentuadamente superior à reportada na Literatura (Jiang e cols. 2003) – vide figura 9. Isso provavelmente se deve ao fato da utilização de 5 partículas virais por célula. Além do mais, altos níveis de expressão foram mantidos durante todo o processo de diferenciação neuronal *in vitro*, como exposto abaixo. A taxa de viabilidade celular também foi acessada imediatamente antes do implante estereotáxico, e foi de $94,9 \pm 1,2\%$.

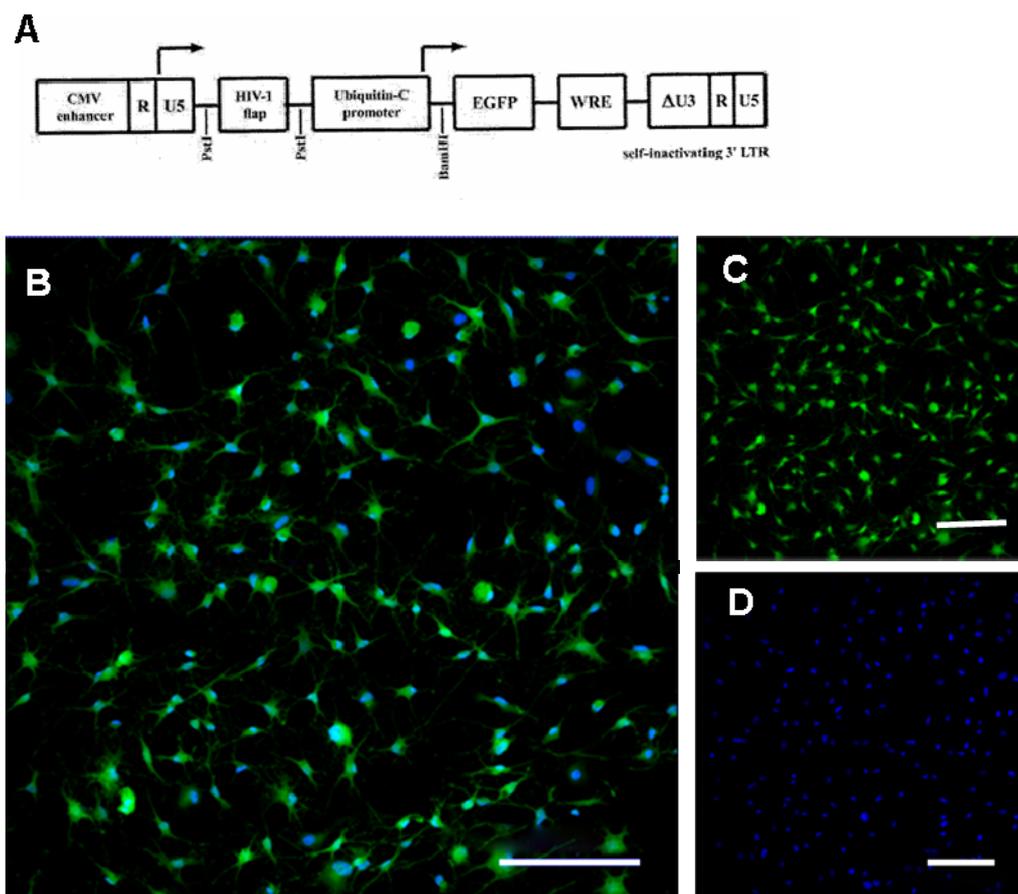


Figura 9: Eficiência da transfecção lentiviral em células-tronco mesenquimais *in vitro*. **A.** Lentivirus usado para condicionar expressão de GFP nas células transfectadas. **B, C, D.** Fotografia em microscopia confocal mostrando expressão de GFP (verde) e núcleos corados com DAPI em azul. Nota-se que $82,5 \pm 3,4\%$, das células expressam altos níveis de GFP mesmo após 3 meses de cultivo. Barra de escala 150 μ m.

4.3 Diferenciação neuronal *in vitro*

Durante a fase de expansão das células estromais, realizada em meio contendo 10% de soro fetal, observou-se manutenção da morfologia descrita após o isolamento.

Após mudança para meio de indução neuronal, no entanto, as células tenderam a se agrupar em esferas, que passaram a se expandir clonalmente; algumas células se destacaram desses agrupamentos e aderiram à poli-L-lisina; aderindo-se à superfície de cultivo, os corpos celulares assumiram morfologia piramidal ou triangular, e emitiram prolongamentos primários (<3) curtos e não-ramificados, com dilatações em sua extremidade semelhantes aos cones de crescimento dos neuritos de neuroblastos (Figura 10). Quanto à expressão de proteínas analisadas por imunocitoquímica, notou-se aumento dos níveis de nestina e GFAP e, semelhantemente ao já observado para as células humanas, expressão de SOX2, PSA-NCAM e β III-tubulina.

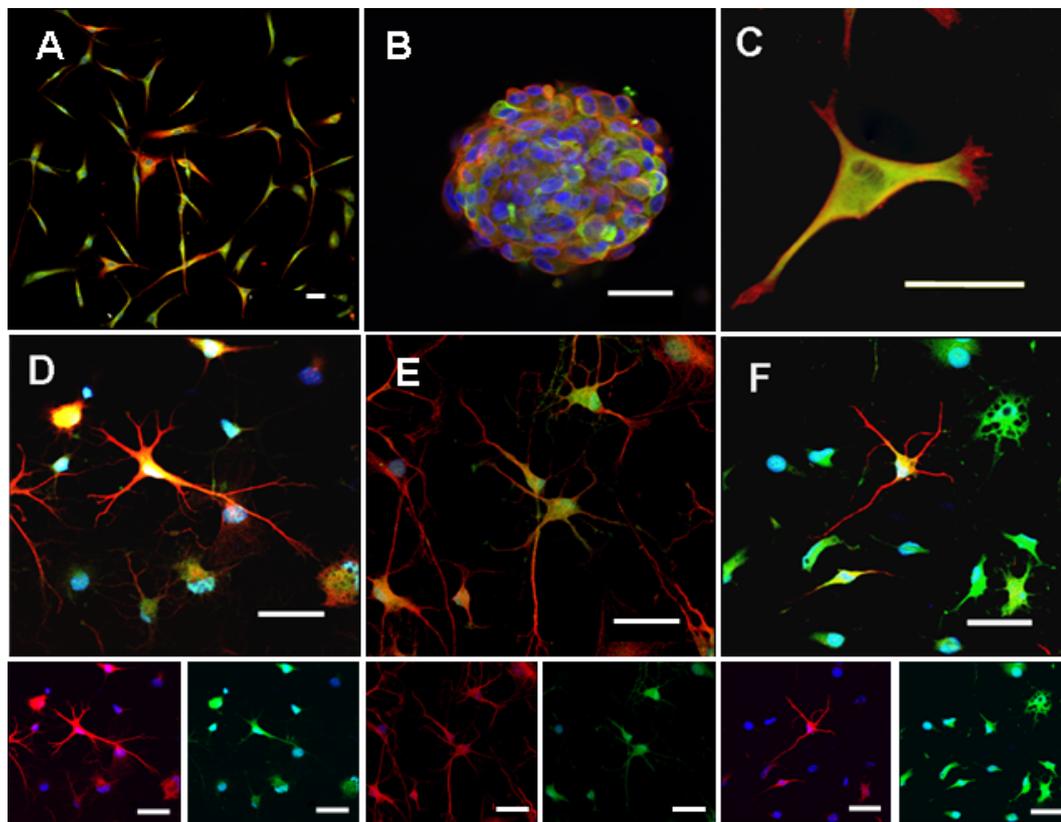


Figura 10: Expansão e neurodiferenciação das células-tronco mesenquimais *in vitro*. **A:** seleção de CTMs em meio básico contendo 10% de soro fetal bovino. As células GFP+ (verdes) também são coradas para vimentina (vermelho); os núcleos corados com DAPI aparecem em azul. **B:** Expansão das células em esferas em meio com bFGF e EGF. A esfera contém células GFP+ também marcadas para nestina (vermelho); núcleo corado com DAPI. **C:** CTN plaqueada sobre poli-lisina. A célula GFP+ em destaque marca-se positivamente para nestina (vermelho), e mostra tipicamente um corpo celular piramidal, prolongamentos primários terminando em cones de crescimento. Seguiu-se cultivo em meio contendo IBMX e BDNF para a indução de um fenótipo neuronal mais maduro, caracterizado por corpo celular de morfologia piramidal ou circular, com prolongamentos terciários e quaternários. Nessa fase, notou-se marcação positiva para **(D)** β III-tubulina (vermelho), **(E)** MAP2 (vermelho) e **(F)** NF200 (vermelho). Barras de escala: 40 μ m

Na terceira e última fase do processo de diferenciação, as células induzidas foram expostas a um meio contendo IBMX e AMPc. O que se observou a seguir foi o aumento do número de prolongamentos celulares (>4), além da ramificação em prolongamentos secundários, terciários e quaternários. Do ponto de vista imunocitoquímico, registrou-se a expressão de marcadores neuronais, como β III-tubulina (aumento de expressão), bem como surgimento da expressão de NF200 e

MAP2ab, marcadores de neurônios mais maduros (Figura 10). A porcentagem de células positivas para NF200, um marcador específico de neurônios maduros, foi de $14,5 \pm 1,1\%$.

Estando comprovada a capacidade das células murinas de se transdiferenciarem a neurônios *in vitro*, de modo semelhante ao já observado para as células humanas, pôde-se passar à fase seguinte, de estudo da diferenciação *in vivo*, escopo central desse trabalho. O motivo da escolha de células de roedores como fonte celular deve-se à possibilidade de se utilizar, nesse modelo, células isogênicas, abrindo mão de terapia imunossupressora e de suas possíveis conseqüências indesejáveis, como perda de animais por infecção.

4.4 Diferenciação neuronal *in vivo*

4.4.1 Análise imunohistoquímica descritiva

Primeiramente, a análise dos enxertos revelou que os implantes ocorreram nos alvos planejados, ou seja, no caudado-putâmen, lateralmente à banda migratória rostral, e no hilo do giro denteado hipocampal. Merece menção, no entanto, que o volume dos enxertos estriatais verificado nos cortes histológicos 6 e 12 semanas após o implante foi maior que o volume dos enxertos hipocampais (Figura 11). Na região do enxerto estriatal, notou-se intensa reação astrocitária (GFAP), desorganização da cito-arquitetura matricial, além de intenso sinal GFP no interstício. De maneira oposta, nos enxertos hipocampais, houve preservação da cito-arquitetura, ausência de marcação intersticial, ausência de reação astrocitária,

além de dispersão do enxerto homoganeamente pela estrutura hipocampal (Figura 12).

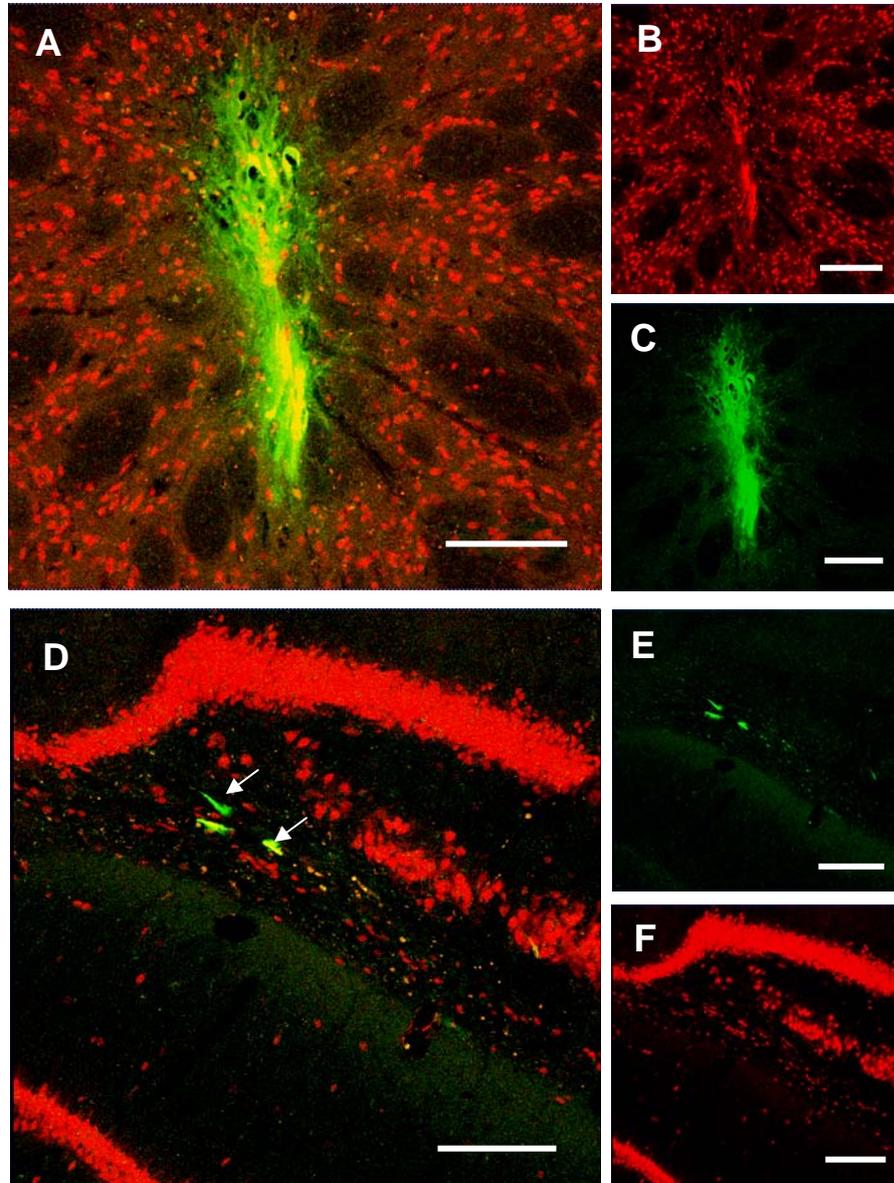


Figura 11: Implante de CTMs no estriado (A, B e C) e no hipocampo (D, E e F). Em vermelho estão marcadas células NeuN+ e em verde as células GFP+. Em A observa-se impregnação matricial do sinal GFP, secundariamente a uma provável reação inflamatória; adicionalmente, nota-se ausência de migração significativa das células transplantadas. No hipocampo (D) não se observou degeneração das células implantadas, e não houve desestruturação da cito-arquitetura hipocampal; contrariamente ao ocorrido no estriado, as células migraram harmonicamente e se distribuíram por toda a formação hipocampal. Barra de escala A- C: 150 μ m e D - E: 180 μ m.

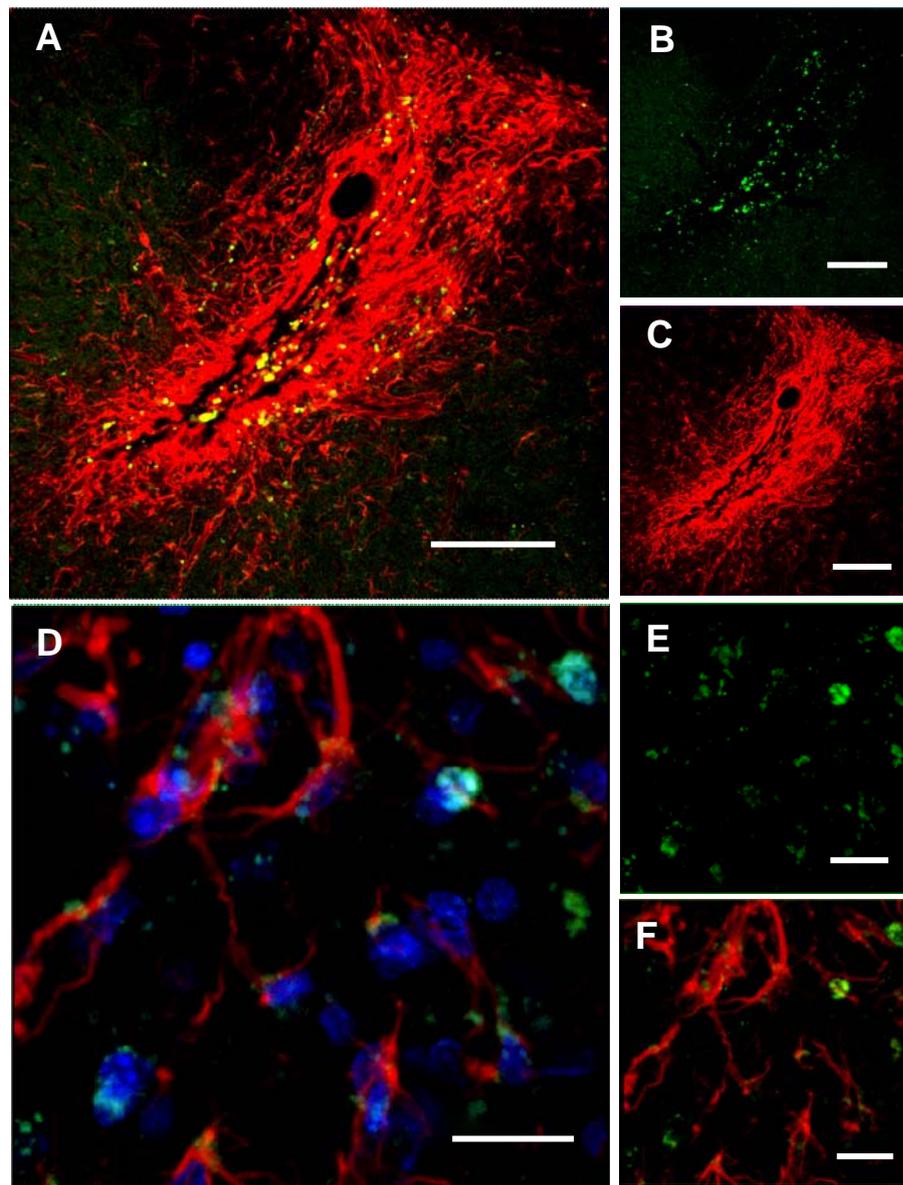


Figura 12: Local do implante das células-tronco mesenquimais na região do estriado. Em A podemos ver o local do implante e a forte marcação para GFAP (em vermelho) mostrando a presença de um grande número de astrócitos. Em D pode ser visto o mesmo local em um maior aumento e a comprovação que não houve dupla marcação GFAP (vermelho) e GFP(verde). Barras de escala A – C: 125 μ m e D – E: 15 μ m

Não foram observadas células verde-fluorescentes nos animais-controle. Nos animais com células implantadas no estriado, células GFP-positivas foram encontradas no núcleo acumbente, no córtex pré-frontal e no bulbo olfatório. Naqueles animais com células implantadas no hipocampo, observaram-se células

GFP-positivas nos cornos de Amon hipocampais, no giro denteado e também no córtex temporal (Figuras 13, 14, 15 e 16)

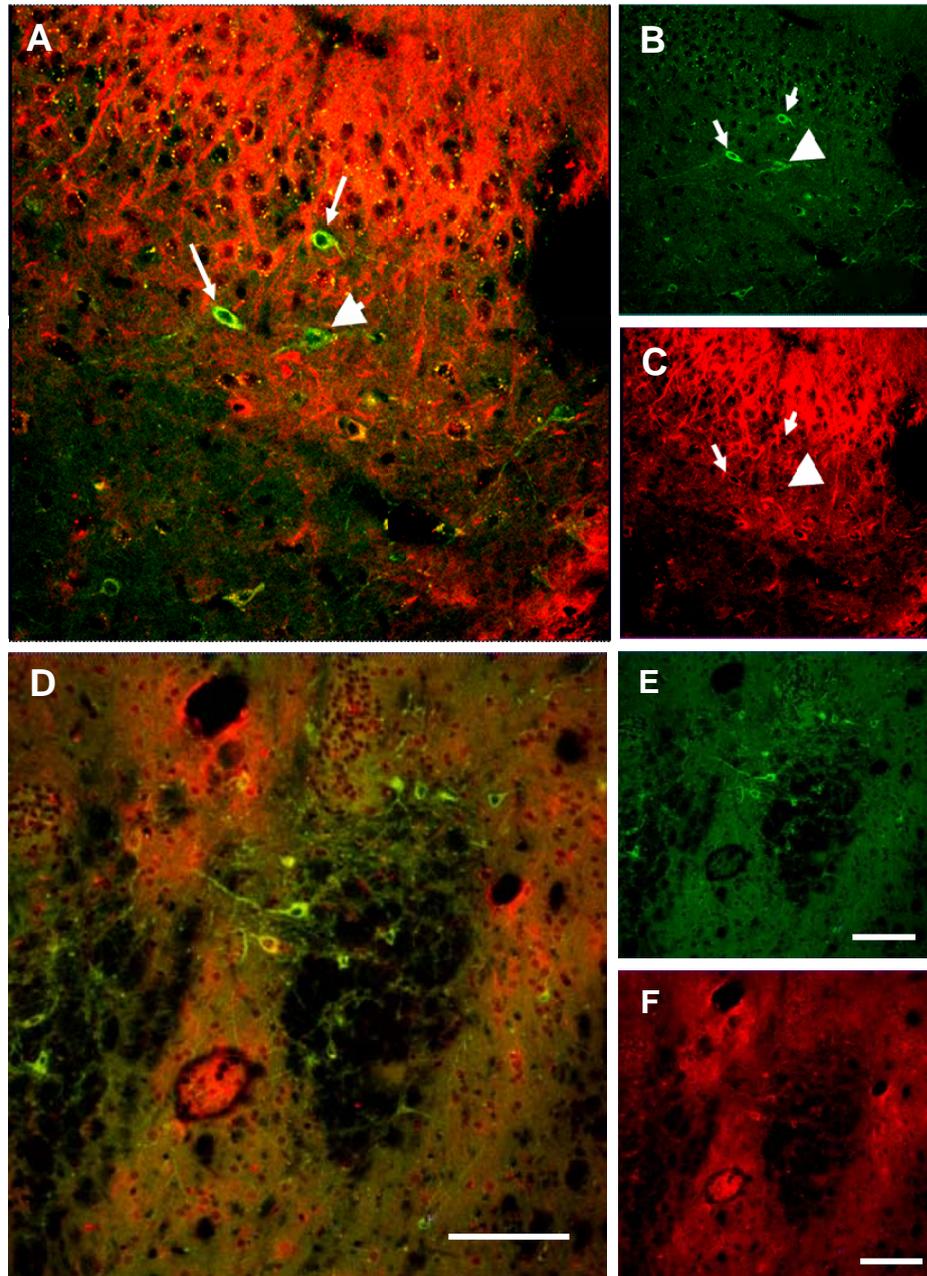


Figura 13: Cortes de cérebro de rato que recebeu o implante de células-tronco mesenquimias na região do estriado. Em A pode-se ver o núcleo acumbente com células GFP+ (verde) marcadas também para β III tubulina (vermelho). Em D observa-se a região do bulbo olfatório com células GFP+(verde) positivas para β III tubulina (vermelho). Barra de escala A - C: 80 μ m, D - F: 120 μ m

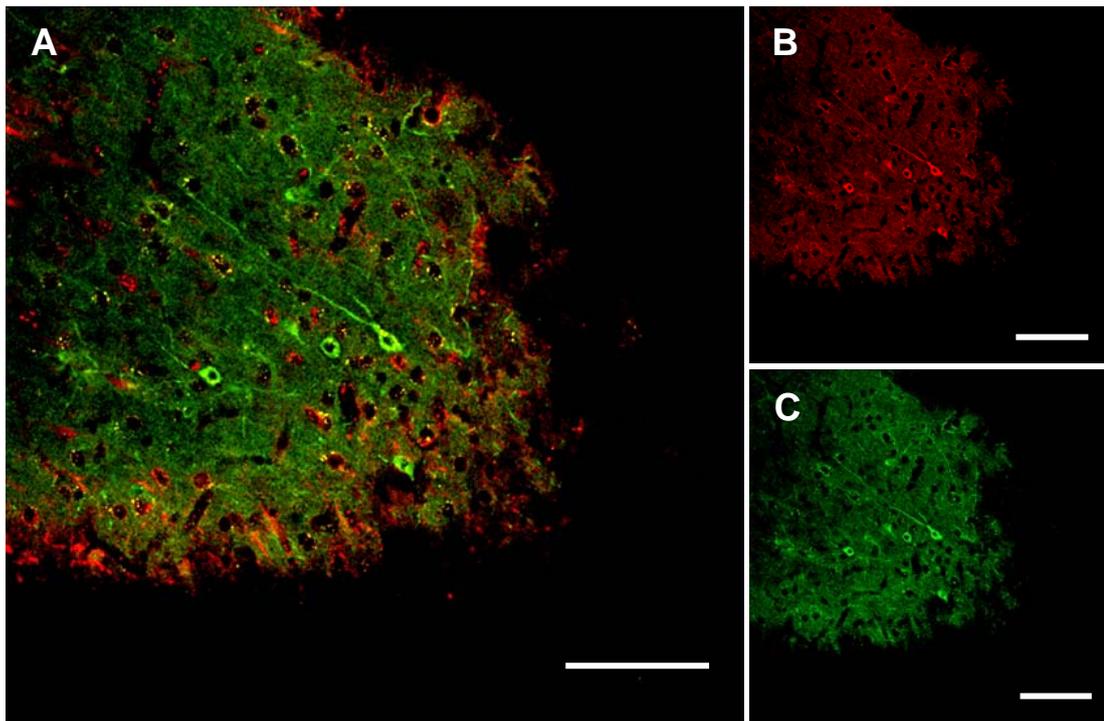


Figura 14: Córtex pré-frontal de rato que recebeu implante de células-tronco mesenquimais no estriado. Em A vemos as células GFP+ (verde) positivas para β III tubulina (vermelho). Barra de escala A - C: 100 μ m.

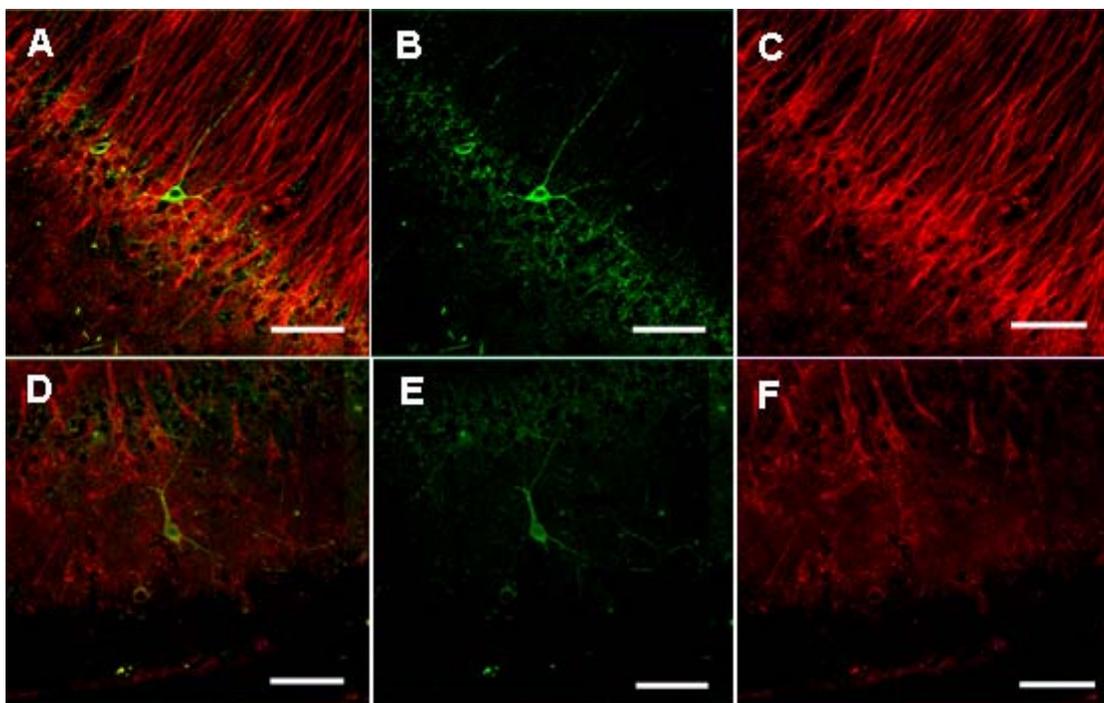


Figura 15: Cortes de cérebros de animais que receberam implante de células-tronco mesenquimais no hipocampo. Observa-se células positivas para GFP (verde) e β Tubulina (vermelho), em CA 3 (A, B e C) e em CA1 (D, E e F). Barra de escala A- F: 70 μ m

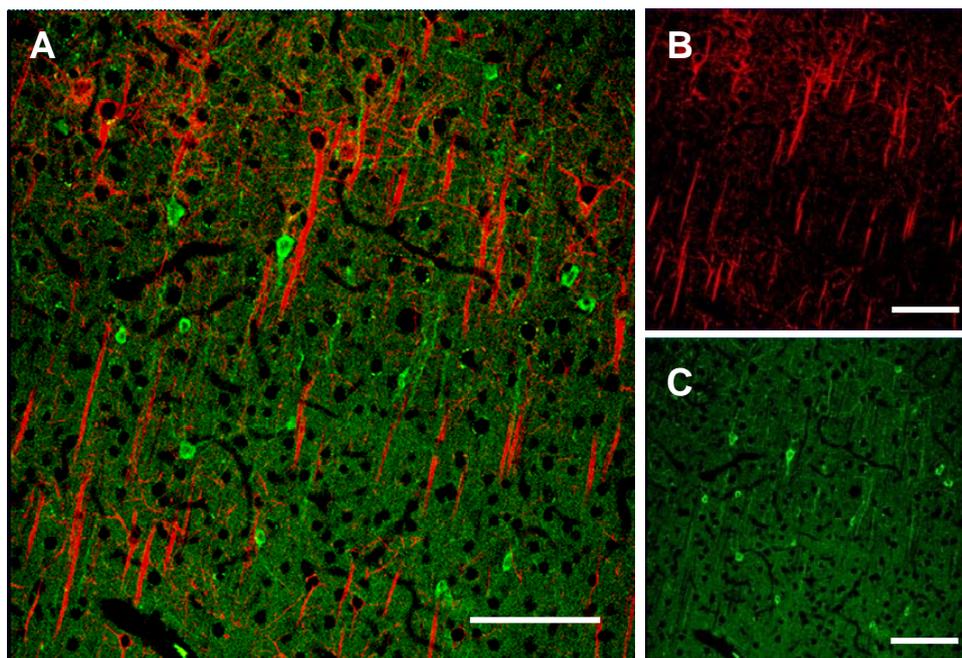


Figura 16: Corte do córtex temporal de rato que recebeu implante de células-tronco mesenquimais no hipocampo. Pode-se ver a presença de células GFP+ (verde) por todo o corte. Em vermelho estão marcadas as células NF200+. Barra de escala A- C: 100 μ m

Interessante notar que nos locais distantes do sítio de implante observaram-se neurônios jovens β III-tubulina-positivos ou doublecortina-positivos, mas não neurônios maduros NF200-, MAP2ab- ou NeuN-positivos. Particularmente, no córtex temporal não houve geração de neurônios piramidais (Figura 16). Por outro lado, no hipocampo, pôde-se observar neurônios maduros NeuN- (Figura 17) e NF-200-positivos (Figura 18). Quanto a subtipos neuronais, encontrou-se positividade para GAT-1, (transportador de GABA, neurotransmissor inibitório nas células maduras e excitatório nas células imaturas) - vide Figura 19, e glutamato, neurotransmissor excitatório (Figura 20).

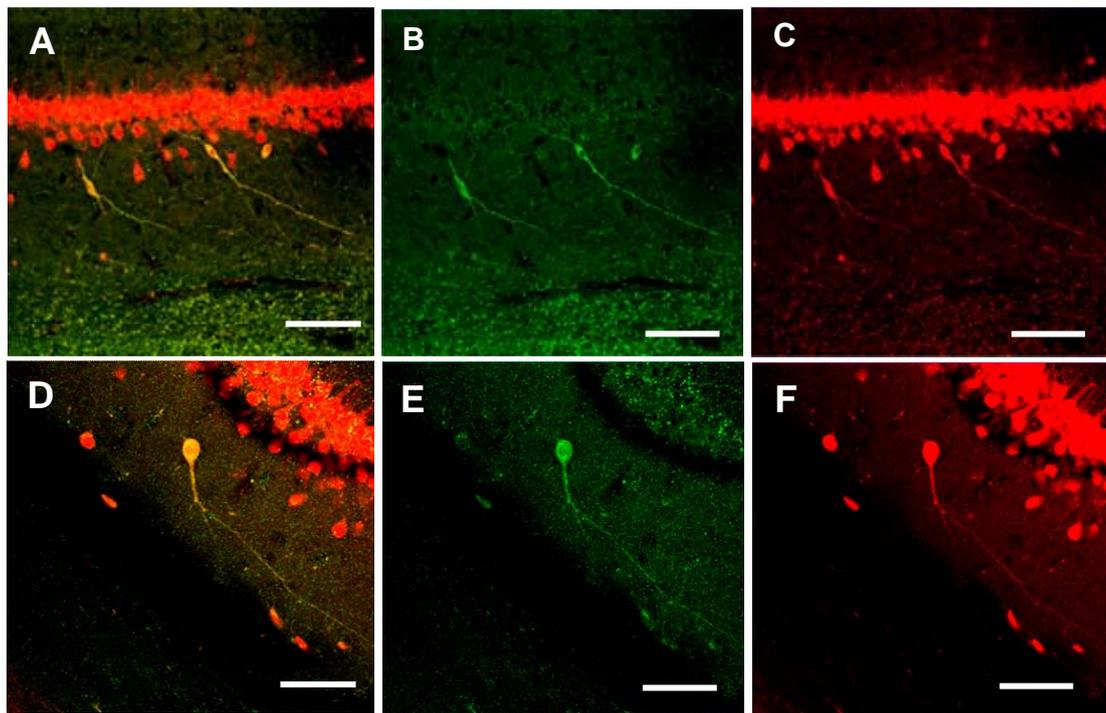


Figura 17: Microscopia confocal mostrando células neuronais maduras duplamente positivas para NeuN (vermelho) e GFP (verde) na região CA1 do hipocampo de rato que recebeu implante de células-tronco mesenquimais no hipocampo. Barra de escala A – F: 100 μ m. A – C: 90 μ m e D – F: 60 μ m

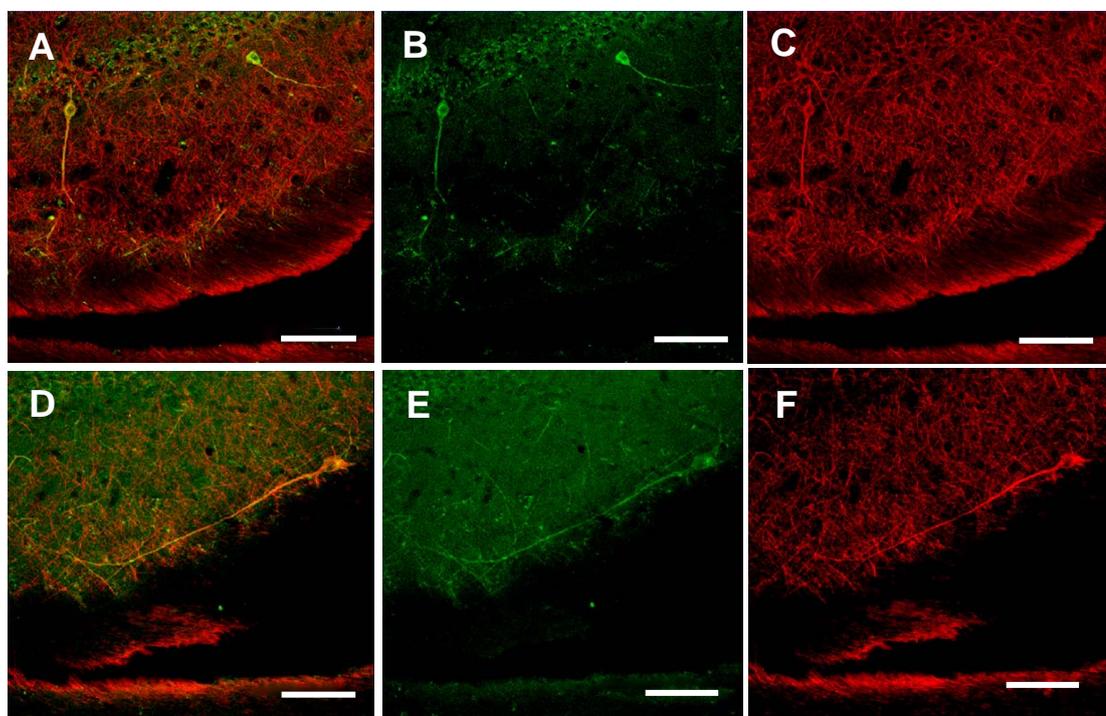


Figura 18: Microscopia confocal mostrando células neuronais maduras duplamente positivas para Neurofilamento 200 (vermelho) e GFP no hipocampo de rato que recebeu transplante no hipocampo. A – F: 90 μ m.

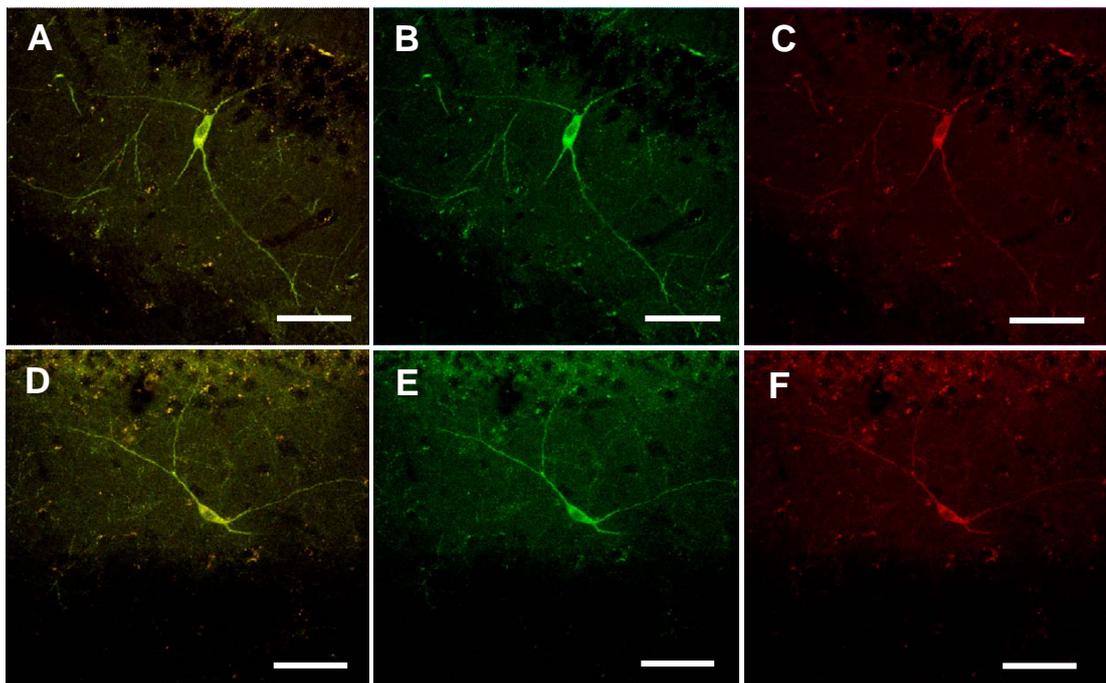


Figura 19: Microscopia confocal demonstrando síntese de neurotransmissor GABA (através da positividade para seu transportador específico, GAT-1, mostrado em vermelho), colocalizado com GFP em células neuronais maduras no hipocampo de rato que recebeu implante de células-tronco mesenquimais no hipocampo. Barra de escala: A – F: 60 μm

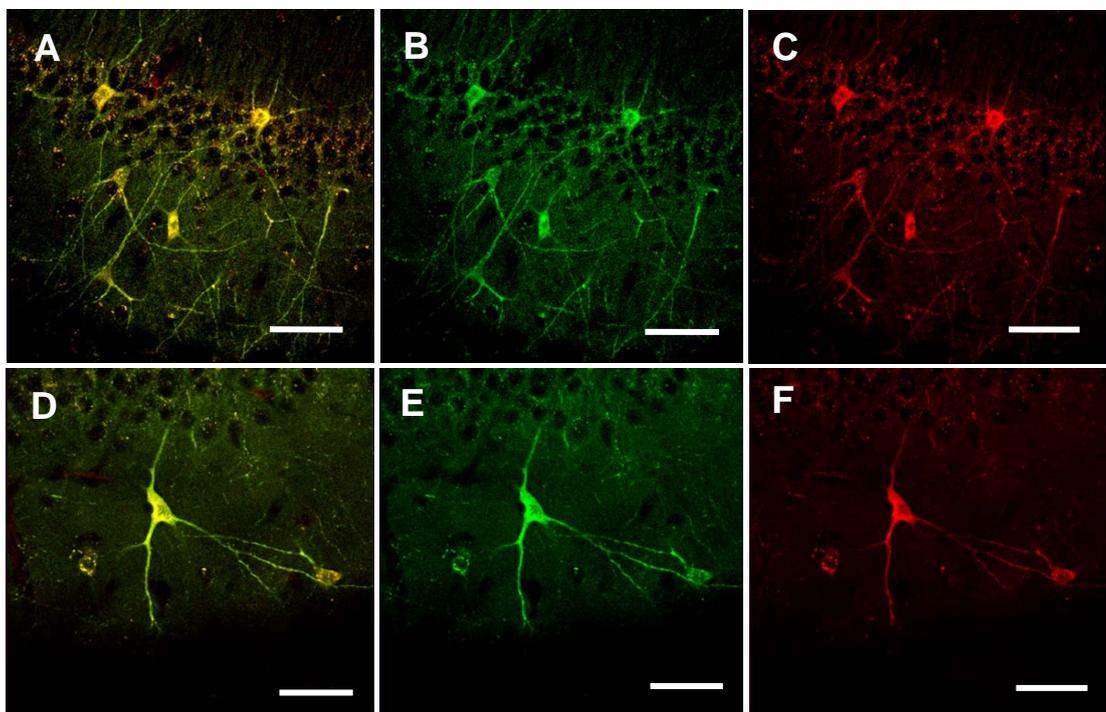


Figura 20: Microscopia confocal ilustrando síntese de neurotransmissor glutamato (em vermelho), co-expresso com GFP (verde) em células neuronais maduras no hipocampo de rato que recebeu implante de células-tronco mesenquimais no hipocampo. Barra de escala: A – C: 60 μm D – F: 50 μm

4.4.2 Análise estereológica

Na etapa seguinte foi realizada a quantificação da diferenciação neuronal baseando-se na marcação para NeuN, que é um marcador de núcleos de neurônios maduros, e GFP, que é expressa no citoplasma das células implantadas. Essa não-colocalização espacial dentro da célula permitiu uma distinção bastante precisa e rápida das células duplamente positivas em ambiente estereológico, ou seja, em epifluorescência. A tabela abaixo mostra a contagem geral de células NeuN-GFP positivas nas várias condições experimentais, em 30 ratos (dos 40 iniciais) que foram usados para estereologia, sendo que outros 10 ratos foram utilizados para outras marcações.

<i>Rato</i>	<i>contagem NeuN-GFP</i>	<i>alvo</i>	<i>semanas de sobrevivida</i>	<i>meio</i>
1	910	hip	6	basal
2	1100	hip	12	basal
3	1080	hip	12	basal
4	725	hip	6	basal
5	0	hip	6	basal
6	2605	hip	6	bFGF EGF
7	1700	hip	6	bFGF EGF
8	0	hip	6	bFGF EGF
9	985	hip	12	bFGF EGF
10	1030	hip	12	bFGF EGF
11	1960	hip	6	IBMX AMPc
12	1330	hip	6	IBMX AMPc
13	0	hip	6	IBMX AMPc
14	2790	hip	12	IBMX AMPc
15	3390	hip	12	IBMX AMPc
16	150	str	6	basal
17	90	str	12	basal
18	55	str	12	basal
19	15	str	6	basal
20	0	str	6	basal
21	65	str	6	bFGF EGF
22	300	str	6	bFGF EGF
23	0	str	6	bFGF EGF
24	100	str	12	bFGF EGF
25	145	str	12	bFGF EGF
26	15	str	6	IBMX AMPc
27	250	str	6	IBMX AMPc
28	0	str	6	IBMX AMPc
29	85	str	12	IBMX AMPc
30	20	str	12	IBMX AMPc

Tabela 3: Contagem das células NeuN-GFP positivas em várias condições experimentais em 30 ratos. Os ratos 5, 8, 13, 20, 23 e 28 são ratos-controle implantados somente com meio.

4.4.2.1 Análise da diferenciação em função do alvo

Primeiramente, avaliou-se a contagem de células neuronais derivadas das células estromais comparando-se os dois alvos, hipocampo e estriado. Contou-se 1634 ± 231 células duplamente positivas no hipocampo e somente 108 ± 24 no estriado (Mann-Whitney U $p < 0,001$, $n=12$) (Figura 21). Ou seja, notou-se diferenciação preferencial das células mesenquimais no hipocampo, comprovando a hipótese inicial de que a diferenciação neuronal seja favorecida numa área onde neurogênese ocorre fisiologicamente.

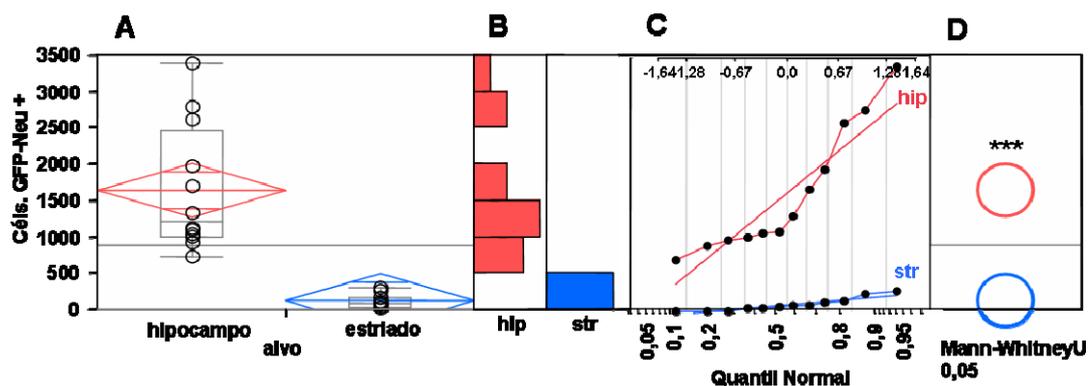


Figura 21: Diferenciação das células tronco-mesenquimais em função do alvo de implante. Em A, gráfico ilustrando a contagem de células duplamente positivas para GFP e NeuN no hipocampo e no estriado. Os círculos vazios representam os dados originais, os box-plots em cinza ilustram os quartis 25 e 75%, a mediana e a variabilidade da amostra; a altura dos losangos remete ao intervalo de confiança de 95%, a largura é diretamente proporcional ao tamanho da amostra, a linha horizontal central é a média, e as linhas superiores e inferiores marcam o limite de intersecção para grupos estatisticamente diferentes (para um α de 5%, baseado no teste t). Em B, histograma de frequências, onde nota-se a distribuição não-normal dos dados. Em C, representação da distribuição por meio de gráfico de quantis amostrais, onde as contagens são representadas por pontos negros e a distribuição normal teórica é representada por uma reta. Nota-se que os dados referentes ao hipocampo distribuem-se distantes da reta normal, ao passo que os dados referentes à contagem no estriado distribuem-se ao longo da reta normal para uma faixa de 0 a 500 células, o que denota distribuição gaussiana nessa faixa. Em D, representação gráfica do teste Mann-Whitney U, onde o raio do círculo é inversamente proporcional ao tamanho da amostra e a ausência de intersecção entre os círculos denota diferença estatística para um erro α de 5%.

4.4.2.2 Análise da diferenciação em função da sobrevivida

Numa etapa seguinte, procurou-se esclarecer o tempo necessário para completa diferenciação neuronal das células após o implante. Viu-se que nos períodos avaliados, ou seja, 6 e 12 semanas pós-implante, não houve diferença estatística entre os grupos. Mais precisamente, 1538 ± 285 células foram contadas no hipocampo após 6 semanas contra 1729 ± 438 após 12 semanas (Mann-Whitney U $p=0,8181$). Por outro lado, no estriado foram contadas 133 ± 50 após 6 semanas contra 83 ± 17 após 12 semanas (Mann-Whitney U $p=0,8181$). Considerando-se os dois grupos conjuntamente, foram 835 ± 253 células em 6 semanas contra 906 ± 324 em 12 semanas (Mann-Whitney U $p=1,0$) (Figura 22). Em resumo, conclui-se que 6 semanas é um tempo suficiente para que haja completa maturação das células estromais no cérebro hospedeiro.

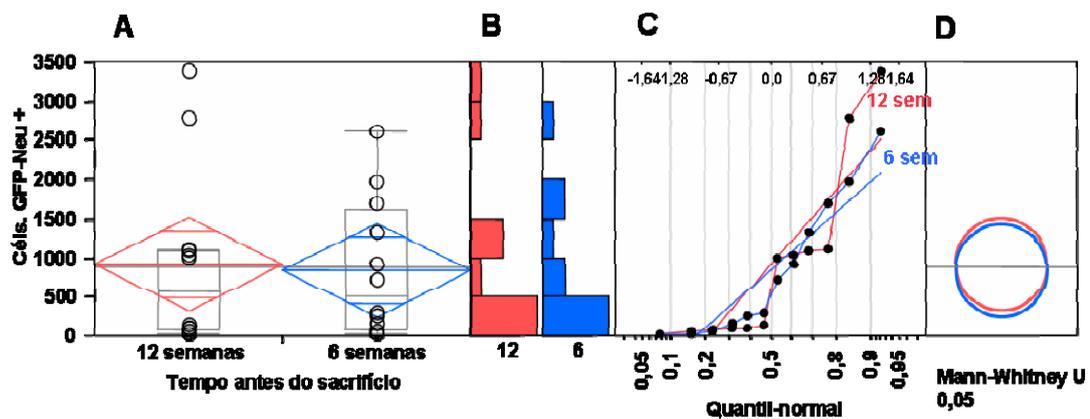


Figura 22: Diferenciação das células tronco-mesenquimais em função da sobrevivida. Em A, gráfico ilustrando a contagem de células duplamente positivas para GFP e NeuN nos grupos sacrificados 6 e 12 semanas após o implante. Representação gráfica por meio de dispersão, box-plots e diamantes médios semelhantes à Figura 17. Em B, histograma de freqüências. Em C, representação da distribuição por meio de gráfico de quantis amostrais semelhantes à Figura 17, onde se mostra distribuição livre. Em D, representação gráfica do teste Mann-Whitney U mostrando ausência de diferença estatística para um erro α de 5%.

4.4.2.3 Análise da diferenciação em função do estágio de evolução

4.4.2.3.1 nas duas regiões implantadas

A seguir, procurou-se esclarecer se o estágio de evolução das células durante a diferenciação é de importância para a maturação neuronal das mesmas. Para tanto, comparou-se a contagem de células neuronais após implante de células estromais cultivadas em meio básico, de células induzidas à diferenciação neuronal em meio contendo bFGF e EGF, e finalmente de células diferenciadas em meio contendo AMPc e IBMX. Considerando-se os grupos estriado e hipocampo conjuntamente, contaram-se 516 ± 171 células maduras derivadas das células “indiferenciadas”, 866 ± 323 células derivadas das células “induzidas” e 1230 ± 479 derivadas das células “diferenciadas” (Kruskal-Wallis p para “indiferenciadas” x “diferenciadas” 0,4619, para “indiferenciadas” x “induzidas” 0,4309, para “induzidas” x “diferenciadas” 0,9581). Apesar da falta de diferença estatística, notou-se pela distribuição de frequências cumulativas, que as contagens referentes ao grupo “diferenciadas” foi claramente superior aos demais dois grupos. Análise da contribuição relativa corrobora essa interpretação (Figura 23).

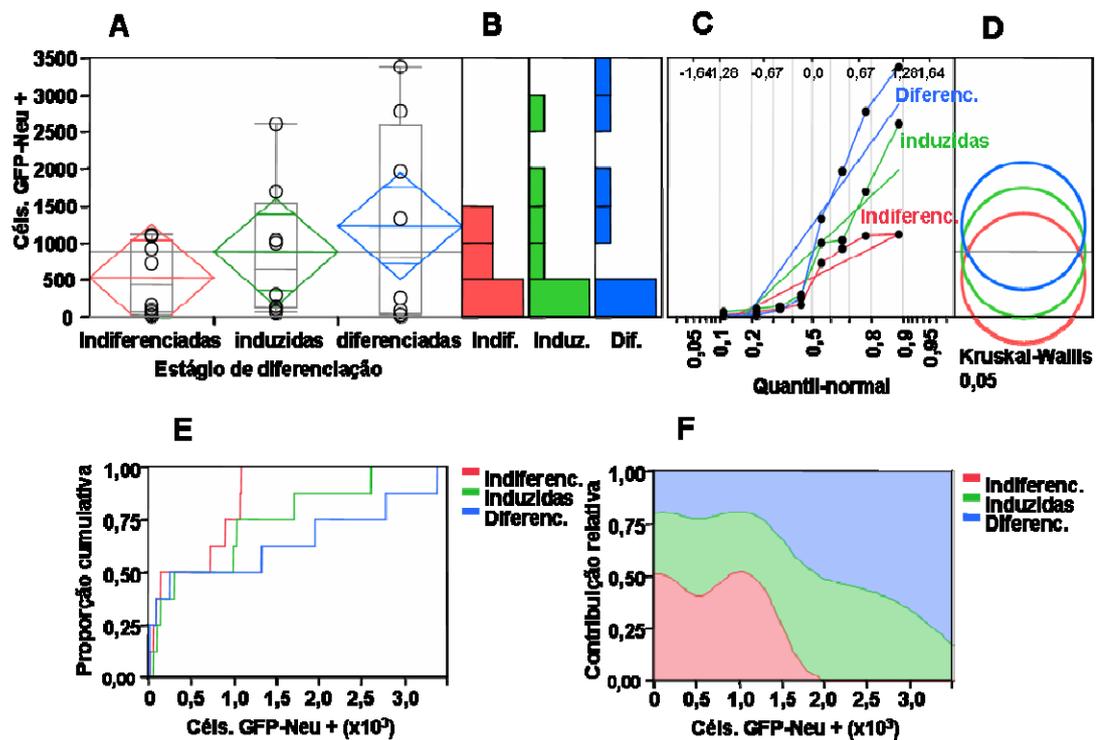


Figura 23: Diferenciação das células tronco-mesenquimais em função do estágio de evolução. Em A, gráfico ilustrando a contagem de células duplamente positivas para GFP e NeuN nos grupos implantados com células indiferenciadas, induzidas à diferenciação neuronal com meio bFGF-EGF e diferenciadas em meio contendo AMPc e IBMX. Representação gráfica por meio de dispersão, box-plots e diamantes médios semelhantes à Figura 17. Em B, histograma de freqüências. Em C, representação da distribuição por meio de gráfico de quartis amostrais semelhantes à Figura 17, onde se mostra distribuição livre. Em D, representação gráfica do teste Kruskal-Wallis, onde se mostra distribuição livre. No ponto de interseção entre os círculos menor que 90° indica diferença estatística para um erro α de 5% (no caso não há diferença estatística entre os grupos, para um erro α de 5%). Em E, gráfico de distribuição cumulativa mostrando que 100% da amostra referente às células indiferenciadas se situou abaixo de 1.000 células positivas por animal, ao passo que 50% da amostra referente às células diferenciadas se situou entre 1.000 e 3.500 células. Em F, gráfico ilustrando a contribuição relativa dos grupos, onde o grupo azul de células diferenciadas ocupou a maior área na parte direita do gráfico, associada às maiores contagens.

4.4.2.3.2 no hipocampo

Numa análise subsequente, procurou-se elucidar a diferenciação celular no hipocampo, onde o processo foi favorecido pelas condições locais, e no estriado separadamente. Para tanto, comparou-se a contagem de células neuronais após implante de células estromais cultivadas em meio básico, de células induzidas à diferenciação neuronal em meio contendo bFGF e EGF, e finalmente de células diferenciadas em meio contendo AMPc e IBMX como anteriormente mostrado. No hipocampo, contaram-se 954 ± 87 células neuronais derivadas do grupo de animais implantado com células estromais indiferenciadas, 1580 ± 379 derivadas do grupo implantado com células induzidas em bFGF-EGF e 2368 ± 453 derivadas do grupo de células diferenciadas em AMPc-IBMX (Kruskal-Wallis p para “indiferenciadas” x “diferenciadas” =0,0304, para “indiferenciadas” x “induzidas” 0,3123, para “induzidas” x “diferenciadas” 0,1939). No estriado, contaram-se 78 ± 29 , 153 ± 52 e 93 ± 55 células respectivamente (Kruskal-Wallis p para “indiferenciadas” x “diferenciadas” 0,8857, para “indiferenciadas” x “induzidas” 0,3429, para “induzidas” x “diferenciadas” 0,4857) (Figura 24). Portanto, notou-se diferença estatisticamente significativa ($\alpha=5\%$) quando se avaliou o subgrupo que recebeu implante no hipocampo.

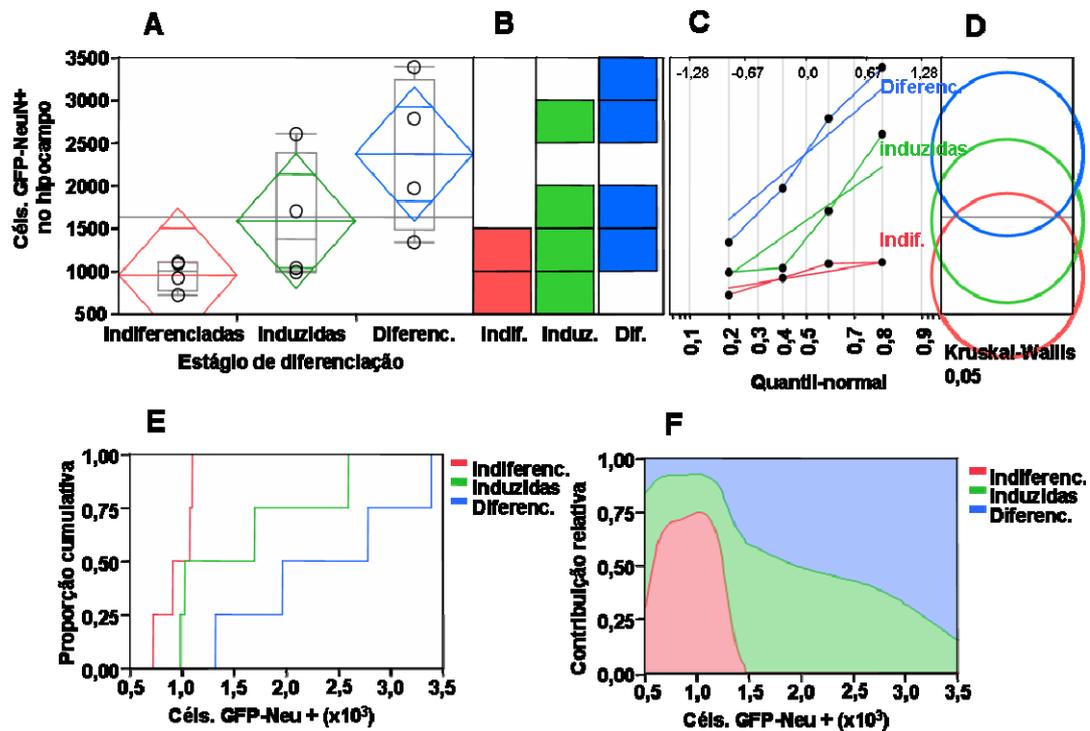


Figura 24: Diferenciação das células tronco-mesênquimais em função do estágio de evolução somente no hipocampo. Em A, gráfico ilustrando a contagem de células duplamente positivas para GFP e NeuN nos grupos implantados com células indiferenciadas, induzidas à diferenciação neuronal com meio bFGF-EGF e diferenciadas em meio contendo AMPc e IBMX. Representação gráfica por meio de dispersão, box-plots e diamantes médios semelhantes à Figura 17. Em B, histograma de frequências. Em C, representação da distribuição por meio de gráfico de quartis amostrais semelhantes à Figura 17, onde se mostra distribuição próxima à curva normal somente para o grupo de células indiferenciadas, notando-se que para poucas amostras a presunção de normalidade fica limitada. Em D, representação gráfica do teste Kruskal-Wallis, onde entre os grupos de células indiferenciadas e diferenciadas nota-se um ângulo de intersecção entre os círculos menor que 90°, ou seja, há diferença estatística para um erro α de 5% ($p=0,0304$). Em E, gráfico de distribuição cumulativa mostrando que 100% da amostra referente às células indiferenciadas se situou abaixo de 1.000 células positivas por animal, ao passo que 100% da amostra referente às células diferenciadas se situou entre 1.400 e 3.500 células. Em F, gráfico ilustrando a contribuição relativa dos grupos, onde o grupo azul de células diferenciadas ocupou a maior área na parte direita do gráfico, associada às maiores contagens.

5. DISCUSSÃO

O potencial neurogênico de células-tronco mesenquimais ainda é fonte de controvérsia (Choi e cols., 2006; Coppi e cols., 2007; Heubach e cols., 2004; Li e cols., 2006; Wenisch e cols., 2006). Alguns ensaios *in vitro* demonstraram diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais adultas por expressão de proteínas neurais (seja por meio de PCR ou por meio de coloração imunocitoquímica), ou por alterações morfológicas sugestivas de diferenciação neuronal, tais como formação e ramificação de prolongamentos celulares (Jiang e cols., 2002a; Khoo e cols., 2008; Sanchez-Ramos e cols., 2000; Woodbury e cols., 2000), ou até mesmo síntese de neurotransmissores (Kan e cols., 2007). No entanto, a comprovação funcional de diferenciação neuronal por meio de eletrofisiologia, com clara demonstração de potenciais de ação e sinaptogênese nunca foi descrita. Alguns trabalhos demonstraram ocorrência de potenciais de ação em co-cultivo de células mesenquimais com células neuronais, sem observância de correntes sinápticas (Jiang e cols., 2003; Wislet-Gendebien e cols., 2005), e outros mostraram fracas evidências de correntes sinápticas da ordem de somente 10pA sem demonstração de correntes iônicas dependentes de voltagem ou potenciais de ação (Greco e cols., 2007; Trzaska e cols., 2008). Tal fato pode eventualmente ser explicado pela ocorrência de fusão celular entre as células mesenquimais e as células neuronais, com troca de material genômico e aquisição de certo potencial neurogênico, de fato não intrínseco das células mesenquimais (Wurmser e cols., 2002). Essa possibilidade naturalmente limita a interpretação inicial de que esse tipo de células-tronco seja pluripotente, e sem dúvida tal

eventual limitação é de fundamental importância no planejamento de estratégias de restauração neural baseadas nesse tipo de células. Outra possibilidade para se explicar a ocorrência de potenciais de ação somente em condições de co-cultivo celular com células neuronais maduras é a de erro de marcação. Nessa eventualidade, o marcador de células mesenquimais estaria também presente nas células neuronais, o que levaria à aquisição de sinais eletrofisiológicos de células erradas, com conseqüente erro de interpretação. Como nenhum método de marcação celular oferece especificidade absoluta, essa hipótese não pode ser rejeitada. Em trabalho prévio de nosso grupo (Lepski e cols. 2010), foi demonstrado que células mesenquimais cultivadas isoladamente de fato apresentam um potencial neurogênico inferior ao de células-tronco extraídas de encéfalos fetais (células-tronco neurais, ou simplesmente CTNs).

Por outro lado, sabe-se que o co-cultivo de células-tronco neurais com astrócitos hipocâmpais imaturos acelera a diferenciação das células-tronco (Song e cols., 2002a; Song e cols., 2002b). Segundo esses autores, a presença de astrócitos imaturos hipocâmpais é particularmente importante no processo de maturação funcional de células-tronco *in vitro*. Esses astrócitos teriam a capacidade de gerenciar o processo de neurogênese por meio da síntese de fatores neurogênicos humorais ainda desconhecidos e também por meio da formação de *GAP-junctions* e sinapses imaturas que seriam essenciais na transdução de sinais elétricos primordiais (tanto eletro-elétricos quanto eletroquímicos), que por sua vez seriam extremamente relevantes para a aquisição de um fenótipo neuronal maduro (Ge e cols., 2006). Uma série de evidências suporta a idéia de que um arcabouço

astrocítico seja essencial na formação de uma rede neural funcionante (Ma e cols., 2005).

No processo de maturação funcional de células-tronco neurais endógenas, no hipocampo e na banda migratória rostral, foi demonstrado o fator preponderante de aferências sinápticas para a completa maturação funcional de células-tronco (Ge e cols., 2006; Schmidt-Hieber e cols., 2004; Tozuka e cols., 2005). Resta saber a que ponto o micro-ambiente influencia a diferenciação celular de células-tronco implantadas cirurgicamente em determinadas regiões cerebrais.

Células-tronco mesenquimais implantadas em modelos de isquemia cerebral (Hess e cols., 2002; Kim e cols., 2008; Zhao e cols., 2002), doenças desmielinizantes (Akiyama e cols., 2002) e lesões medulares (Hofstetter e cols., 2002) promovem certa recuperação funcional. O mecanismo por trás dessa recuperação ainda permanece largamente obscuro. Foi demonstrado que células-mesenquimais implantadas secretam fatores humorais que condicionariam certa recuperação funcional indireta (Bai e cols., 2007). Esses fatores poderiam promover angiogênese ou recrutamento de células-tronco neurais endógenas, e assim permitir restauração do tecido neural lesado. A geração direta de neurônios a partir de células-tronco mesenquimais foi descrita como impossível (Azizi e cols., 1998), ou possível, porém somente em taxas irrisórias (Mezey e cols., 2003). Discrepantemente, foi demonstrado no presente trabalho diferenciação neuronal significativa a partir de células-tronco mesenquimais, o que prova o potencial neurogênico desse tipo celular. Evidências recentes sugerem, no entanto, que a hiper-expressão de genes pró-neurais, tais como neurogenin 1, podem favorecer a diferenciação neuronal *in vivo* de CTMs (Kim e cols., 2008).

Outro aspecto que merece menção é a segurança biológica e o potencial imunogênico de células-tronco mesenquimais. Por um lado, é certo que células-tronco mesenquimais sejam biologicamente seguras, já que estejam em uso clínico corriqueiro no escopo do tratamento de cânceres hematológicos. Por outro lado, é incerto o potencial que essas células apresentam em induzir reação enxerto-hospedeiro quando implantadas no tecido cerebral sadio ou doente. Embora CTMs expressem MHC classe I e II, não ocorre expressão de proteínas co-estimuladoras da reação imunológica, tais como CD 40, 80 e 86. Como consequência, há pouca ativação linfocitária *in vitro* (Liu e cols., 2006). Outros autores, no entanto, relataram reação inflamatória importante ao se implantar CTMs e fibroblastos murinos no estriado de ratos adultos, o que não ocorreu com astrócitos (Coyne e cols., 2007). No presente estudo, a reação astrocitária demonstrada no estriado não pode ser imputada à reação doador-hospedeiro, haja visto que não houve reação no hipocampo. Parece mais plausível que tenha havido degeneração primária das células implantadas no estriado, hipoteticamente por falta de um microambiente propício, e que secundariamente tenha havido ativação astrocitária para remoção de debris celulares. Quanto às condições necessárias no microambiente, desempenham papel importante, como já salientado, não somente fatores neurotróficos, mas também interações entre as membranas celulares, com fluxo de impulsos eletroquímicos através de neo-sinapses e eletro-elétricos entre *GAP-junctions* imaturas. Nos hipocampos, notou-se diferenciação e integração de um número significativo de células, que perfizeram um total de 1% do total de células implantadas. Convém notar que os astrócitos observados não provieram de diferenciação astrocítica das células implantadas, haja visto que os mesmos não

expressaram GFP. Diferentemente de outros autores (Azizi e cols. 1998), não foi observado diferenciação astrocítica sob nossas condições experimentais.

No que tange a possibilidade de restauração neural por meio de transplante de células-tronco mesenquimais, parece haver concordância em que a geração neuronal não seja o mecanismo central. Alguns autores (Cizkova e cols., 2007; Cizkova e cols., 2006) reportaram recuperação motora após implante de CTMs no modelo de lesão espinal, sem que tenha havido geração de neurônios. Descreveram geração de oligodendrócitos a partir das células implantadas, bem como brotamento axonal na área lesada, que explicariam a melhora observada. Similarmente, outros autores também não observaram diferenciação neuronal após implante de CTMs na retina em ratos com secção intracraniana do nervo óptico (Zwart e cols., 2009). Os resultados apresentados no presente trabalho vão claramente de encontro às observações descritas, ao se descrever geração de neurônios a partir de células-tronco mesenquimais implantadas no cérebro de ratos normais. Ademais, três evidências falam a favor de geração de neurônios maduros: i) morfologia típica de células maduras, com prolongamentos celulares longos e ramificados; ii) marcação imunohistoquímica de neurônios maduros, ou seja, positividade para NeuN e NF200 (expressos em fases finais do ciclo de diferenciação celular) e iii) síntese de neurotransmissores (GABA e glutamato, demonstrada por imunohistoquímica para GAT-1 e glutamato).

No entanto, foi observado um padrão de integração completamente diferente ao se implantarem células no hipocampo e no corpo estriado. Primeiramente, ao se analisar o volume dos enxertos, verificou-se que os enxertos estriatais foram mais volumosos que os hipocampais, esses últimos tão dispersos

no tecido que não foram mensuráveis. Isso é um indício de que as células implantadas no hipocampo talvez tenham sofrido um processo de migração mais intenso que aquelas no estriado. De fato, quando analisamos o padrão migratório, encontramos no hipocampo células dispersas por todo o corno de Amon, giro denteado e também no paleo- e neocórtex temporal. Por outro lado, não encontramos um número significativo de células dispersas à distância dos enxertos estriatais. Esporadicamente, células GFP-positivas foram identificadas no núcleo acumbente, trato e bulbo olfatórios e raramente no neocórtex prefrontal. Isso indica que, apesar de relativamente distantes da região neurogênica, algumas células foram capazes de ganhar a banda migratória rostral e migrar ao longo dela rumo ao bulbo olfatório, adentrando o ciclo de diferenciação celular que se completa ao longo da migração. Possivelmente fatores quimiotáticos tenham atraído as células-tronco para a região neurogênica. Cabe ressaltar, no entanto, que essa observação foi extremamente esporádica. Interessante notar que no neocórtex frontal ou temporal, embora tenhamos observado células GFP-positivas com morfologia neuronal e marcação positiva para β III tubulina, não observamos células piramidais das camadas III e IV derivadas das células implantadas, no período estudado de até 3 meses. Isso pode significar que a geração de neurônios piramidais, que no córtex motor são a origem do trato piramidal e responsáveis pela motricidade, possa ser mais complexa que a geração de outros tipos neuronais, como os interneurônios excitatórios e inibitórios aqui reportados. De encontro aos presentes dados se coloca o trabalho do grupo de Gaillard (Gaillard e cols., 2007), que demonstrou regeneração da via piramidal de camundongos com enxerto de células fetais E14 diretamente no córtex motor lesado por aspiração.

Interpretando-se conjuntamente os resultados do presente estudo com os de Gaillard, deduz-se que tipos celulares diferentes parecem possuir potencial neurogênico diferenciado. Essa conclusão está de acordo com experimentos *in vitro* realizados em nosso laboratório (Lepski e cols., 2009).

Um aspecto central deste trabalho é a observação de diferenciação neuronal significativamente mais exuberante no hipocampo em comparação com o estriado. Dentre os fatores que favoreceriam diferenciação neuronal nas áreas neurogênicas do cérebro adulto, especula-se que astrócitos, neurônios jovens positivos para PSA-NCAM e vasos sanguíneos exerçam papel preponderante nesse processo (Seki, 2003). No entanto, ainda são altamente desconhecidos os fatores presentes nas áreas neurogênicas que promovam diferenciação neuronal. De fato, células-tronco neurais estão presentes por todo o SNC, mas a neurogênese ocorre somente em duas regiões, na substância periventricular frontal e na camada subgranular do giro denteado. Nas demais estruturas, o processo de maturação é dirigido no sentido de formação glial. Portanto, é de central importância a identificação dos fatores microambientais que dirigem o processo de diferenciação neural. Nesse sentido, foi reportado que i) a via Wnt/ β -catenina está ativa nas células-tronco neurais em hipocampus adultos, ii) que Wnt3 é expresso nessas células, iii) que sua hiper-expressão favorece a neurogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e iv) que seu bloqueio abole quase que completamente a neurogênese *in vivo* (Lie e cols., 2005).

Com relação ao tempo de maturação das CTMs no encéfalo hospedeiro, é interessante notar que o período de 6 semanas parece ser suficiente para a geração

de neurônios maduros, haja visto que não houve diferença significativa entre nossas quantificações após 6 e 12 semanas.

Outro aspecto relevante é a observação da tendência de maior integração tecidual e diferenciação neuronal ao se implantarem as células já com fenótipo neuronal determinado, o que aqui ocorreu após cultivo com AMPc e IBMX, e não na sua forma tronco-indiferenciada. Quando avaliamos somente os animais implantados no hipocampo, isso deixou de ser uma tendência e passou a evidência com relevância estatística. Analisando-se historicamente a evolução do transplante neural, nota-se que algumas tentativas pioneiras de transplante de tecido cerebral maduro em animais adultos foram frustradas (Thompson, 1890, Forssman, 1900, Saltykow, 1905). Provavelmente a ruptura das terminações axo-dendríticas promove influxo de cálcio que culmina com a morte celular. Neurônios no cerne do implante poderiam sobreviver, mas a ausência de novas conexões sinápticas torna a degeneração do enxerto inexorável. Foi somente na década de 80, com os clássicos experimentos de Björklund, da Universidade de Lund, Suécia, que se resolveu o dilema, ao se verificar que havia sobrevivência do enxerto quando se utilizava tecido neural fetal (Björklund e cols., 1979; Kromer e cols., 1979). Assim, ficou difundido desde então o conceito de que para integração do enxerto são necessárias células imaturas, que ainda retêm a capacidade de brotamento axonal e neosinaptogênese. No que diz respeito a células mesenquimais, a situação parece ser distinta. Nesse caso, parece haver maior integração quando se implanta células em fases tardias de diferenciação. Hipotetiza-se aqui que o estágio de diferenciação de CTMs após cultivo em IBMX não seja muito distinto do estágio de neuroblastos, ou precursores neurais, predominantes no tecido fetal, embora

algumas células sejam positivas para marcadores de neurônios maduros como NF200 e MAP2ab, como demonstramos nos ensaios *in vitro*.

Assim sendo, pode-se concluir que o potencial neurogênico de CTMs depende do microambiente onde as mesmas são implantadas. Identificação dos fatores pro-neurogênese que estejam presentes no hipocampo e ausentes em outras regiões do SNC onde neurogênese ocorre fisiologicamente viabilizaria o uso de CTMs na prática clínica para fins de restauração neural.

No intuito de se aumentar o potencial neurogênico de CTMs, transformação gênica com transfeção de genes pró-neurogênicos (Yang e cols., 2008) ou transplante de células em matrizes tridimensionais de polímeros (Yim e cols., 2007) têm proporcionado resultados animadores. Nesse sentido, o completo entendimento dos mecanismos que regem a maturação funcional de células-tronco é de central importância para que um dia se tenha à disposição uma terapia celular eficaz no tratamento de doenças neurológicas incapacitantes.

6. CONCLUSÃO

Em vista do que foi aqui exposto, conclui-se que:

- i) células-tronco mesenquimais murinas são capazes de sobreviver e se diferenciar a neurônios maduros quando implantadas no cérebro de ratos jovens. A maturidade pôde ser constatada pela morfologia celular (prolongamentos celulares extensos e ramificados), bem como por marcação imunohistoquímica compatível com neurônios maduros (NeuN e NF200), e também por síntese de neurotransmissores (positividade para glutamato e transportador de GABA);
- ii) O hipocampo favoreceu a sobrevivência e diferenciação celulares, haja visto que um número significativamente maior de neurônios derivados de células mesenquimais foi contado nessa região. Assim sendo, comprovou-se a hipótese central de que o microambiente no alvo de implante tem papel preponderante no processo de maturação de CTMs. Supostamente, fatores locais presentes no hipocampo, ainda a serem identificados, favorecem o processo de neurogênese, que ocorre nessa estrutura ao longo de toda a vida adulta;
- iii) seis semanas foi período suficiente para se observar células neuronais maduras derivadas de células mesenquimais. Um período de observação maior não acarretou contagem de um maior número de neurônios nas áreas estudadas. Adicionalmente, os novos neurônios gerados do enxerto foram capazes de sobreviver por todo o período de observação de 3 meses.
- iv) houve uma tendência de se favorecer a geração de novos neurônios ao se implantarem as células mesenquimais após expansão em meio com soro fetal, cultivo por 1 semana em bFGF e EGF e cultivo por 24 horas em AMPc e IBMX,

ou seja, numa etapa mais tardia do processo maturativo. Quando se analisou as células implantadas somente no hipocampo, essa tendência se mostrou significativa a favor do implante em fase tardia de maturação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah BM e Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008; 15 (2): 109- 116.

Akiyama Y, Radtke C e Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J.Neurosci.* 2002a; 22 (15): 6623- 6630.

Allen E. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J.Comp.Neurol.* 1912; 12 547- 568.

Altman G. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* 1962; 135 1127- 1128.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C e 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 e Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem.Res.* 2007; 32 (2): 353- 362.

Bjorklund A e 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 e 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 e Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002; 99 (4): 2344- 2349.

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

Burd GD e Nottebohm F. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J.Comp Neurol.* 1985; 240 (2): 143- 152.

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

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A e 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.

Choi CB, Cho YK, Prakash KV, Jee BK, Han CW, Paik YK, Kim HY, Lee KH, Chung N e Rha HK. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006; 350 (1): 138- 146.

Christophersen NS, Meijer X, Jorgensen JR, Englund U, Gronborg M, Seiger A, Brundin P e 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.

Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, Marsala S, Johe K, Hazel T, Hefferan MP e Marsala M. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neuroscience.* 2007; 147 (2): 546- 560.

Cizkova D, Rosocha J, Vanicky I, Jergova S e Cizek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol.Neurobiol.* 2006; 26 (7-8): 1167- 1180.

Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, Melani A, Cerbai E, Mazzanti B, Bosi A, Saccardi R e Pedata F. ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25 (7): 1840- 1849.

Coyne TM, Marcus AJ, Reynolds K, Black IB e Woodbury D. Disparate host response and donor survival after the transplantation of mesenchymal or neuroectodermal cells to the intact rodent brain. *Transplantation*. 2007; 84 (11): 1507- 1516.

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

Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D e Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4): 315- 317.

Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G e Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279 (5356): 1528- 1530.

Filip S, English D e Mokry J. Issues in stem cell plasticity. *J.Cell Mol.Med*. 2004; 8 (4): 572- 577.

Forssman J. Zur Kenntniss des Neurotropismus. *Zeigers Beiträge zur Pathologischen Anathomie*. 1900; XXXVII 407- 430.

Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D e McKay R. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*. 1988a; 1 (6): 439- 448.

Frederiksen K e McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J.Neurosci*. 1988b; 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 e Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med*. 2001; 344 (10): 710- 719.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF e Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974; 17 (4): 331- 340.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287 (5457): 1433- 1438.

Gage FH, Bjorklund A, Stenevi U e 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.

Gaillard A, Prestoz L, Dumartin B, Cantereau A, Morel F, Roger M e Jaber M.

Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat.Neurosci.* 2007; 10 (10): 1294- 1299.

Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C,

Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R e Quarto R.

Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp.Hematol.* 1999; 27 (9): 1460- 1466.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL e Song H. GABA regulates

synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature.*

2006; 439 (7076): 589- 593.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G e Fuchs E. Proliferation of granule

cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.

Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 3168-3171.

Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new

reagent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998; 95 (6): 3168- 3171. for detection of

DNA replication. *Science.* 1982; 218 (4571): 474- 475.

Greco SJ, Zhou C, Ye JH e Rameshwar P. An interdisciplinary approach and

characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal

stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16 (5): 811- 826.

Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat.Rev.Neurosci.* 2000; 1 (1): 67- 73.

Hamilton A. The division of differentiate cells in the central nervous system of the white rat. *J.Comp.Neurol.* 1901; 11 297- 320.

Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J e Carothers J. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke. *Stroke.* 2002; 33 (5): 1362- 1368.

Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E e Ravens U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J.Physiol.* 2004; 554 (Pt 3): 659- 672.

Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El MA, Prockop DJ e Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002; 99 (4): 2199- 2204.

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

Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF e Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003; 100 Suppl 1 11854- 11860.

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 e Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002a; 418 (6893): 41- 49.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M e Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp.Hematol*. 2002b; 30 (8): 896- 904.

Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL e Yu JS. Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. *Exp.Neurol*. 2002; 178 (2): 288- 293.

Kan I, Ben-Zur T, Barhum Y, Levy YS, Burstein A, Charlow T, Bulvik S, Melamed E e Offen D. Dopaminergic differentiation of human mesenchymal stem cells--utilization of bioassay for tyrosine hydroxylase expression. *Neurosci.Lett*. 2007; 419 (1): 28- 33.

Kaplan MS e Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 1977; 197 (4308): 1092- 1094.

Khoo ML, Shen B, Tao H e Ma DD. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17 (5): 883- 896.

Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K e McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002; 418 (6893): 50- 56.

Kim SS, Yoo SW, Park TS, Ahn SC, Jeong HS, Kim JW, Chang DY, Cho KG, Kim SU, Huh Y, Lee JE, Lee SY, Lee YD e Suh-Kim H. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells*. 2008; 26 (9): 2217- 2228.

Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT e Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol.Cancer Ther*. 2006; 5 (3): 755- 766.

Kromer LF, Bjorklund A e Stenevi U. Intracerebral implants: a technique for studying neuronal interactions. *Science*. 1979; 204 (4397): 1117- 1119.

Kuhn HG, Kinson-Anson H e Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.Neurosci*. 1996; 16 (6): 2027- 2033.

Lee J, Elkahloun AG, Messina SA, Ferrari N, Xi D, Smith CL, Cooper R, Jr., Albert PS e 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 e McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat.Biotechnol.* 2000; 18 (6): 675- 679.

Lepski G, Jannes CE, Maciaczyk J, Papazoglou A, Mehlhorn A, Teixeira MJT, Marie SKN, Bischofberger J e Nikkhah G. Limited Ca²⁺ and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Experimental Cell Research*, 2010; 316(2): 216 - 231.

Lepski G. A comparative analysis of human adult mesenchymal and fetal neuronal stem cells with regard to their neurogenic potential. Doctoral Dissertation, University of Freiburg. Giessen, Ed.VVB Laufersweiler, 2009, 83p. ISBN 3-8359-5439-3

Lepski G. Diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais humanas para uso em transplante neural. Tese de Doutorado, São Paulo, 2007, 165 p.

Levi G. Sulla cariocinesi delle cellule nervose. *Riv.Patol.Nerv.Ment.* 1898; 3 97-113.

Li GR, Deng XL, Sun H, Chung SS, Tse HF e Lau CP. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells.* 2006; 24 (6): 1519-1528.

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR e Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 2005; 437 (7063): 1370- 1375.

Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport*. 1997; 8 (14):

Ling ZD, Potter ED, Lipton JW e Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp.Neurol*. 1998; 149 (2): 411- 423.

Liu CT, Yang YJ, Yin F, Wang X, Yu XH, Wang QH, Wang XL e Xie M. The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. *Cell Immunol*. 2006; 244 (1): 19- 32.

Ma DK, Ming GL e Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr.Opin.Neurobiol*. 2005; 15 (5): 514- 520.

Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD e 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 e Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.

Annu.Rev.Neurosci. 2005a; 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 e Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 2004; 11 (14): 1155- 1164.

Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD e 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.* 1995; 15 (5 Pt 1): 3548- 3561.

Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD e 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.* 1995; 15 (5 Pt 1): 3548- 3561.

Nikkhah G, Cunningham MG, McKay R e Bjorklund A. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery. *J.Neurosci.* 1995; 15 (5 Pt 1): 3562- 3570.

Nikkhah G, Duan WM, Knappe U, Jodicke A e 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.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M e McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech.Dev.* 1996; 59 (1): 89- 102.

Okita K, Ichisaka T e Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448 (7151): 313- 317.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A e Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410 (6829): 701- 705.

Paton JA e Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984; 225 (4666): 1046- 1048.

Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I e Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine*. 2009; 34 (4): 328- 334.

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L e 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 e Studer L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 2004; 101 (34): 12543- 12548.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS e Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999; 284 (5417): 1168- 1170.

Piccini P, Pavese N, Hagell P, Reimer J, Bjorklund A, Oertel WH, Quinn NP, Brooks DJ e 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 e Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284 (5411): 143- 147.

Praag H., Kempermann G e Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat.Neurosci*. 1999; 2 (3): 266-270.

Reynolds BA e 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 Beitrage zur Kentniss der Vorgänge an den zellingen Gehirnelementen. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1905; 40 329- 388.

Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO e 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 e Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp.Neurol*. 2000; 164 (2): 247- 256.

Schaper A. Die fruhesten differenzierung im centralnervenssystems. Arch.f Entw-Mech.Organ. 1897; 5 81- 132.

Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB e 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 e Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. Nature. 2004; 429 (6988): 184- 187.

Seki T. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. Anat.Sci.Int. 2003; 78 (2): 69- 78.

Shetty AK e 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 e Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature. 2002a; 417 (6884): 39- 44.

- Song HJ, Stevens CF e Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat.Neurosci.* 2002b; 5 (5): 438- 445.
- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B e McKay R. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J.Neurosci.* 2000; 20 (19): 7377- 7383.
- Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T e 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 e Studer L. Novel sources of stem cells for brain repair. *Clinical Neuroscience Research* 2002. 2002; 1 (2): 2- 10.
- Takahashi K e Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126 (4): 663- 676.
- Thompson W. Successful brain grafting. *NY Med.* 1890; J.51 701- 702.
- Timmer M, Muller-Ostermeyer F, Kloth V, Winkler C, Grothe C e 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 e Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*. 2005; 47 (6): 803- 815.
- Trzaska KA, Reddy BY, Munoz JL, Li KY, Ye JH e Rameshwar P. Loss of RE-1 silencing factor in mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors induces functional maturity. *Mol.Cell Neurosci*. 2008; 39 (2): 285- 290.
- Vandenbosch R, Borgs L, Beukelaers P, Belachew S, Moonen G, Nguyen L e Malgrange B. Adult neurogenesis and the diseased brain. *Curr.Med.Chem*. 2009; 16 (6): 652- 666.
- Vescovi AL, Galli R e Reynolds BA. Brain tumor stem cells. *Nature Reviews*. 2006 (6) 425-436.
- Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Heiss C, Alt V, Klisch C, Meissl H e Schnettler R. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone*. 2006; 38 (6): 911- 921.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE e Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007; 448 (7151): 318- 324.

Whittemore SR, Morassutti DJ, Walters WM, Liu RH e 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.

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G e Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 2005; 23 (3): 392- 402.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ e Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J.Neurosci.Res.* 2000; 61 (4): 364- 370.

Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, Lo CP e Kuo YM. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J.Appl.Physiol.* 2008; 105 (5): 1585- 1594.

Wurmser AE e Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature.* 2002; 416 (6880): 485- 487.

Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 2009; 137 (1): 13- 17.

- Yan J, Studer L e 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.
- Yang Y, Li Y, Lv Y, Zhang S, Chen L, Bai C, Nan X, Yue W e Pei X. NRSF silencing induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp.Cell Res.* 2008; 314 (11-12): 2257- 2265.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA e Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell.* 1998; 93 (5): 755- 766.
- Yim EK, Pang SW e Leong KW. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp.Cell Res.* 2007; 313 (9): 1820- 1829.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM e 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.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L e Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4 (5): 381- 384.

Zhu W, Mao Y, Zhao Y, Zhou LF, Wang Y, Zhu JH, Zhu Y e 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.

Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, Mehmet H,

Navarrete R, Navarrete C e Jen LS. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp.Neurol*. 2009; 216 (2): 439- 448.

ANEXO 1: "ENGLISH VERSION"

Survival and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells transplanted into the rodent brain: dependence upon microenvironment

Lepski G, Jannes CE, Strauss B, Marie SKN, Nikkhah G

The first two authors have contributed equally for completion of this work.

Abstract

Background: The possibility of CNS restoration represents a challenge in Neuroscience, and the successful integration of stem cells in adult brain has become an important goal. In this study we sought to test the hypothesis that survival and neurodifferentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) may be dependent upon microenvironmental conditions according to the site of implant in the brain.

Methods: MSCs were isolated from adult rats and labeled with eGFP lentivirus. The neuronal phenotype was successfully induced *in vitro*. A cell suspension was implanted stereotactically into the brain of 40 young rats of the same strain, in neurogenic (hippocampus) and non-neurogenic (striatum) areas. Animals were sacrificed six or twelve weeks after surgery, and brains were stained for mature neuronal markers. Cells co-expressing NeuN-GFP were counted stereologically at both targets.

Results: The isolated cell population was able to generate $14.5 \pm 1.1\%$ of NF200+ neurons *in vitro*. Once implanted into the hippocampus, cells migrated away from the graft and gave rise to mature neurons (1634 ± 231 cells GFP/NeuN+). By contrast, massive cell degeneration was seen in the striatum, with no significant migration, while only 108 ± 24 NeuN/GFP+ neurons ($p < 0.001$) were counted.

Conclusions: Our data demonstrated that survival and differentiation of MSCs is strongly dependent upon the site of implant in the brain, thus indicating the importance of a permissive microenvironment. Identification of the pro-neurogenic factors present in the hippocampus could subsequently allow for the integration of stem cells into non-permissive areas of the CNS and thus contribute toward the challenging goal of introducing CNS repair into clinical practice.

Introduction Mesenchymal stem cells (MSCs) are being considered a promising option for restorative strategies based on stem cell transplantation into the CNS. In vitro neuronal differentiation of MSCs has been described elsewhere (Jiang et al. 2002a; Jiang et al. 2003; Sanchez-Ramos et al. 2000; Woodbury et al. 2000). Although some controversy remains regarding the functional maturation stage achieved by neuronal cells derived from mesenchyma, there is consensus on the ability to forsake their mesenchymal heritage and enter the neuroectodermal differentiation cycle (Lepski et al. 2010). Exploiting this property, several reports on CNS restoration using transplantation of MSCs have been published. Specifically, the possibility of functional recovery after spinal cord injury (Hofstetter et al. 2002), stroke (Hess et al. 2002; Kim et al. 2008; Zhao et al. 2002) or demyelinating diseases (Akiyama et al. 2002), by transplanting MSCs has attracted particular interest. Nevertheless, the mechanistic explanation for this observed functional recovery is unclear. Interestingly, the generation of neurons from MSCs seems not to be the central aspect. Apparently, neoangiogenesis, the generation of glial cells or even promotion of axonal growth might represent the main factors mediating tissue restoration. Accordingly, some authors observed no neuron generation after transplantation of MSCs into the CNS (Azizi et al. 1998).

Therefore, the central aim of the present report was to clarify whether survival and differentiation of MSCs in the host brain are facilitated in a permissive microenvironment in which local conditions support neurogenesis during adult life.

To this end, we isolated MSCs from young Sprague-Dowley rats, transfected them with eGFP-lentivirus and implanted them stereotactically into the brains of adult rats from the same strain. One group of animals received implants in the hippocampus, and a second group in the striatum at a point 2.5mm lateral from the ventricular wall, i.e., a non-neurogenic brain area. The main hypothesis was that survival and differentiation differ in these two areas. Animals were sacrificed after 6 or 12 weeks, and brains were then fixed and sliced, and subjected to immunohistochemistry for different neuronal markers. Additionally, the yield of mature neuronal cells derived from the implanted cells was determined by stereological quantification under an epifluorescence microscope.

Mature neuronal cells, positive for NF200, NeuN and β III-tubulin, were identified 6 weeks after implantation and survived for at least 3 months. Synthesis of GABA and glutamate neurotransmitters was demonstrated by immunohistochemistry. Young neuronal cells were observed distal to the implantation site. Our results indicate significantly enhanced cell survival and differentiation in the hippocampus compared to striatum. In this latter

structure, a lower absolute number of mesenchymal-derived cells, together with a smaller yield of differentiated neurons, indicated more marked cell degeneration with secondary astrocytic reactions within the graft. By contrast, no significant astrocytic reaction was seen in the hippocampus where optimal integration of the graft was evident. Moreover, neuronal differentiation was also facilitated when cells were implanted at relatively late stages of *in vitro* maturation. To the best of our knowledge, this report constitutes the first description showing clear dependence of the MSC neuronal differentiation process on implantation site within the CNS, confirming the importance of a permissive microenvironment for full development of stem cells in the brain.

Materials and Methods

Isolation of MSCs from bone marrow

MSCs were isolated from tibias and femurs of 4-week-old Sprague-Dowley rats as previously described (Jiang et al. 2002a; Jiang et al. 2002b; Lepski et al. 2009). All surgical procedures and animal care protocols were approved by the Research Ethics Committee of the University of Freiburg. MSCs were expanded in MSCBM®, "*marrow stem cell basal medium*", (Cambrex-Poietics Cambrex, Walkersville, USA), supplemented with 10% serum, 2mM glutamine, 1% PSA (all from Gibco) and incubated in 5% CO₂ at 37°C and 80% humidity. Medium was changed after the first 24 hours and every other day thereafter. Passages were performed once a week.

Lentiviral transfection

An eGFP construct developed in-house by one of the authors (Strauss) was used, which ensured high expression levels of GFP that remained stable for the duration of the experiment (3 months). The lentiviral transfection was conducted under an S2-security level. Specifically, mesenchymal cells were cultivated until confluence in T75 Flacon flasks. Upon reaching confluency, the medium was removed and replaced by a solution containing 2x10⁶ viral particles per milliliter suspended in 2-3mL of medium, giving a count of 5 viral particles per cell in 8µg/mL of polybrene (Sigma). Cells were incubated for 8 hours, after which time further medium was introduced to reach 12mL. On the following day, medium was

completely changed. After 2-3 passages, GFP-expression levels were sufficiently strong and stable to proceed with the experiments.

Neuronal differentiation in vitro

In order to prove the multipotency of the isolated cells and their capacity to transdifferentiate into neurons, we first tested against a differentiation protocol which had been applied satisfactorily in human mesenchymal cells (Lepski et al. 2010). Briefly, neuronal differentiation was induced in three stages: i) stromal mesenchymal stem cells were isolated as described; ii) an immature neural phenotype was induced using bFGF (20ng/mL, Sigma) and EGF (20ng/mL, Peprotech) in a basal medium supplemented with 5 μ g/mL heparin (Sigma) and 10ng/mL LIF (leukaemia inhibitor factor, Millipore, Billerica, MA, USA). After one week, cells formed spheroid aggregates. At different time points, the spheres were enzymatically and mechanically dissociated and plated at 10000cells/ cm² onto 24-well plates (Becton-Dickinson) which had been previously coated with fibronectin (Sigma); iii) in the third stage, a more mature neuronal phenotype was achieved by adding 25ng/mL BDNF (R&D Systems, Minneapolis, USA), 1mM de dibutyryl-cAMP (Sigma), and 0.5mM iso-butyl-methyl-xantine (IBMX Sigma) to a basal medium. MSCs can be expanded for up to two years using this method. Cells used in the present report however, were expanded for 1-3 months before differentiation.

Stereotactic implantation

In order to minimize the trauma related to the stereotactic implantation of the cell solution, we used a microcapillary technique previously described by the senior author (Nikkhah et al. 1994; Nikkhah et al. 2009), Figure 1. Accordingly, borosilicate glass capillaries (Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA, 100mm length, OD 1.09mm, ID 0.8mm) were elongated and hot cut using the appropriate equipment (Sutter Instruments model P97, Novato, CA, USA). The tips were then polished by abrasion at 40° on a Narishige EG-40 polisher (Analytical Instruments, Golden Valley, MN, USA), to achieve an outside diameter of 50 μ m with a thin tip 8-10mm in length. Finally, the resulting capillary was then heated again in a Narishige MF900 polisher (Analytical Instruments) to remove imperfections on the glass surface. The glass capillary was then fitted to a 1 μ L Hamilton syringe (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland).

Six-week-old Sprague-Dowley rats (approximately 190g) from the same strain used for cell isolation, were submitted to general intraperitoneal anesthesia of cetamine and diazepam, and then secured to a Cunningham stereotactic frame (Stoelting Co., Dublin, Ireland). All surgical and experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of the Albert-Ludwig University in Freiburg. A longitudinal incision was performed along the midline, and the galea was gently pared from the bone, the periosteum removed and bregma identified. The coordinates used for implants into the striatum were: anteroposterior (AP) +0.5mm, lateral (L) +2.5, and horizontal (H) -4.7 (from dura). For coordinates used for the location of the hilus of the dentate gyrus were AP -3.3mm, L +1.2, H -3.4. Thus, 20 animals received implants in the dentate gyrus, and 20 animals in the striatum, at a point away from the ventricular wall.

The cells were detached from the culture flasks after 3 minutes' incubation using trypsin-EDTA (Gibco), and resuspended at 100,000 cells/ μ L diluted in DMEM medium containing 0.05% DNase (Sigma) to avoid clotting. A total volume of 150,000 cells were implanted per target/animal. Cell viability was assessed immediately prior to implant by incorporation of trypan-blue (Merck). The stability and efficiency of the transfection was also tested under epifluorescence microscopy before implantation, and a yield of cells expressing high levels of GFP was noted.

The 20 animals implanted in the striatum together with the 20 implanted in the hippocampus were subdivided into the following 4 subgroups according to cell maturation stage: 1) 10 control rats implanted with medium containing no cells; 2) 10 rats implanted with undifferentiated stromal cells; 3) 10 rats implanted with neurospheres (cells induced in bFGF-EGF); 4) 10 rats implanted with differentiated cells (under high cAMP). Thirty out of forty animals were stained with NeuN for stereological quantification, as will be explained later, while the remaining 10 animals were stained with other antibodies.

Animal care

Animals were confined in large cages with an enriched environment allowing them to exercise on running wheels and seek food and pellets. This method has been previously reported to promote visuo-spatial and motor learning, due to enhanced generation of new neurons in the rostral migratory stream and hippocampus (Kempermann et al. 1997; Kempermann et al. 2002; Van et al. 1999; Van et al. 2000).

Animal perfusion and brain slicing

At six or twelve weeks after implantation, the animals were anesthetized using intraperitoneal cetamine and the carotid-jugular compartment perfused with 500mL cold PBS, followed by 500mL fresh, cold PFA 4%. The skull was opened and the brains removed and preserved in 30% glucose in PBS for 2-3 days. After sinking, brains were kept in anti-freeze solution (30% glycerol and 30% ethylene glycol in PBS) at -20°C until sectioning. For sectioning, the brains were washed in PBS, placed onto the platform of a cryostat microtome, cooled to -40 °C and sectioned at 40µm in the coronal plane. The slices were divided and ordered into a series of 5 vials and preserved in anti-freeze solution until staining.

Immunohistochemistry

The staining procedure was performed on free-floating slices. After successive washings with Tween 0.05% (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in PBS, slices were incubated in blocking solution containing 5% goat serum (Sigma), 0.3% TritonX-100 (Sigma) and PBS for 1 hour at room temperature over a shaker. The tissue was then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution at 4°C for 24 hours. After this period, the slices were rinsed again 5 times in PBS-Tween and incubated for a further 24 hours at 4°C with secondary antibodies diluted in 0.3% TritonX-100 in PBS with the introduction of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) 1:10,000 for nuclear staining. After 24 hours the slices were rinsed again, anatomically ordered, mounted on glycerine coated glass slides, and coated with antifade solution (DAKO, Carpinteria, CA, USA).

The following primary antibodies were used: anti-GFAP (polyclonal, produced in rabbits, purchased from Millipore and used at 1:600), anti-doublecortin (polyclonal, guinea pig, Santa Cruz, 1:3,000), anti-βIII tubulin (monoclonal, mouse, Sigma, 1:400), anti-MAP2ab (monoclonal, mouse, Millipore, 1:200), anti-NeuN (monoclonal, mouse, Millipore, 1:250), anti-NF200 (monoclonal, mouse, Millipore, 1:200), anti-GAT1 (polyclonal, rabbit, Millipore, 1:500), anti-glutamate (monoclonal, mouse, Millipore, 1:5,000). The secondary antibodies included anti-rabbit, -mouse or -guinea pig AlexaFluor 594 (Molecular Probes, Karlsruhe, Germany) used at 1:200. The nuclei were stained using DAPI (Sigma, 1:10,000). The original GFP-signal was not enhanced with specific antibodies.

Confocal microscopy

Images were obtained with a Leica (Munich, Germany) TCS SP2 confocal system (405 nm diode, ArKr 488nm, Ar 594nm and Xn 633nm lasers) using the 20x/0.7 or 63x/1.2 objectives, with automatic adjustment of the pinhole to obtain an airy-unit of 1 to ensure maximal confocality. Tissue was scanned at a 2 μ m thickness and pictures were digitized at 2,048 x 2,048 pixels, saved in “tif” format and subsequently assembled using Adobe-Photoshop CS2.

Stereology

In order to quantify neuronal differentiation *in vivo*, 30 brains (15 with implants in striatum and 15 in hippocampus), stained using NeuN, were employed. Co-expression of NeuN and GFP was analysed under an Olympus BX61 (Olympus Europe, Hamburg, Germany) epifluorescence microscope equipped with a high sensitivity digital camera DP70 and Olympus stereology system C.A.S.T.® (computed assisted stereological toolbox). Cells expressing both markers were counted by scanning the slide with an automatic microcator (Heidenhain, Germany), at 40 times magnification using an optic frame of 50x50 μ m, taking care to extend focus across the entire slice thickness (40 μ m) in each frame. Finally, the entire hippocampus or striatum of each animal was scanned.

Statistical analysis

Statistical analysis and graph configuration were performed using JMP 8.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data distribution is shown on histograms and normal quantile plots, and was systematically analysed using the Shapiro-Wallis test. Based on this analysis, which revealed a non-Gaussian distribution, the Man-Whitney U test was selected for mean comparisons, and its equivalent Kruskal-Wallis for multiple comparisons. These tests were graphically represented by intersection of circles. Additionally, the significance value p is expressed using asterisks as follows, * p<0.05, ** p<0.01, and *** p<0.001.

Results

In vitro neuronal differentiation of GFP-expressing mesenchymal stem cells

We successfully isolated a population of stromal cells from rodent marrow, in a similar manner to that previously described for humans. These cells have large and flat cell bodies, few elongations, and nuclei with loose chromatin. Their replication rate is high and $99.3 \pm 0.5\%$ of cells incorporate BrdU (bromodeoxyuridine) after 6 hours of exposure. At this stage, the cells stain strongly positive for vimentin, a mesenchymal cell marker (Figure 2A), and weakly for the neural progenitor markers GFAP and nestin. Cells were then transfected as described in the methods, and after 3 weeks, $82.5 \pm 3.4\%$ of cells expressed high levels of GFP which remained stable throughout the experimental period. After 1 week of incubation in bFGF, EGF, heparin and LIF, cells build free-floating aggregates resembling neurospheres, structures formed during expansion of fetal neural tissue. These structures test strongly positive for nestin and GFAP (nestin staining is shown in Figure 2B). After plating onto poly-L-lysine coated coverslips in 24-well plates, cells detach from the core of the spheres, adhere to the surface of the glass and migrate radially. Cell bodies assume a pyramidal or spherical shape, and neuritic processes become evident with enlargements at their tips, representing growth cones. Cells remain strongly positive for nestin and GFAP, as well as β III-tubulin, doublecortin, where PSA-NCAM staining is also visible at this stage (nestin staining is shown in Figure 2C). After exposure to increased cAMP, cells assume a more mature neuronal phenotype with larger neuritic processes which present tertiary and quaternary ramifications. Cells become positive for mature neuronal markers, such as neurofilament of high molecular weight, 200KD (NF200), microtubule-associated protein (MAP2ab), neuronal nuclear protein (NeuN), and β III-tubulin (Figure 2D-F). The yield of cells positive for NF200, a very specific marker for neuronal cells was $14.5 \pm 1.1\%$ of the total count.

Different graft survival and integration in the host brain

We observed differing survival and integration of the graft in the host brain depending on implant site (Figure 3). While in the hippocampus a small graft was seen in all animals, with no surrounding astrocytic reaction or cell infiltration, and complete preservation of the hippocampal cytoarchitecture, in striatum large grafts were evident along with interstitial spread of GFP and exuberant astrocytic infiltration. This denotes a more marked migration of the implanted cells away from the graft in the hippocampus, yet degeneration in striatum

cells. Interestingly, the astrocytes within the graft were not derived from the implanted cells, since they did not express GFP.

Mature neuronal phenotypes were observed within the hippocampus on confocal microscopy. Figure 4 depicts β III-tubulin-, NeuN-, and NF200-positivity. Synthesis of neurotransmitters was demonstrated by positivity for GAT-1 (GABA transporter) and glutamate. Few GFP-positive cells were seen (mostly Dcx- or β III-tubulin-positive neuroblasts) in animals implanted in the striatum, accumbens, prefrontal cortex or olfactory bulb. Among those animals implanted in the hippocampus, GFP-positive cells were detected in all Ammon's horns, the dentate gyrus and temporal neocortex. Interestingly, we found no mature neurons at these distal sites (data not shown).

Neuronal differentiation in vivo differs in hippocampus and striatum

The quantification of cells double-positive for NeuN and GFP revealed 1634 ± 231 cells in the hippocampus and 108 ± 24 in the striatum (Mann-Whitney U $p < 0.001$, $n = 24$). Regarding the total number of living cells derived from mesenchyma (only GFP positive), 1677 ± 231 cells were counted in hippocampus and 252 ± 46 cells in striatum ($p < 0.001$, $n = 24$). There was no significant difference in terms of cell survival or cell differentiation between the groups of animals sacrificed at 6 weeks and 12 weeks after implant (835 ± 253 double-positive cells in the 6-week group versus 906 ± 324 in the 12-week group, Mann-Whitney U $p = 1.0$, $n = 24$). Analysing groups separately, we counted 1538 ± 285 cells in the hippocampus after 6 weeks and 1729 ± 438 after 12 weeks ($p = 0.8181$, $n = 12$), versus 133 ± 50 cells in the striatum after 6 weeks and 83 ± 17 cells after 12 weeks ($p = 0.8181$, $n = 12$). No fluorescence was observed on stereology in the brains of the 6 control animals injected with medium (table 1).

Analysis of neuronal differentiation in terms of maturation stage of implanted cells

Another important issue is whether the culture conditions, or the developmental stage of the stem cells, influence their survival and differentiation in the target structure. To address this question, we separately analysed the groups implanted with stromal undifferentiated cells (grown in basal medium), with cells induced to neural differentiation by bFGF and EGF, and cells differentiated under high-cAMP. Analysing all animals together, 516 ± 171 mature neurons derived from mesenchymal cells were counted in the "undifferentiated group", 866 ± 323 neurons derived from the induced cells, and 1230 ± 479 derived from the differentiated

cells (Kruskal-Wallis p for undifferentiated \times differentiated 0.4619, $n=16$, for undifferentiated \times induced 0.4309, $n=16$, and for induced \times differentiated 0.9581, $n=16$). Although statistical significance was not reached, the cumulative distribution of frequencies demonstrated that the highest cell-counts were found in the “differentiated group” (Figure 5I).

In a subsequent analysis, we sought to elucidate whether the developmental stage of the cells before implant influenced cell differentiation specifically in the hippocampus where conditions were more favourable (Figure 5J-K). In the hippocampus, 954 ± 87 neurons derived from undifferentiated cells were counted in the hippocampi, versus 1580 ± 379 neurons derived from the induced cells, and 2368 ± 453 derived from the differentiated cells (Kruskal-Wallis p for undifferentiated \times differentiated 0.0304, $n=8$, for undifferentiated \times induced 0.3123, $n=8$, and for induced \times differentiated 0.1939, $n=8$). In the striatum, we counted 78 ± 29 , 153 ± 52 and 93 ± 55 cells, respectively (Kruskal-Wallis p 0.8857, 0.3429 and 0.4857 respectively, $n=8$ for each comparison pair). Taken together, the results for the groups implanted with undifferentiated and differentiated cells in the hippocampus reached statistical significance.

Discussion

MSCs implanted in animal models of stroke (Hess et al. 2002; Kim et al. 2008; Zhao et al. 2002), demyelinating diseases (Akiyama et al. 2002) and spinal cord injury (Hofstetter et al. 2002) have been shown to promote functional recovery. The mechanisms underlying these observations, however, remain unclear. Some evidence indicates that MSCs are able to secrete humoral factors that foster the regeneration of the CNS (Bai et al. 2007). These factors could promote angiogenesis or recruit autologous stem cells, thus allowing tissue restoration. According to some reports, the generation of neuronal cells from MSCs proves an impossible (Azizi et al. 1998) or extremely rare event (Mezey et al. 2003). In contrast, we report the generation of neuronal cells from MSCs at a significant rate of 1% of total cells implanted in hippocampus. Additionally, we verified that 6 weeks was sufficient for proper differentiation, where cells appeared to survive for at least 3 months with absolute numbers showing no significant decrease.

Regarding the potential of CNS-repair using MSCs, there seems to be a consensus among research groups that neuronal generation is not the central mechanism. Some authors have described motor recovery after spinal cord injury without generation of neurons (Cizkova et al. 2006; Cizkova et al. 2007). Interestingly, generation of oligodendrocytes and

axonal growth were evident, which may explain the reported observations. Similarly, other authors have failed to observe neuronal differentiation after implantation of MSCs in the retina of rats with surgical lesion to the optic nerves (Zwart et al. 2009). Given that we verified successful neuronal differentiation in the hippocampus, it is reasonable to deduce that favourable maturation of MSCs is strongly dependent upon the implantation site. Moreover, the observation by our experimental group of mature neurons derived from MSCs following implants in hippocampus is supported by i) their morphology, with long and ramified neuritic processes; ii) positivity for markers of mature neurons, such as NeuN and NF200, as well as iii) synthesis of neurotransmitters (GABA and glutamate).

Another cause of concern is the biological safety and low immunogenicity of MSCs. Nevertheless, these cells are currently being used for treatment of haematological cancers, with no reports of secondary malignant degeneration. Moreover, they induce very little lymphocytic activation *in vitro*, maybe because they do not express regulatory immunogenic proteins such as CD40, 80, and 86 (Liu et al. 2006). Consequently, graft-versus-host disease is less frequently observed. In this study we reported implantation of isogenic cells into rats, and observed no cellular infiltration within the graft or disorganization of the cytoarchitecture in the hippocampus. In the striatum by contrast, marked astrocytic infiltration was observed along with a lower number of both surviving cells and mesenchyma-derived neurons. As it is extremely unlikely that only the animals implanted in the striatum developed graft-versus-host disease, this discrepant observation between the two brain areas may be better explained as follows. The observed astrocytic reaction may have been secondary to selective cell degeneration in this area, given that they did not differentiate in other lineages. The reason for this might be the absence of trophic factors important for cell survival.

We observed a very different survival pattern between the hippocampus and the striatum. Among the possible factors that might support neurogenesis in certain brain areas, thus explaining the different survival and differentiation found in this study, is the speculation that astrocytes, young neurons, and blood vessels might play important roles (Seki 2003). Nevertheless, these factors remain largely unknown. In fact, neural stem cells are present in virtually the entire nervous system, but neurogenesis occurs in adult life in only two regions, namely, the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus, and the frontal subventricular zone/rostral migratory stream system. In other areas, cell differentiation is directed toward gliogenesis. Thus, the identification of factors that promote neurogenesis is of central relevance. Previous reports have highlighted the importance of co-culture with hippocampal astrocytes in order to achieve functional maturation of neural stem cells *in vitro* (Song et al.

2002a; Song et al. 2002b). According to these authors, hippocampal astrocytes have the ability to drive neurogenesis by secreting humoral factors, and also by building GAP-junctions with maturing neurons, or even by promoting synaptogenesis between mature and immature neuronal cells. Also, as previously described, electrical inputs play a central role in maturation of neuroblasts in hippocampus (Ge et al. 2006; Schmidt-Hieber et al. 2004; Tozuka et al. 2005). Other evidence supports the notion that an astrocytic network is essential for proper maturation of neuronal precursors (Ma et al. 2005). Accordingly, it was reported that the Wnt-catenin pathway is very active in neuronal hippocampal precursors during adult life. Specifically, Wnt3 expression was observed in these cells, where its hyper-expression promotes neurogenesis both *in vitro* and *in vivo*. Additionally, Wnt3 blockade was shown to virtually abolish neurogenesis *in vivo* (Lie et al. 2005).

Another secondary aspect addressed in the present report was the tendency to attain enhanced differentiation by implanting mesenchymal cells with a better defined neuronal phenotype as opposed to cells in their immature form. Survival analysis, specifically in the hippocampus, revealed that statistical significance was reached. Maturation was achieved after induction with bFGF and EGF, and subsequent cultivation under increased cAMP conditions. Since the classic studies on neuronal transplantation by Bjorklund (Bjorklund et al. 1979; Kromer et al. 1979), it has been generally acknowledged that functional integration of grafts in the CNS is facilitated when immature/fetal tissue is used. Immature cells retain the ability to grow axons and build new synaptic contacts. With respect to MSCs, however, this dogma seems not to apply. In this case of MSCs, differentiation of the implanted MSC cells was more marked when they were implanted at a relatively late stage in the differentiation process. Perhaps at this stage, a “point of no return” in the maturation process has been reached. Another possibility might be that the stage reached by a mesenchymal cell after culture in cAMP is no different to neuroblasts formed from fetal neural stem cells, although some cells are positive for the maturity markers such as NF200 and MAP2, as demonstrated.

Based on our findings, we can conclude that the neurogenic potential of MSCs is strongly dependent on the implant microenvironment. The identification of the pro-neurogenic factors present in hippocampus but absent in other brain areas could foster the development of restorative strategies based on stem cells and pave the way for future clinical application of autologous mesenchymal stem cells for CNS-repair.

Acknowledgements

The present study was sponsored by DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), the German Parkinson Foundation and BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Germany). The authors would like to thank Johanna Wessolek, Brunhilde Baumer, and Donata Maciaczyk for their excellent technical support, as well as Dr. Jarek Maciaczyk and Dr. Anna Papazoglou for the fruitful discussions concerning the scope of this research.

References

- Abdallah BM e Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008; 15 (2): 109- 116.
- Akiyama Y, Radtke C e Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J.Neurosci.* 2002; 22 (15): 6623- 6630.
- Allen E. The cassation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J.Comp.Neurol.* 1912; 12 547- 568.
- Altman G. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* 1962; 135 1127- 1128.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C e 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 e Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem.Res.* 2007; 32 (2): 353- 362.
- Bjorklund A e 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 e 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 e Isacson O. Embryonic stem cells

develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002; 99 (4): 2344- 2349.

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

Burd GD e Nottebohm F. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J.Comp Neurol.* 1985; 240 (2): 143- 152.

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

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A e 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.

Choi CB, Cho YK, Prakash KV, Jee BK, Han CW, Paik YK, Kim HY, Lee KH, Chung N e Rha HK. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006; 350 (1): 138- 146.

Christophersen NS, Meijer X, Jorgensen JR, Englund U, Gronborg M, Seiger A, Brundin P e 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.

- Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, Marsala S, Johe K, Hazel T, Hefferan MP e Marsala M. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neuroscience*. 2007; 147 (2): 546- 560.
- Cizkova D, Rosocha J, Vanicky I, Jergova S e Cizek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol.Neurobiol*. 2006; 26 (7-8): 1167- 1180.
- Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, Melani A, Cerbai E, Mazzanti B, Bosi A, Saccardi R e Pedata F. ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25 (7): 1840- 1849.
- Coyne TM, Marcus AJ, Reynolds K, Black IB e Woodbury D. Disparate host response and donor survival after the transplantation of mesenchymal or neuroectodermal cells to the intact rodent brain. *Transplantation*. 2007; 84 (11): 1507- 1516.
- Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD e Malenka RC. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*. 2004; 42 (4): 535- 552.
- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D e Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4): 315- 317.
- Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G e Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279 (5356): 1528- 1530.

- Filip S, English D e Mokry J. Issues in stem cell plasticity. *J.Cell Mol.Med.* 2004; 8 (4): 572-577.
- Forssman J. Zur Kenntniss des Neurotropismus. *Zeigers Beiträge zur Pathologischen Anatomie.* 1900; XXXVII 407- 430.
- Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D e McKay R. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron.* 1988a; 1 (6): 439- 448.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D e Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344 (10): 710-719.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF e Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974; 17 (4): 331- 340.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000; 287 (5457): 1433- 1438.
- Gage FH, Bjorklund A, Stenevi U e 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.
- Gaillard A, Prestoz L, Dumartin B, Cantereau A, Morel F, Roger M e Jaber M. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat.Neurosci.* 2007; 10 (10): 1294- 1299.
- Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R e Quarto R. Stromal damage as

- consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp.Hematol.* 1999; 27 (9): 1460- 1466.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL e Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature.* 2006; 439 (7076): 589- 593.
- Greco SJ, Zhou C, Ye JH e Rameshwar P. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16 (5): 811- 826.
- Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat.Rev.Neurosci.* 2000; 1 (1): 67- 73.
- Hamilton A. The division of differentiate cells in the central nervous system of the white rat. *J.Comp.Neurol.* 1901; 11 297- 320.
- Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J e Carothers J. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke. *Stroke.* 2002; 33 (5): 1362- 1368.
- Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E e Ravens U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J.Physiol.* 2004; 554 (Pt 3): 659- 672.
- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El MA, Prockop DJ e Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery.

- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA e Rosenthal A. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*. 1995; 15 (1): 35- 44.
- Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF e Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003; 100 Suppl 1 11854- 11860.
- 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 e Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002a; 418 (6893): 41- 49.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M e Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp.Hematol*. 2002b; 30 (8): 896- 904.
- Kan I, Ben-Zur T, Barhum Y, Levy YS, Burstein A, Charlow T, Bulvik S, Melamed E e Offen D. Dopaminergic differentiation of human mesenchymal stem cells--utilization of bioassay for tyrosine hydroxylase expression. *Neurosci.Lett*. 2007; 419 (1): 28- 33.
- Kaplan MS e Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 1977; 197 (4308): 1092- 1094.
- Kempermann G, Gast D e Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann.Neurol*. 2002; 52 (2): 135- 143.
- Kempermann G, Kuhn HG e Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997; 386 (6624): 493- 495.

- Khoo ML, Shen B, Tao H e Ma DD. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008; 17 (5): 883- 896.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K e McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature.* 2002; 418 (6893): 50- 56.
- Kim SS, Yoo SW, Park TS, Ahn SC, Jeong HS, Kim JW, Chang DY, Cho KG, Kim SU, Huh Y, Lee JE, Lee SY, Lee YD e Suh-Kim H. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells.* 2008; 26 (9): 2217- 2228.
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT e Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol.Cancer Ther.* 2006; 5 (3): 755- 766.
- Kromer LF, Bjorklund A e Stenevi U. Intracerebral implants: a technique for studying neuronal interactions. *Science.* 1979; 204 (4397): 1117- 1119.
- Kuhn HG, Sknison-Anson H e Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.Neurosci.* 1996; 16 (6): 2027- 2033.
- Lee J, Elkahloun AG, Messina SA, Ferrari N, Xi D, Smith CL, Cooper R, Jr., Albert PS e 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 e McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat.Biotechnol.* 2000; 18 (6): 675- 679.
- Lepski G, Jannes CE, Maciaczyk J, Papazoglou A, Mehlhorn A, Teixeira MJT, Marie SKN, Bischofberger J e Nikkhah G. Limited Ca²⁺ and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Experimental Cell Research*, 2010; 316(2): 216 - 231.
- Levi G. Sulla cariocinesi delle cellule nervose. *Riv.Patol.Nerv.Ment.* 1898; 3 97- 113.
- Li GR, Deng XL, Sun H, Chung SS, Tse HF e Lau CP. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells.* 2006; 24 (6): 1519- 1528.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR e Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature.* 2005; 437 (7063): 1370- 1375.
- Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1997; 8 (14): iii- iix.
- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW e Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp.Neurol.* 1998; 149 (2): 411- 423.
- Liu CT, Yang YJ, Yin F, Wang X, Yu XH, Wang QH, Wang XL e Xie M. The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. *Cell Immunol.* 2006; 244 (1): 19- 32.
- Ma DK, Ming GL e Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2005; 15 (5): 514- 520.

- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA e 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 e 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 e Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* 2005; 28 223- 250.
- Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y e Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 2004; 11 (14): 1155- 1164.
- Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD e 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.* 1995; 15 (5 Pt 1): 3548- 3561.
- Nikkhah G, Duan WM, Knappe U, Jodicke A e 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.
- Nikkhah G, Olsson M, Eberhard J, Bentlage C, Cunningham MG e Bjorklund A. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology. *Neuroscience.* 1994; 63 (1): 57- 72.

- Nikkhah G, Rosenthal C, Falkenstein G, Roedter A, Papazoglou A e Brandis A. Microtransplantation of dopaminergic cell suspensions: further characterization and optimization of grafting parameters. *Cell Transplant.* 2009; 18 (2): 119- 133.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M e McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech.Dev.* 1996; 59 (1): 89- 102.
- Okita K, Ichisaka T e Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448 (7151): 313- 317.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A e Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410 (6829): 701- 705.
- Paton JA e Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science.* 1984; 225 (4666): 1046- 1048.
- Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I e Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine.* 2009; 34 (4): 328- 334.
- Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L e 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 e Studer L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2004; 101 (34): 12543- 12548.

- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS e Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999; 284 (5417): 1168- 1170.
- Piccini P, Pavese N, Hagell P, Reimer J, Bjorklund A, Oertel WH, Quinn NP, Brooks DJ e 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 e Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284 (5411): 143- 147.
- Reynolds BA e 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 Gehirnt transplantation, zugleich ein Beitrage zur Kentniss der Vorgänge an den zelligen Gehirnelementen. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1905; 40 329- 388.
- Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO e 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 e Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp.Neurol*. 2000; 164 (2): 247- 256.
- Schaper A. Die fruhesten differenzierung im centralnervenssystems. *Arch.f Entw-Mech.Organ*. 1897; 5 81- 132.

- Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB e 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 e Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* 2004; 429 (6988): 184- 187.
- Seki T. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *Anat.Sci.Int.* 2003; 78 (2): 69- 78.
- Shetty AK e 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 e Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 2002a; 417 (6884): 39- 44.
- Song HJ, Stevens CF e Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat.Neurosci.* 2002b; 5 (5): 438- 445.
- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B e McKay R. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J.Neurosci.* 2000; 20 (19): 7377- 7383.
- Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T e 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 e Studer L. Novel sources of stem cells for brain repair. *Clinical Neuroscience Research* 2002. 2002; 1 (2): 2- 10.
- Takahashi K e Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126 (4): 663- 676.
- Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C.R.Biol.* 2006; 329 (7): 465- 475.
- Thompson W. Successful brain grafting. *NY Med.* 1890; J.51 701- 702.
- Timmer M, Muller-Ostermeyer F, Kloth V, Winkler C, Grothe C e 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 e Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*. 2005; 47 (6): 803- 815.
- Trzaska KA, Reddy BY, Munoz JL, Li KY, Ye JH e Rameshwar P. Loss of RE-1 silencing factor in mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors induces functional maturity. *Mol.Cell Neurosci.* 2008; 39 (2): 285- 290.
- Van PH, Kempermann G e Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat.Neurosci.* 1999; 2 (3): 266- 270.
- Van PH, Kempermann G e Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat.Rev.Neurosci.* 2000; 1 (3): 191- 198.

- Vandenbosch R, Borgs L, Beukelaers P, Belachew S, Moonen G, Nguyen L e Malgrange B. Adult neurogenesis and the diseased brain. *Curr.Med.Chem.* 2009; 16 (6): 652- 666.
- Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Heiss C, Alt V, Klisch C, Meissl H e Schnettler R. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone.* 2006; 38 (6): 911-921.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE e Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 2007; 448 (7151): 318- 324.
- Whittemore SR, Morassutti DJ, Walters WM, Liu RH e 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.
- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G e Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 2005; 23 (3): 392- 402.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ e Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J.Neurosci.Res.* 2000; 61 (4): 364- 370.
- Wright LS, Prowse KR, Wallace K, Linskens MH e Svendsen CN. Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro. *Exp.Cell Res.* 2006; 312 (11): 2107- 2120.
- Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, Lo CP e Kuo YM. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal

- progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J.Appl.Physiol.* 2008; 105 (5): 1585- 1594.
- Wurmser AE e Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature.* 2002; 416 (6880): 485- 487.
- Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 2009; 137 (1): 13- 17.
- Yan J, Studer L e 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.
- Yang Y, Li Y, Lv Y, Zhang S, Chen L, Bai C, Nan X, Yue W e Pei X. NRSF silencing induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp.Cell Res.* 2008; 314 (11-12): 2257- 2265.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA e Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell.* 1998; 93 (5): 755- 766.
- Yim EK, Pang SW e Leong KW. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp.Cell Res.* 2007; 313 (9): 1820- 1829.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM e 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.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L e Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009; 4 (5): 381- 384.

Zhu W, Mao Y, Zhao Y, Zhou LF, Wang Y, Zhu JH, Zhu Y e 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.

Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, Mehmet H, Navarrete R, Navarrete C e Jen LS. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp.Neurol*. 2009; 216 (2): 439- 448.

Table legend:

Table 1: results of the stereological quantifications of the total surviving cells (GFP-positive) and surviving neurons derived from implanted mesenchymal stem cells (double stained for GFP and NeuN) in 30 rats. Rats 5, 8, 13, 20, 23 and 28 represent control animals implanted with medium without cells.

Figure legends:

Figure 1: methodology employed for stereotactic implantation of cells and stereological quantification. In **A**, a glass tube with a 40 μ m diameter tip adapted for a Hamilton syringe. In **B** and **C**, site of trepanations for implantation of the cell suspension. In **D** and **E** the target is shown in the periventricular striatum, and in **F** and **G**, in the hilus of the hippocampal dentate gyrus. In **H** and **I**, the whole brain was scanned and the striatum and hippocampus were marked for stereological quantification of double-positive cells (stained for NeuN and GFP), shown in **J** and **K**.

Figure 2: In vitro neuronal differentiation of GFP-expressing mesenchymal stem cells. Confocal images of cell cultures at various differentiation stages. In **A**, initial appearance after isolation of mesenchymal stem cells, expressing the mesenchymal marker vimentin in red, and GFP in green. In **B**, after exposure to bFGF and EGF, cells grow in aggregates, resembling the neurospheres described for fetal neural stem cells, in this case positive for nestin (red) and GFP (green). In **C**, cultures were seeded onto poly-L-lysine, which leads to detachment from the core of the spheres and adherence to the culture dish. In time, cells assume a pyramidal or spheroid morphology, with some sparsely ramified processes. Note dilatations at the tip of these processes that in fact represent growth cones and from which the dendritic processes start to grow. Nestin (red) and GFP (green). After exposure to a medium enriched in cAMP (see text), cells assume a very different morphology on immunocytochemical staining. Note the longer and more ramified dendritic processes, with tertiary and quaternary ramifications. In **D-F**, positivity for β III-tubulin, in **G-I**, MAP2 and in **J-L**, NF200 (green represents GFP). Scale bar 40 μ m, red revealed in AlexaFluor 594 and green signal from GFP not enhanced.

Figure 3: Different graft integration in the host brain. In the upper line, staining of the striatum, and in the lower line, the hippocampal region. In A-C, note the diffuse distribution of GFP in the intercellular matrix; neuronal nuclei stained in red with NeuN. In D-F, GFAP red staining shows the profuse astrocytic reaction observed in the striatum. By contrast, good integration of the graft in the hippocampal region is illustrated in G-I, from which we may deduce that cells have migrated away from the core of the graft and are homogeneously distributed throughout the entire hippocampal formation. In J-L, the absence of astrocytic activation in the hippocampal target. Red revealed with AlexaFluor 594, scale bar 150 μm

Figure 4: In vivo neuronal differentiation of mesenchymal stem cells in the hippocampal formation. Confocal images of brain slices showing the neuronal differentiation of GFP-expressing cells. In A-C, β III tubulin and GFP co-expression. In D-F, neuronal nuclear staining with NeuN and GFP. In G-I, neurofilament 200 and GFP. In J-L, GABA synthesis is demonstrated by the presence of GAT-1 and GFP. In M-O, positive staining for the neurotransmitter glutamate and GFP. Red revealed with AlexaFluor594, scale bar 150 μm

Figure 5: Statistical comparison between the experimental groups, evaluated using stereology. In A, diamond graphs illustrating a significantly higher cell number (GFP and NeuN double-positive cells) in the hippocampal formation compared with the striatal region. In diamond graphs, the width of the diamond is directly proportional to the sample size, and the height represents the variance. An intersection between the diamonds in the area between the horizontal bars implies confirmation of the null-hypothesis for a α error of 5% (groups may be similar). A non-Gaussian distribution of the data was seen in the histograms (B) and on normal quantile plots (C), where this justified the choice of a non-parametric test, in this case Mann-Whitney U. In D, a graphic representation of the statistical test with circles, where the size of the circle is inversely proportional to the sample size; an intersection angle between circles of less than 90° precludes statistical difference for a α error of 5%. In this case, *** indicates $p < 0.001$. In E, diamond graphs for the comparison between the animal groups sacrificed 6 and 12 weeks after implantation showing no statistical significance (F). Likewise in G, no significance was reached for the comparison among animals implanted

with undifferentiated cells after isolation in basal medium, or with cells grown in bFGF and EGF, or also after neuronal induction, and with cells cultivated in enriched cAMP (called “differentiated” cells). In H, no statistical difference among the 3 groups was observed. In I, cumulative distribution showing the prevalence of higher cell counts in the group of animals implanted with cells cultivated in cAMP. In J, comparison of the three groups only in the hippocampal formation, showing a statistical difference between the animals implanted with undifferentiated and differentiated cells in this specific case (intersection angle less than 90°).

Supplemental Figure 1: Efficiency of lentiviral transfection in the cultured cells. In A, schematic representation of the lentiviral construct for GFP expression. In B-D, mesenchymal stem cells after isolation in basal medium. Nuclei stained in blue with DAPI. A count of 82.5 ± 3.4 % of total cells expressing GFP at high levels was detected by transfecting 5 viral particles per cell.

Table 1

<i>rat</i>	<i>GFP- countings</i>	<i>NeuN- GFP positive cells</i>	<i>Target</i>	<i>surviving weeks after transplantation</i>	<i>culture condition</i>
1	1115	910	Hip	6	basal
2	1100	1100	Hip	12	basal
3	1190	1080	Hip	12	basal
4	970	725	Hip	6	basal
5	0	0	Hip	6	basal
6	2950	2605	Hip	6	bFGF EGF
7	1755	1700	Hip	6	bFGF EGF
8	0	0	Hip	6	bFGF EGF
9	1060	985	Hip	12	bFGF EGF
10	1220	1030	Hip	12	bFGF EGF
11	2110	1960	Hip	6	IBMX cAMP
12	1385	1330	Hip	6	IBMX cAMP
13	0	0	Hip	6	IBMX cAMP
14	1820	2790	Hip	12	IBMX cAMP
15	3445	3390	Hip	12	IBMX cAMP
16	165	150	Str	6	basal
17	145	90	Str	12	basal
18	260	55	Str	12	basal
19	30	15	Str	6	basal
20	0	0	Str	6	basal
21	305	65	Str	6	bFGF EGF
22	325	300	Str	6	bFGF EGF
23	0	0	Str	6	bFGF EGF
24	265	100	Str	12	bFGF EGF
25	530	145	Str	12	bFGF EGF
26	50	40	Str	6	IBMX cAMP
27	320	250	Str	6	IBMX cAMP
28	0	0	Str	6	IBMX cAMP
29	130	85	Str	12	IBMX cAMP
30	500	20	Str	12	IBMX cAMP

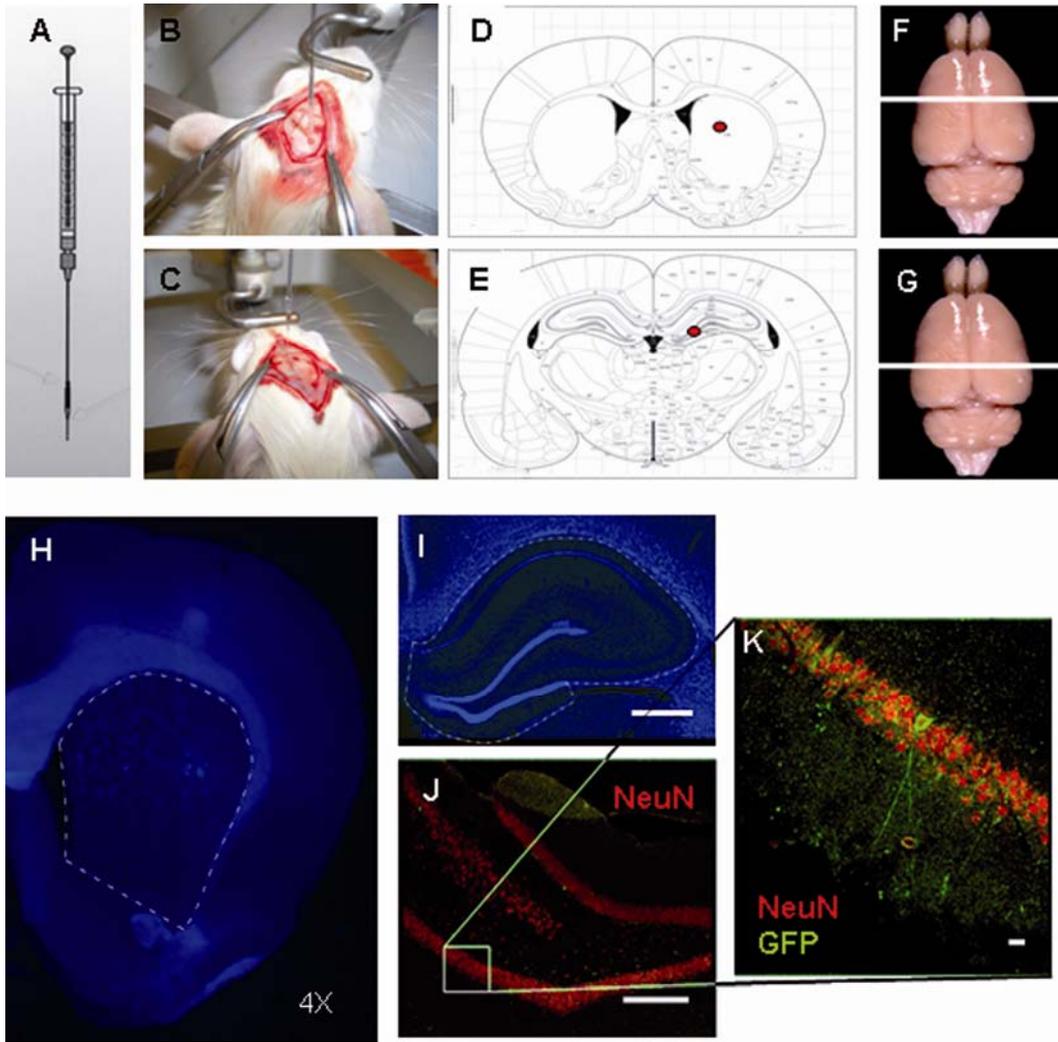


Figure 2

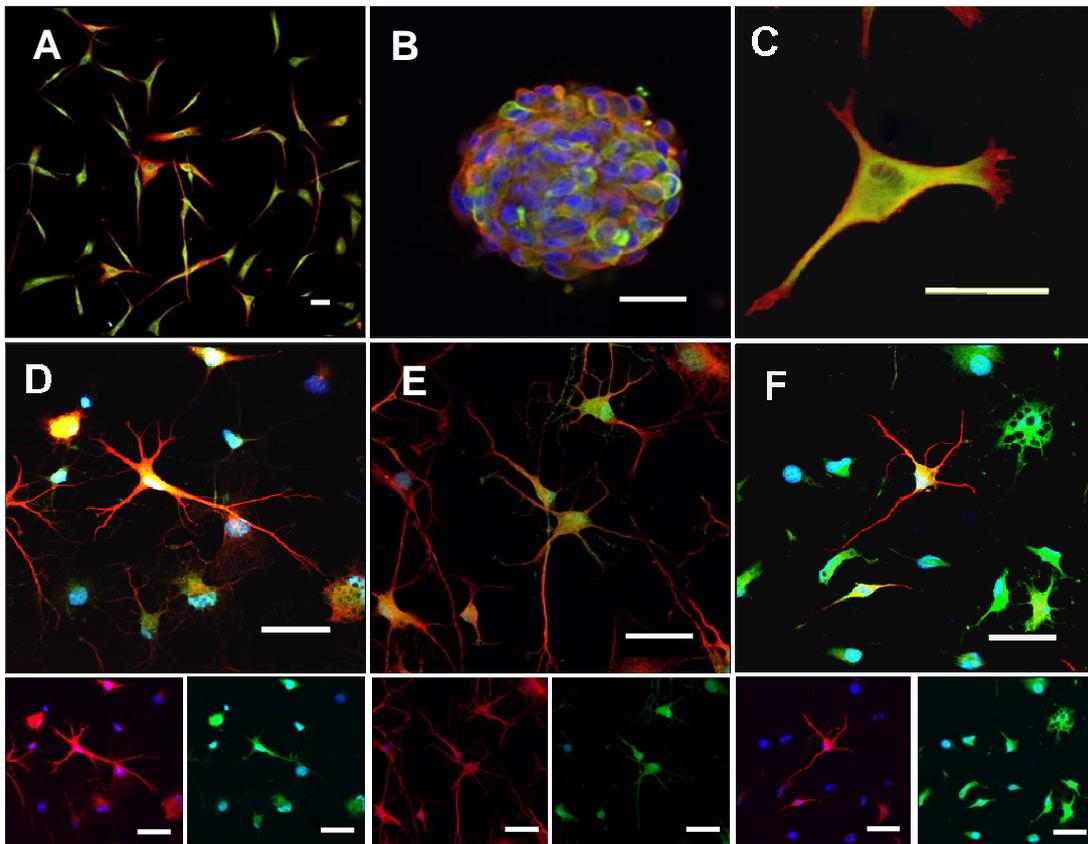


Figure 3

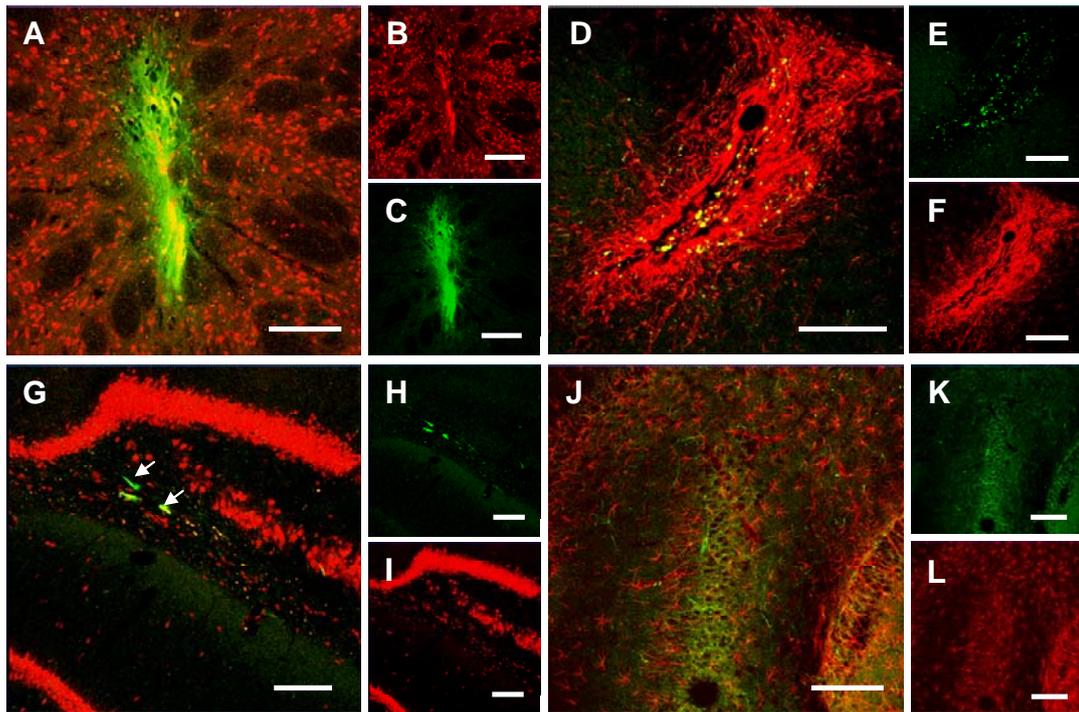


Figure 4

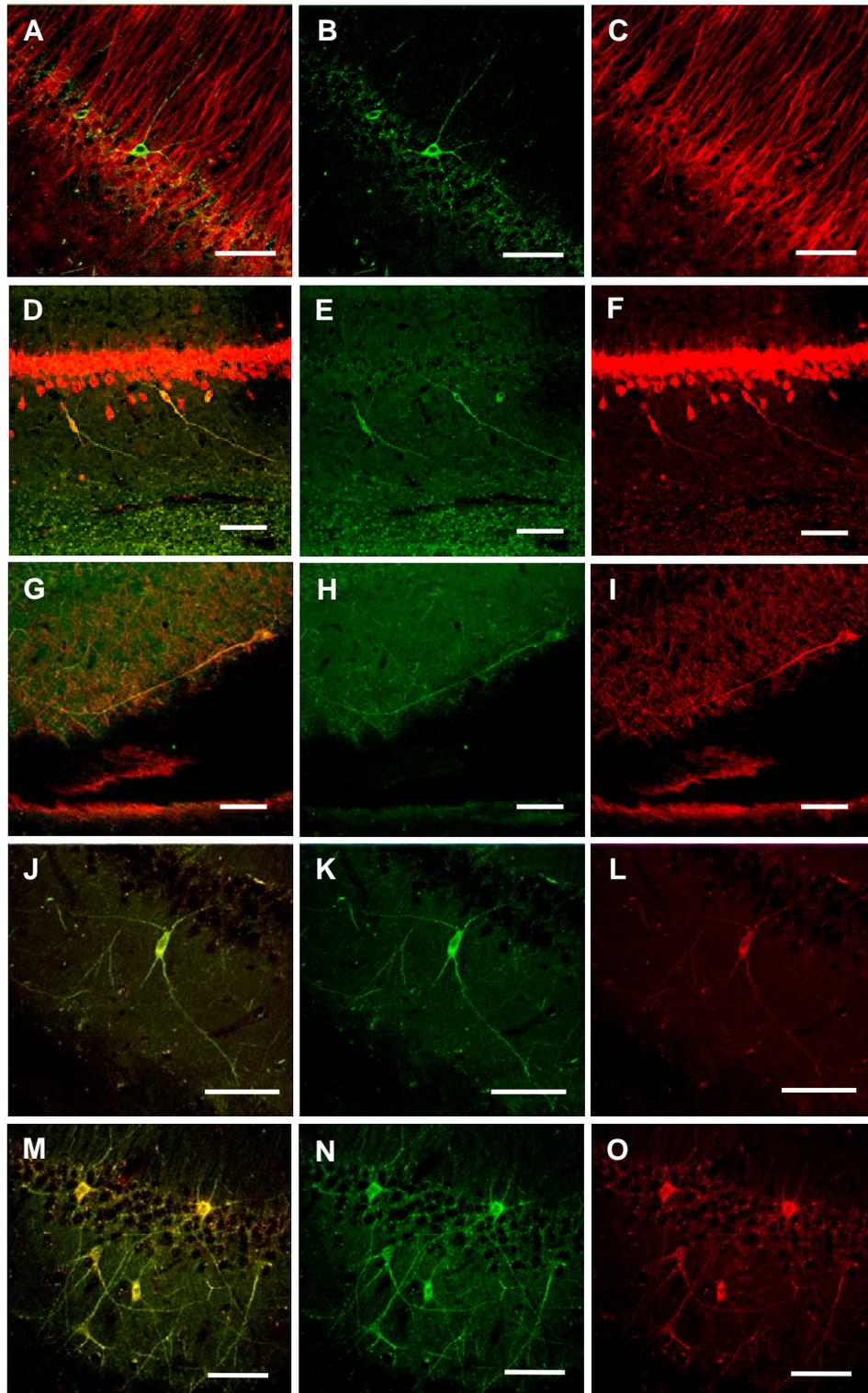
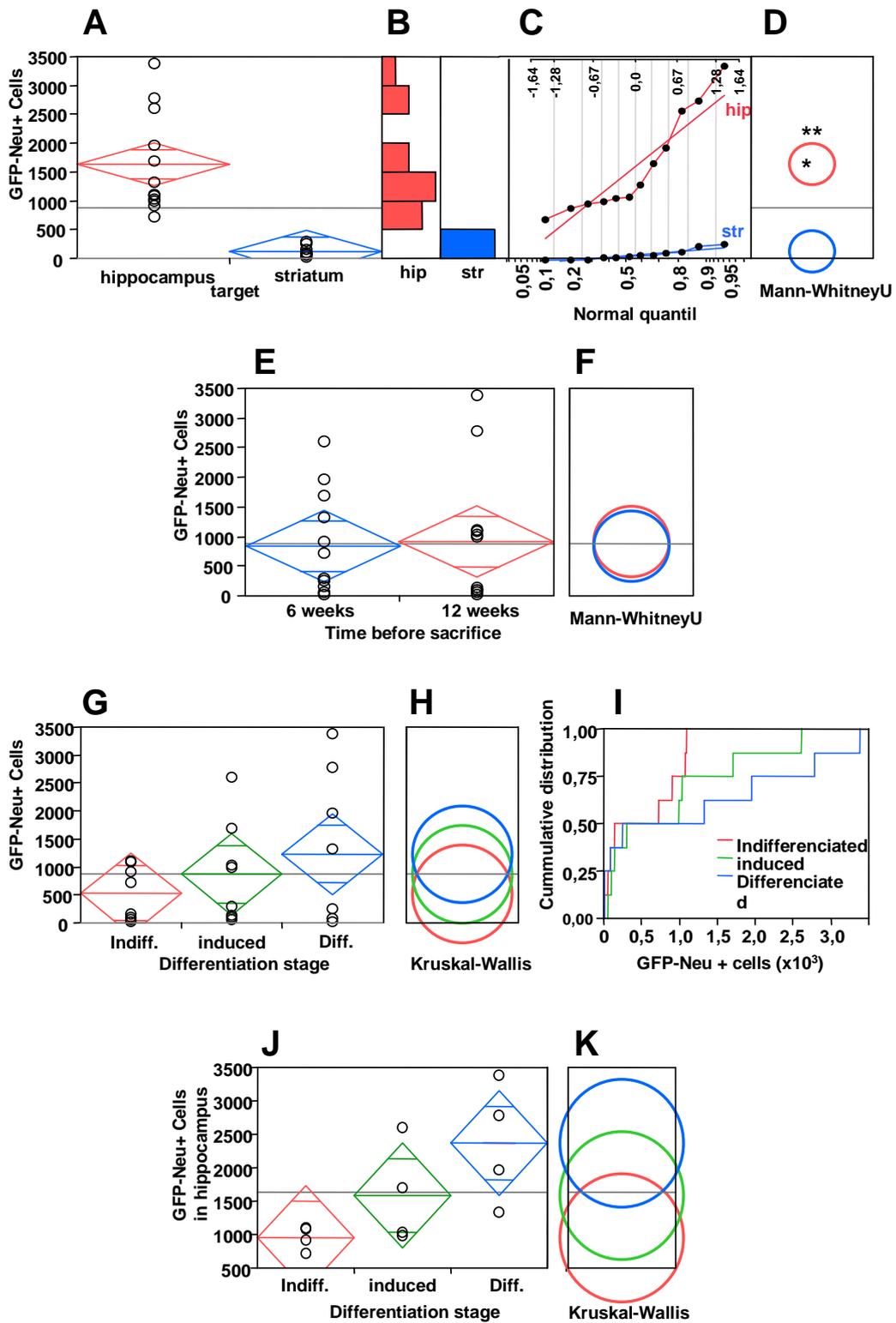
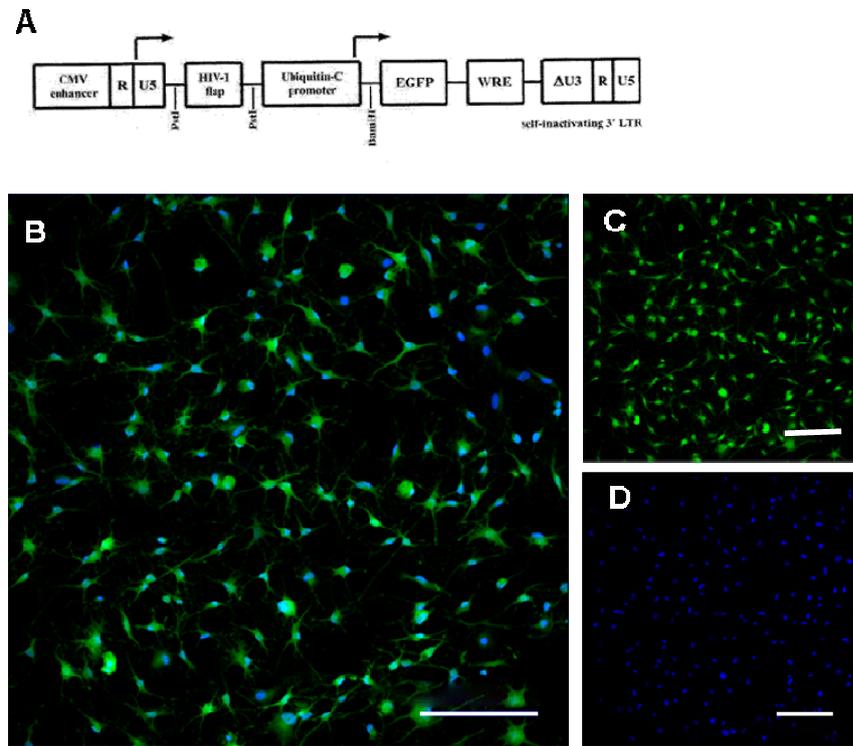


Figure 5



Supplemental Figure 1



ANEXO 2: Quantificação de células NeuN-GFP+ no hipocampo x estriado dos ratos implantados.

rato	1												soma	x5
estrutura	Hip D													
lâmina	4	4	4	4	4	5	5	5	5					
corte	2	3	4	5	6	1	2	3	4					
GFP	12	16	17	28	16	14	29	26	65				223	1115
NeuN	11	9	17	21	11	13	20	16	64				182	910
área (µm2)	1273270	2647540	3743220	4436960	4873230	5430400	5574840	5152690	5769190				38901340	
rato	2													
estrutura	Hip D													
lâmina	4	4	5	5										
corte	5	6	1	3										
GFP	77	37	75	31									220	1100
NeuN	77	37	75	31									220	1100
área (µm2)	5125860	4937080	5357780	4848820									20269540	
rato	3													
estrutura	Hip D													
lâmina	3	3	3	3	4	4	4	4	4					
corte	3	4	5	6	1	2	3	5	6					
GFP	14	21	34	28	31	42	32	17	19				238	1190
NeuN	14	20	30	19	27	40	32	16	18				216	1080
área (µm2)	2060370	3175120	4649530	5306350	5618750	5977580	5794410	5993460	5880150				44455720	
rato	4													
estrutura	HipD													
lâmina	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6			
corte	4	5	7	1	2	3	4	5	6	1	2			
GFP	5	6	10	9	10	14	20	26	39	30	25		194	970
NeuN	5	4	3	7	7	12	15	18	35	20	19		145	725
área (µm2)	856225	2117930	3056800	3852370	4339120	5033270	5097590	4420310	4996010	5520360	5350150		44640135	

rato	6												soma	x5
estrutura	HipD													
lâmina	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5		
corte	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4		
GFP	6	42	31	29	39	57	55	59	69	69	66	68	590	2950
NeuN	6	36	29	27	35	49	45	40	66	64	64	60	521	2555
área (µm2)	597700	3906170	3380220	2035290	4614590	4900750	5192880	5425500	5960290	5992480	5900100	5185200	53091170	
estrutura	HipD													
rato	7													
estrutura	HipD													
lâmina	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5				
corte	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4				
GFP	4	16	38	17	12	66	45	49	59	45			351	1755
NeuN	4	16	38	13	11	66	45	47	56	44			340	1700
área (µm2)	1490510	1490510	2763130	4681260	3268760	4534510	5171160	5555550	5328820	5421560			39705770	
rato	9													
estrutura	HipD													
lâmina	3	3	3	3	4	4	4	4						
corte	2	3	4	6	1	2	3	4						
GFP	8	4	10	20	60	22	63	25					212	1060
NeuN	8	3	7	18	59	18	61	23					197	985
área (µm2)	1814260	3116570	3889010	5125580	5428190	6385520	7236830	5723010					38718970	
rato	10													
estrutura	HipD													
lâmina	3	3	3	3	4	4	4	4	4					
corte	3	4	5	6	1	2	4	5	6					
GFP	17	22	24	24	45	33	24	28	27				244	1220
NeuN	14	21	18	23	39	26	18	22	25				206	1030

rato	11										soma	x5
estrutura	HipD											
lâmina	4	4	4	5	5	5	5	5				
corte	4	5	6	1	2	3	4	5				
GFP	30	50	57	50	55	69	57	54			422	2110
NeuN	26	46	48	46	54	68	51	53			392	1960
área (µm2)	2662190	2326030	4277460	3815890	4678520	5677090	5120940	5220590			33778710	
rato	12											
estrutura	HipD											
lâmina	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5		
corte	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4		
GFP	1	8	34	22	10	49	38	38	45	32	277	1385
NeuN	1	7	34	20	7	49	38	37	42	31	266	1330
área (µm2)	450837	2583170	2846110	4662630	3294310	4490750	5111430	5562380	5528900	5583080	40113597	
rato	14											
estrutura	HipD											
lâmina	3	3	3	4	4	4	4	4				
corte	4	5	6	1	2	3	4	5				
GFP	55	106	85	57	58	80	58	65			564	2820
NeuN	55	104	83	57	56	80	58	65			558	2790
área (µm2)	2806160	4083200	4498630	3843970	5518970	6158900	6305510	5776530			38991870	
rato	15											
estrutura	HipD											
lâmina	3	4	4	4	4	4						
corte	6	1	2	3	4	5						
GFP	115	142	103	97	149	83					689	3445
NeuN	113	140	101	92	149	83					678	3390
área (µm2)	2831420	3736550	4423560	5619310	5897270	5606190					28114300	

rato	16												soma	x5
estrutura	STR D													
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3		
corte	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5		
GFP	0	0	0	2	0	0	0	1	0	25	1	4	33	165
NeuN	0	0	0	1	0	0	0	0	0	25	1	3	30	150
área (µm2)	3107800	5341020	4857740	6663700	5660080	7874970	6265080	7780390	7514870	7598920	6993280	6826350	76484200	
rato	17													
estrutura	STR D													
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3				
corte	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3				
GFP	0	0	0	5	12	5	0	2	5	0			29	145
NeuN	0	0	0	2	12	2	0	0	2	0			18	90
área (µm2)	5723750	6596680	6231380	7969725	7974080	7898340	8219550	9354600	10421900	7736200			78126205	
rato	18													
estrutura	STR D												soma	
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	2						
corte	1	2	3	4	5	6	7	8						
GFP	0	6	14	0	16	7	4	5					52	260
NeuN	0	4	1	0	1	0	2	3					11	55
área (µm2)	8335860	8912330	9662000	10976600	9711420	9626960	8645490	5802720					71673380	
rato	19													
estrutura	STR D												soma	x5
lâmina	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4				
corte	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8				
GFP	2	0	1	0	0	0	1	1	0	1			6	30
NeuN	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1			3	15
área (µm2)	6185130	4971510	6854830	7299520	7573750	7867130	6705320	6298320	6501360	6672530			66929400	

rato	21											soma	x5
estrutura	STR D												
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3		
corte	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3		
GFP	12	1	0	9	3	1	14	7	5	1	8	61	305
NeuN	8	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1	13	65
área (µm2)	6049750	8002750	6588060	8441030	8192770	8948310	8896490	7823200	7444640	6462170	8747460	85596630	
rato	22												
estrutura	STR D												
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	3					
corte	2	3	4	5	6	7	8	1					
GFP	3	0	0	2	1	15	41	3				65	325
NeuN	0	0	0	2	1	15	40	2				60	300
área (µm2)	6126010	5022520	6544780	7180090	7485420	7584950	7826060	7992500				55762330	
rato	24												
estrutura	STR D												
lâmina	1	2	2	2	2	2	2	2					
corte	8	1	2	3	4	5	6	7					
GFP	0	0	4	13	10	15	11	0				53	265
NeuN	0	0	1	0	6	8	5	0				20	100
área (µm2)	6036230	6917670	7959400	9372610	8887590	8278500	8254600	6381880				62088480	
rato	25												
estrutura	STR D												
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	2					
corte	1	2	3	4	5	6	7	8					
GFP	0	10	21	18	13	42	2	0				106	530
NeuN	0	1	0	14	10	4	0	0				29	145
área (µm2)	71612720	7211950	7493380	7696310	8017780	7626150	7979690	6113660				1,24E+08	

rato	26													soma	x5
estrutura	STR D														
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3		
corte	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5		
GFP	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	2	1	3	10	50
NeuN	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	8	40
área (µm2)	433210	5666810	8466060	7513080	6743570	8596270	8771360	4654900	7657930	8274760	1E+07	8312230	5854120	50845260	
rato	27														
estrutura	STR D														
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3					
corte	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3					
GFP	0	0	1	10	0	4	31	9	0	9				64	320
NeuN	0	0	1	10	0	2	30	7	0	0				50	250
área (µm2)	6097100	5509060	6972260	9027090	7452900	7882470	8339300	8329330	9503410	8251630				69112920	
rato	29														
estrutura	STR D														
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	2							
corte	1	2	3	4	5	6	7	8							
GFP	1	14	8	2	0	0	1	0						26	130
NeuN	1	6	8	1	0	0	1	0						17	85
área (µm2)	6426010	7818080	8517850	9439670	9970100	10155100	9436540	7085010						68848360	
rato	30														
estrutura	STR D														
lâmina	2	2	2	2	2	2	2	2							
corte	1	2	3	4	5	6	7	8							
GFP	0	0	2	75	6	12	2	3						100	500
NeuN	0	0	1	0	0	0	0	3						4	20
área (µm2)	5152220	6691920	7646310	7646310	9553970	8300310	8500370	8008100						61499510	

ANEXO 3: Aprovação do projeto pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0087/07**, intitulado: **"SOBREVIVÊNCIA, INTEGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS - TRONCO MESENQUIMAIS EM RATOS NORMAIS"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Prof^o. Dr^a. Suey Kazue Nagahashi Marie**

Pesquisador (a) Executante: **Cinthia Elim Jannes Lepski**

CAPPesq, 09 de maio de 2007

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa