

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Estudo da integridade genômica durante o
processo de diferenciação de células-tronco
adultas em células com características
neurais**

TESE DE DOUTORADO

ANA PAULA FRANCO LAMBERT

Porto Alegre, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**Estudo da integridade genômica durante o
processo de diferenciação de células-tronco
adultas em células com características
neurais**

Ana Paula Franco Lambert

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr João Antonio Pêgas Henriques

Co-orientador: Profa.Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre, dezembro de 2009.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos."

Albert Einstein

"O acaso só favorece aos espíritos preparados e não prescinde da observação."

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques**, pela maravilhosa oportunidade de crescimento, aprimoramento e formação. Agradeço pela orientação livre e participativa, por saber os momento de cobrar e os de apoiar. Obrigado pelo excelente exemplo como pesquisador e como gerenciador de uma carreira repleta de atividades, compromissos e muito êxito. Mostrou-me não ter medo a se lançar sobre novos desafios e que é possível realizar inúmeras atividades ao mesmo tempo e fazê-las bem feitas. Saber cobrar e administrar os recursos humanos é uma arte ao qual meu orientador é um grande exemplo. Considero-o como um modelo de profissional a ser seguido.

Ao **Prof. Dr. Diego Bonatto**, idealizador deste projeto, pela magnífica idéia, pela atualidade e importância do tema. Agradeço-o pela orientação informal como meu co-orientador, e, principalmente, pelo belo exemplo de genialidade e eficiência. Uma combinação perfeita para o sucesso. Considero-o também um belo exemplo a ser seguido.

Agradeço à minha co-orientadora **Prof. Denise Cantarelli Machado** pela amizade, por receber-me em seu laboratório e por ter disponibilizado de forma total todos os recursos disponíveis. Obrigada pela liberdade, confiança e por manter as portas do laboratório sempre abertas.

Às minhas amigas e colegas de laboratório e de projeto **Aline Fraga Zandonai** e **Mariana de Assis lemos** pela colaboração, por tudo que me

ensinaram e por todos os momentos de planejamento, organização e execução do nosso projeto. Desculpem-me pelos momentos de incertezas e angústias, mas eles foram importantes para o nosso crescimento. Agradeço ao **João Álvaro Souza da Silva**, bolsista de iniciação científica do projeto por ter ajudado nos experimentos e por ser um menino sempre alegre e disposto para fazer e aprender. Desejo muito sucesso e espero que possamos continuar a fazer pesquisa juntos no futuro.

Aos colegas do Laboratório de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul **Cristian, Jeremiah, Daniel, Gustavo, Ana Lúcia** e demais bolsistas e estudantes pela ajuda nos experimentos, pelas discussões, amizade, lanches e momentos de distração.

Agradeço à colega **Dinara Moura** pela amizade, apoio e disponibilidade na realização de alguns experimentos. Agradeço, também, aos demais colegas do laboratórios 210 e 219 da UFRGS pela acolhida e pelas conversas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM-UFRGS) pelas oportunidades.

Á **Sílvia** e ao **Luciano**, da secretaria do PPGBCM, pela rapidez e pela alta qualidade de seus serviços, estando sempre alegres e prontos a ajudar.

Á **Márcia Vaz**, secretária do Prof. João A. P. Henriques pelas conversas e por estar sempre alegre e disposta.

Agradeço à minha amigona, colega de colégio e de profissão **Letícia Furini Fossati** por ter lido e colaborado com as correções ortográficas desta tese.

Agradeço aos meus pais **Huberto Lambert** e **Ivoni Franco Lambert** pelo exemplo que dão todos os dias de como manter e cuidar de uma família, da importância da profissão e do nosso papel na sociedade. Para eles que costumam dizer que a “fruta não cai longe do pé”: Pai, obrigada pelos genes da inquietude, da busca e da perseverança e, Mãe, obrigada pelos genes do conhecimento da biologia, da sensatez e da praticidade. Agradeço aos meus irmãos **José Humberto**, **Daniela** e **Bruna**, meus orgulhos e a maior herança que eu poderia receber. Especialmente a Bruninha por ter sido iniciação científica do projeto por alguns meses e por ter colaborado nas correções da tese.

Ao meu marido, **Joner Mahnic de Toledo**, meu amor de longa data, meu companheiro, meu amigo: obrigada pela compreensão, pela paciência e pelo teu suporte. O teu apoio foi fundamental para a realização desse doutorado. Obrigada também pelo nosso presente de Deus, a grande emoção de nossa vida.

Agradeço de forma especial à minha família e à família de meu esposo, **Homero**, **Josefina** e **Joelly** pelo apoio e ajuda na fase final da elaboração dessa tese. Agradeço, principalmente, a minha mãe, minha sogra e a Fátima que cuidaram incessantemente e fizeram plantões para ficar com o Mateus. Sem vocês não seria possível concluir esta tese.

Agradeço ao **Mateus** por ter tornado o final deste doutorado muito mais intenso e emocionante, por me mostrar que é possível ser mãe (trocar fraldas, dar de mamar, etc) e terminar o doutorado ao mesmo tempo.

Por final, mas não menos importante, agradeço a **Deus** pela oportunidade, saúde e por ter me ofertado a capacidade e as habilidades necessárias para a elaboração deste trabalho. Espero estar contribuindo de alguma forma positiva para o bem e para a evolução humanidade.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho faz parte do projeto intitulado: “**Estudo dos mecanismos de reparação de DNA e de remodelagem de cromatina associados ao processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas**”.

Este Trabalho foi realizado através de uma parceria entre os grupos de pesquisa coordenados pelo Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pela Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado e pelo Prof. Dr. Diego Bonatto. O mesmo foi realizado nas dependências do Laboratório de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e do Laboratório de Radiobiologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq.

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A presente tese encontra-se estruturada da seguinte forma: uma introdução geral, os objetivos (gerais e específicos), os dois capítulos principais escritos na forma de artigos científicos, discussão, conclusões e perspectivas.

A introdução aborda alguns conceitos atuais sobre a biologia das células-tronco, a aplicação das mesmas na medicina regenerativa e a necessidade de pesquisas básicas. Também inclui os métodos de diferenciação neural *in vitro* das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADAS), o papel da manutenção da integridade genômica durante o processo de diferenciação das células-tronco para tecido neural. Esta seção finaliza com uma abordagem sobre as proteínas envolvidas na sinalização dos danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular (ATM, ATR, γ -H2AX, TIP60, TRRAP, MCM e telomerase), proteínas estas que foram objetivos de estudo desta tese.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão geral sobre o processo de diferenciação de células-tronco provenientes do tecido adiposo em tecido neural *in vitro*, utilizando os dados conhecidos até aquele momento. Nesta revisão foram apresentados os principais meios de indução para tecido nervoso e a forma de confirmação dessa diferenciação.

O Capítulo 2 aborda um estudo de viabilidade e integridade das células-tronco derivadas do tecido adiposo durante o processo de diferenciação para o tecido neural. Da mesma forma, aborda a expressão de proteínas relacionadas

com a sinalização de danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular durante esse processo.

Na seqüência apresenta-se uma discussão geral correlacionando os capítulos acima, bem como sua importância como gerador de novos conhecimentos científicos, as conclusões e as perspectivas geradas por esta tese.

No item 'Anexos' encontram-se: (I) o termo de consentimento livre esclarecido que foi assinado pelos pacientes que decidiram doar as células para participar do estudo, (II) resultados de qRT-PCR para proteínas de reparação de DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular em células-tronco derivadas do tecido adiposo induzidas para células neurais.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
APRESENTAÇÃO	VIII
ESTRUTURAÇÃO DA TESE	IX
ÍNDICE.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. A biologia das células-tronco	2
2. Células-tronco adultas e seu papel na medicina regenerativa	8
3. Métodos de diferenciação neural in vitro das células tronco derivadas do tecido adiposo (ADAS).....	11
4. A manutenção da integridade genômica durante o processo de diferenciação das células-tronco para tecido neural	13
5. Proteínas envolvidas na sinalização dos danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular	17
ATM e ATR.....	17
Proteínas Remodeladoras de Cromatina e a Histona H2AX	21
Os complexos HATs e a proteína TIP60	23
TRRAP	25
A Família MCM.....	27
Telomerase.....	29
OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO 1	36
ARTIGO: “ <i>DIFFERENTIATION OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED ADULT STEM CELLS INTO NEURONAL TISSUE: DOES IT WORK?</i> ”	36
CAPÍTULO 2	46
ARTIGO: “ <i>THE VIABILITY AND INTEGRITY OF ADAS CELL DIFFERENTIATED IN NEURAL LIKE CELLS</i> ”.....	46
DISCUSSÃO GERAL.....	70
As implicações do processo de neurodiferenciação in vitro	71
A reparação do DNA e remodelagem de cromatina na manutenção das células-tronco adultas	73
Evidências sobre processo de reparação do DNA, remodelagem de cromatina e expressão da telomerase na neurogênese das células-tronco... ..	75
Evidências da transformação maligna no processo de diferenciação das células-tronco.....	79
CONCLUSÃO	81
CONCLUSÃO GERAL	82
Conclusões específicas.....	82
PERSPECTIVAS.....	84
BIBLIOGRAFIA	87

ANEXOS	106
ANEXO I- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	107
ANEXO II- RESULTADOS DE QRT-PCR PARA PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO DE DANOS NO DNA, REMODELAGEM DE CROMATINA E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO INDUZIDAS PARA CÉLULAS NEURAIS.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAS	<i>Adipose derived adult stem</i> (células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo)
AR	Agentes radiomimetizadores
AT	Ataxia telangiectasia
ATLD	<i>Ataxia telangiectasia-like disorder</i> (desordem semelhante à Ataxia Telangiectasia)
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i> (proteína mutada ataxia telangiectasia)
ATR	<i>ATM-/Rad3-related protein</i> (proteína relacionada a ATM)
CS	<i>Cockayne syndrome</i> (síndrome de Cockayne)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (soro Dulbecco modificado por Eagle)
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i> (subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA)
DSB	<i>Double strand breaks</i> (quebras duplas de fita de DNA)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (soro fetal bovino)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (proteína glial ácida fibrilar)
HATs	<i>Histone acetyltransferase</i> (acetiltransferases de histonas)
hTERT	<i>human Telomerase reverse transcriptase</i> (transcriptase reversa da telomerase humana)
IR	<i>Ionizing radiation</i> (radiação ionizante)
MCM	<i>minichromosome maintenance</i>
MRN	MRE11/RAD50/NBN

MSC	<i>Mesenchimal stem cells</i> (células tronco mesenquimais)
NSE	<i>Neuron-Specific Enolase</i> (enolase específica de neurônio)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampão salina-fosfato)
PIKK	3-fosfatidilinositol cinases
ssDNA	<i>Single-strand DNA</i> (fita simples de DNA)
TERC	<i>Telomerase RNA component</i> (componente de RNA da telomerase)
Tip60	<i>Tat-interactive protein 60 kDa</i> (proteína de 60 kDa que interage com Tat)
TRRAP	<i>Transactivation/transformation-domain associated protein</i> (proteína associada ao domínio de transativação/transformação)
UV	Radiação ultravioleta
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i> (xeroderma pigmentoso)

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (MSC) foram originalmente isoladas da medula óssea, mas populações semelhantes foram isoladas do tecido adiposo e outros tecidos. A diferenciação das células-tronco derivadas do tecido adiposo (do inglês *adipose derived stem cells*; ADAS) para células neurais foram realizadas por vários grupos. Um aspecto muito importante relacionado com as células-tronco é a manutenção da integridade genômica durante o processo de diferenciação. Acredita-se que a manutenção da estabilidade genética por meio dos mecanismos de reparação do DNA devem ser particularmente rigorosos em células-tronco adultas, onde qualquer alteração genética pode comprometer a estabilidade genética e a funcionalidade destas células. O objetivo deste estudo foi observar a viabilidade e a integridade genética das células ADAS tratadas com o meio de indução neural, por meio do teste cometa, teste de micronúcleo e teste de viabilidade celular. Além disso, foi analisada a expressão de algumas proteínas relacionadas com a sinalização de danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação. Os resultados obtidos no presente estudo claramente indicaram que o meio de indução neural pode ser genotóxico para as ADAS. O teste cometa revelou que a indução neural aumenta o índice e a frequência de danos no DNA. A indução de micronúcleos não foi observada nas mesmas condições, indicando que o meio de indução neural não causa danos clastogênicos. Ao considerar a expressão de MCM3, TIP60, telomerase e a variação na expressão de marcadores neurais, o método de indução neural usada *in vitro* pode

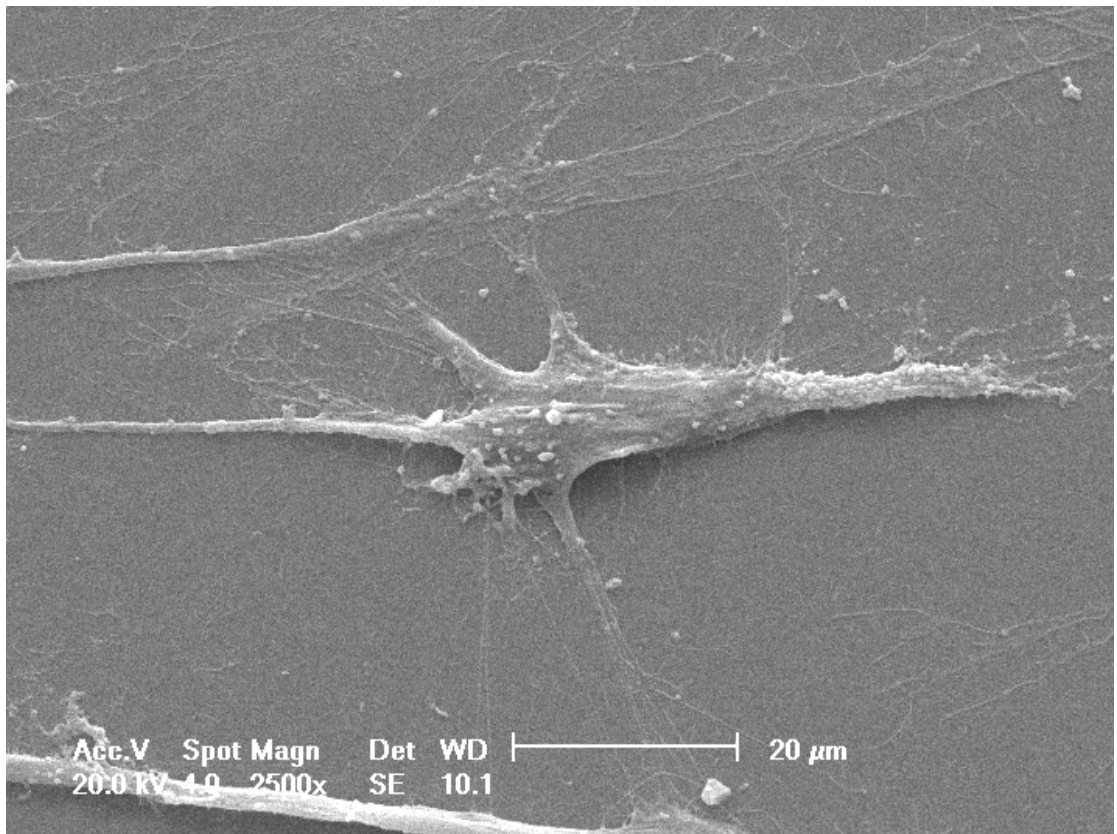
encaminhar a célula a uma transformação tumoral. Estes resultados alertam para a importância dos estudos relacionados com aos protocolos atualmente usados na diferenciação *in vitro* de células-tronco para fins terapêuticos.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) were originally isolated from the bone marrow, although similar populations have been isolated from adipose and other tissues. The differentiation of ADAS (adipose derived stem cells) to neuronal cells has been accomplished by several groups. One important aspect related to stem cells is the maintenance of genomic integrity during the differentiation process. In this sense, the maintenance of genomic stability by DNA repair mechanisms in adult stem cells should be particularly stringent, where any genetic alteration can compromise the genomic stability and functionality of cell. Thus, the aim of this study was to observe the viability and integrity of ADAS cells treated with neural induction medium by using the comet, micronucleus, and cell viability assays. Moreover, the expression of some proteins and genes related to DNA damage signalling, chromatin remodeling, and cell proliferation was analyzed. The data obtained from the present study clearly indicate that the neuronal medium can be genotoxic to ADAS cells. Our results reveal that neuronal induction increases the damage frequency and damage index observed by comet assay. The induction of micronuclei was not observed for the same assay conditions, indicating that the neuronal induction medium does not cause chromosome loss and breakage. Considering the expression of MCM3, TIP60, telomerase and neuronal marker, it can be speculated that the neural induction conditions used in this work can drive ADAS cells to tumor transformation. These results call for the necessity of new studies related to *in vitro* stem cell differentiation protocols for therapeutical purposes.

I-

INTRODUÇÃO GERAL



Célula derivada do tecido adiposo em cultura (Microscopia Eletrônica)

1. A biologia das células-tronco

As células-tronco apresentam como características principais a capacidade de auto-renovação e a diferenciação em múltiplas linhagens celulares. Embora existam inúmeros critérios propostos para definir o que são as células-tronco, os conceitos mais aceitos pela comunidade científica são: (i) devem ser células indiferenciadas, (ii) devem ser capazes de proliferação e auto-renovação, produzindo inúmeras células funcionalmente diferenciadas e (iii) devem regenerar os diferentes tecidos do organismo após uma lesão (Lajtha, 1979; Loeffler et al., 1997; Kaji e Leiden, 2001) (Figura 1).

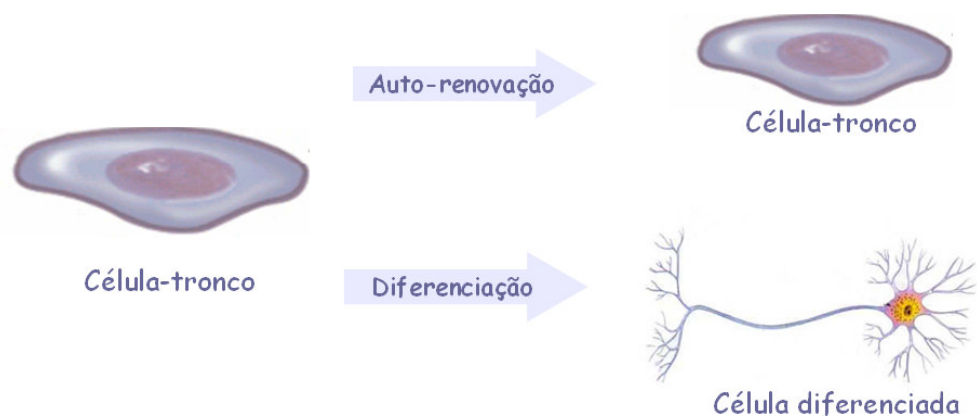


Figura 1. Características das células-tronco.

As células-tronco desenvolvem um papel central na formação dos tecidos, na regeneração e na homeostasia do organismo, fornecendo novos elementos para aumentar a massa tecidual durante o desenvolvimento/crescimento e substituindo as células perdidas no processo de

envelhecimento e nas lesões (Piscaglia, 2008). Existe uma hierarquia de potencialidade das células-tronco: (i) as células do zigoto e suas progênes diretas são totipotentes, (ii) as células embrionárias são pluripotentes e (iii) as células dos adultos são multipotentes (Mimeault et al., 2007).

As células-tronco embrionárias derivadas da massa interna do blastocisto (retiradas no 4° ou 5° dia após a fecundação) são capazes de gerar qualquer fenótipo celular derivados das três camadas germinativas (mesoderma, endoderma e ectoderma) (Piscaglia, 2008). Estas células podem ser cultivadas tornando-se uma linhagem de célula-tronco embrionária. Além das células retiradas do blastocisto, também são conhecidos outros tipos de células embrionárias que são pluripotentes, tais como as células germinais embrionárias, encontradas em uma fase mais avançada do desenvolvimento fetal (5° a 10° semana), e as células obtidas por transferência de núcleo somático (Fuchs e Segre, 2000; Zago M. A., 2006). A rede de sinalização envolvida na manutenção da pluripotencialidade e diferenciação das células-tronco embrionárias permanecem desconhecidas. (Liu et al., 2008). Além disso, o uso de células-tronco fetais ou embrionárias origina importantes questões biológicas, éticas e legais que podem limitar a sua utilização nas pesquisas básicas e clínicas (Haas et al., 2005).

Em 2006, as células-tronco induzidas (iPS) foram geradas através da transformação com retrovírus que induz a expressão dos fatores Yamanaka (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*) em fibroblastos de camundongos embrionários e adultos (Takahashi e Yamanaka, 2006). Recentemente foi

possível induzir células iPS humanas pelos fatores Yamanaka ou pela combinação de vários outros fatores em fibroblastos adultos humanos (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Nakagawa et al., 2008). Os fatores Yamanaka iniciam a maioria, se não todas, as vias de sinalização importantes para o desenvolvimento da indução das células iPS. Acredita-se, também, que esses fatores são importantes para a manutenção da pluripotencialidade das células-tronco embrionárias (Liu et al., 2008). A transformação das células iPS tem sido reconhecida como muito promissora, pois pode solucionar as questões éticas e problemas de rejeição associados ao uso de células-tronco embrionárias humanas na medicina regenerativa.

Ao final da embriogênese cada tecido apresenta uma população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação, incluindo as células relativamente indiferenciadas usadas para a auto-renovação tecidual e que são chamadas de células-tronco adultas. Essas células-tronco adultas apresentam um potencial mais limitado de diferenciação (Piscaglia, 2008). Neste sentido, as células-tronco adultas ou somáticas são multipotentes, pois geram tipos celulares de uma ou mais linhagens, mas não possuem a capacidade de constituir o organismo como um todo (Fuchs e Segre, 2000). A capacidade de gerar diversos tipos celulares, tanto *in vivo* como *in vitro*, bem como os mecanismos envolvidos que modulam a diferenciação em um tipo celular específico, ainda são muito discutidos e continuam sendo alvo de muitas pesquisas (Vescovi et al., 2002; Safford e Rice, 2005; Bobis et al., 2006; Parker e Katz, 2006; Kolf et al., 2007). Estudos têm demonstrado a presença de células-tronco em vários tecidos adultos como na medula óssea, no sangue periférico, no sistema nervoso central, no fígado, no

pâncreas, o músculo, na pele, no pulmão, no intestino, no coração e no tecido adiposo (Zuk et al., 2001; Korbiling e Estrov, 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Parker e Katz, 2006).

As células-tronco adultas contribuem em várias funções teciduais. No entanto, a função principal que elas possuem é de prover células indiferenciadas para a renovação dos tecidos. Assim, as células tronco adultas apresentam uma função específica no tecido em que residem (Kenyon e Gerson, 2007). Por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas que residem na medula óssea têm como função mediar à produção de linhagens mielóides e linfóides. Altas doses de radiação e quimioterapia são usadas para ablação destas células no caso de doenças hematológicas malignas. No entanto, uma única célula-tronco original, sendo normal ou cancerosa, é capaz de repovoar toda a medula óssea (Hong et al., 2007; Kenyon e Gerson, 2007; Lobo et al., 2007). Da mesma forma, as células-tronco neurais costumam migrar e diferenciar para zonas lesadas que necessitem de reparo. As anormalidades nesta função podem levar à transformação de um “*pool*” de células-tronco neurais e originar cânceres neurais, especialmente glioblastomas, meduloblastomas e ependinomas. Por outro lado, a deficiência em células-tronco neurais pode levar a doenças degenerativas neurais (Liu e Martin, 2006).

Segundo Pelicci (2004), os fatores intrínsecos, como a disfunção da telomerase e o estresse oxidativo, e/ou fatores extrínsecos, como a radiação γ e a luz ultravioleta, podem induzir danos no DNA. Uma vez presentes no DNA, estes danos ativam as vias de controle do ciclo celular mediadas pelas

proteínas supressoras tumorais p53 e p16-pRb que, por sua vez, encaminham a célula à apoptose ou à senescência celular. Por exemplo, se os danos ocorrerem nas células-tronco a ponto de alterarem a homeostase do tecido e a sua capacidade de renovação, esses mesmos danos poderão contribuir para o processo de envelhecimento a médio e a longo prazo. Por outro lado, se estas alterações no DNA levarem à inativação de genes supressores tumorais isto poderá resultar, como conseqüência, no desenvolvimento de um processo tumoral (Figura 2) (Pelicci, 2004). Para uma completa homeostase do organismo e para a inibição dos processos tumorais é importante que as células-tronco mantenham o controle do seu ciclo celular e que ativem os mecanismos de reparação do DNA quando forem necessários.

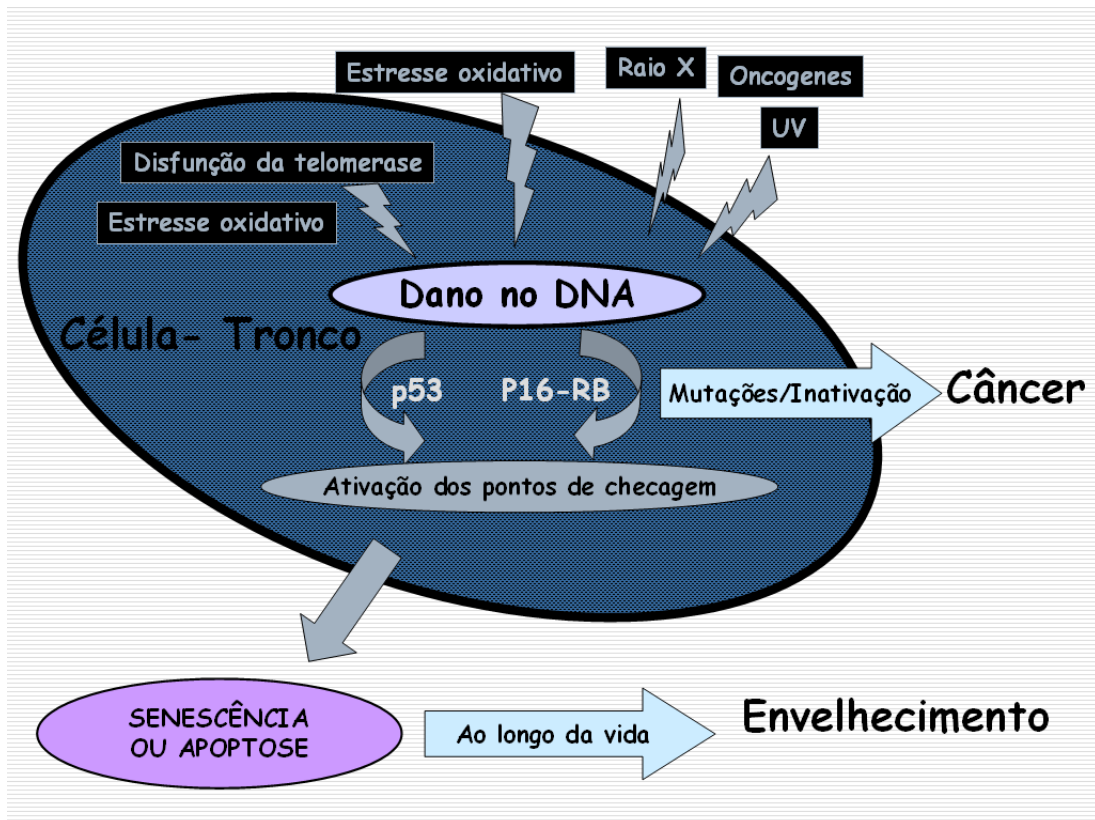


Figura 2: Causas e conseqüências de danos no DNA (adaptado de Pelicci, 2004).

Desta maneira, as células mantêm um delicado balanço entre a proliferação e a apoptose. A longevidade destas células é dependente de um cuidadoso controle da expressão de vários genes envolvidos na proliferação, no controle do ciclo celular e na diferenciação. Algumas anormalidades genéticas humanas associadas ao envelhecimento apontam que a perda da reparação do DNA contribui para o processo de envelhecimento. Neste sentido, a manutenção do genoma das células-tronco pelos mecanismos de reparação de DNA é fundamental para a prevenção do envelhecimento e de patologias. Além disso, a deficiência na manutenção do genoma é um

importante fator que leva à proliferação desordenada ou induz à senescência e/ou apoptose celular (Sethe et al., 2006; Kenyon e Gerson, 2007).

2. Células-tronco adultas e seu papel na medicina regenerativa

Os avanços recentes no conhecimento da biologia das células-tronco têm contribuído para o uso das mesmas no tratamento de diversas desordens teciduais (Korbling e Estrov, 2003; Haas et al., 2005; Bobis et al., 2006; Mimeault et al., 2007). A área da ciência, baseada no uso de células-tronco para o tratamento de doenças, é conhecida como Medicina Regenerativa (Fodor, 2003). A terapia com células-tronco adultas está baseada no transplante autólogo ou alogênico das células na forma de infusão sistêmica ou no local da lesão no paciente (Barry e Murphy, 2004). Do ponto de vista terapêutico, os diferentes tipos e a origem das células-tronco apresentam vantagens e desvantagens intrínsecas e que devem ser consideradas na sua aplicação na regeneração dos tecidos lesados ou para a engenharia de tecidos (Trounson, 2009).

As células-tronco adultas mais estudadas na medicina regenerativa são as derivadas da medula óssea, principalmente por serem usadas há vários anos para o tratamento de doenças hematológicas (Pittenger et al., 1999; Tuan et al., 2003; Tohill e Terenghi, 2004). A medula óssea era a única fonte de células-tronco adultas humanas e serviam como protótipo de células-tronco adultas. As características que definem as células-tronco,

como a expressão de proteínas de superfície, a capacidade de diferenciação e de auto renovação foram definidas, primeiramente, nos estudos com células-tronco hematopoiéticas (Kondo et al., 2003). A medula óssea apresenta também células progenitoras estromais, atualmente denominadas como células-tronco mesenquimais (MSCs), as quais apresentam habilidade de diferenciarem-se em múltiplas linhagens celulares como adipócitos, condrócitos, células tronco hematopoiéticas, miócitos, células neurais e osteoblastos, entre outros tipos (Gimble e Nuttall, 2004; Caplan, 2007; da Silva Meirelles et al., 2008; Garcia-Castro et al., 2008). Atualmente, as evidências apontam a existência de células-tronco em quase todos os tecidos adultos (da Silva Meirelles et al., 2006).

O tecido adiposo representa uma fonte alternativa de células-tronco adultas. Os depósitos subcutâneos de tecido adiposo são acessíveis, abundantes, reabastecíveis e, em função disso, representam um potencial reservatório de células-tronco adultas em cada indivíduo. Estas células são vistas como uma fonte bastante promissora de células-tronco para uso clínico devido à facilidade de obtenção e o baixo risco para o paciente (Parker e Katz, 2006).

Uma variedade de termos foi utilizada para designar as células-tronco presentes no tecido adiposo (revisado na tabela 1 do Capítulo 1). O termo utilizado neste trabalho será células “tronco derivadas do tecido adiposo” (*adipose derived adult stem - ADAS*). A preparação e isolamento das células ADAS não é idêntica em todos os laboratórios. A maioria dos grupos de pesquisas isola as células por meio da digestão com colagenase seguido do

fracionamento das células com algumas centrifugações. As células isoladas após a centrifugação são colocadas em cultura e a população de células aderidas podem ser expandidas e usadas para os diversos experimentos (Figura 3) (Mitchell et al., 2006). Para maiores detalhes sobre as variações no isolamento das ADAS veja o item 3- *Applied methods of ADAS isolation* do Capítulo 1.

Vários grupos independentes demonstraram que as células ADAS são capazes de diferenciarem-se em uma variedade de linhagens teciduais como: adiposa, cardíaca, condrocítica, endotelial, epitelial, hematopoiética, muscular, óssea e neuronal (Safford et al., 2002; Zuk et al., 2002; Safford e Rice, 2005; Gimble et al., 2007) (revisado na tabela 2 do Capítulo 1 dessa tese).

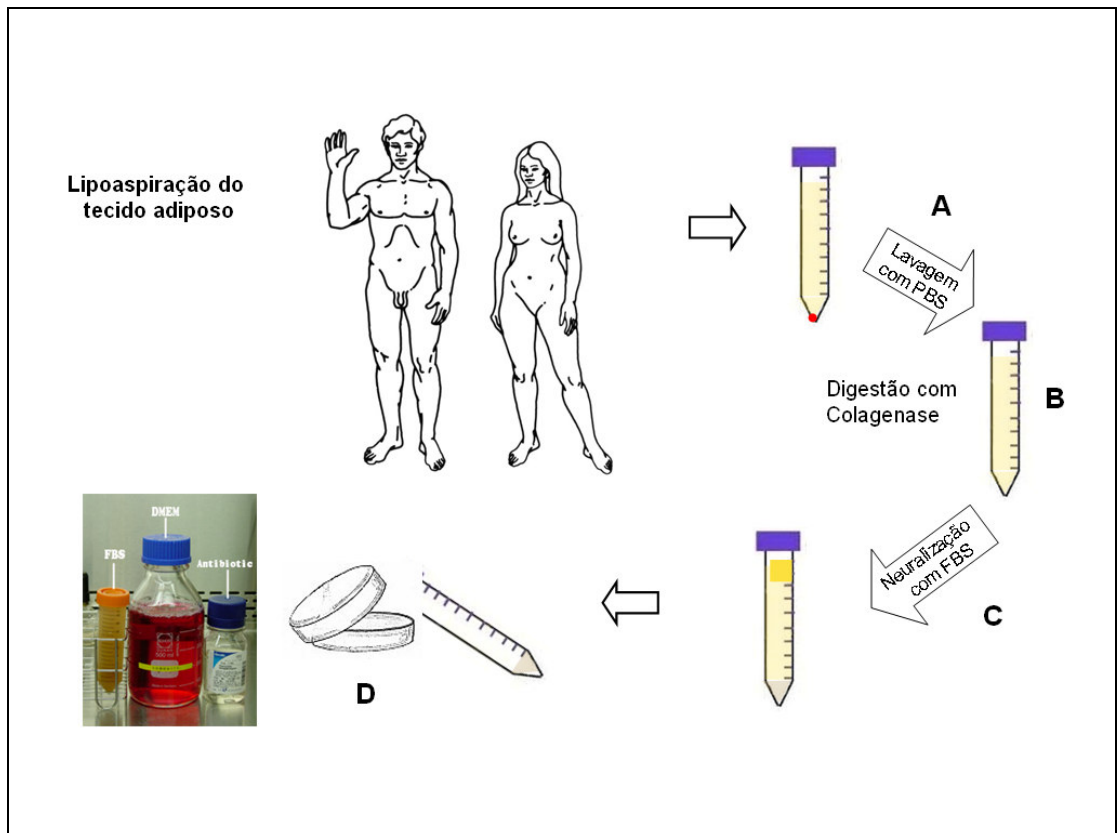


Figure 3- Diagrama apresentando o método de isolamento das células ADAS (A) O lipoaspirado é lavado com PBS (*phosphate-buffered saline*) para remover a contaminação com hemácias e fragmentos de tecidos. (B) A matriz extracelular é digerida com colagenase. (C) A enzima é neutralizada com 10% de soro fetal bovino (*fetal bovine serum-FBS*) e as células são centrifugadas. (D) O precipitado resultante das centrifugações é ressuspenso com meio de cultura completo [*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* com FBS, com antibiótico].

Ao considerar os benefícios e a facilidade de obtenção das células ADAS, o estudo da diferenciação de células-tronco adultas para o tecido neural é necessário levando-se em conta as inúmeras neuropatologias que afligem a população, tais como as doenças de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington, o acidente vascular encefálico, a dor neuropática crônica e a lesão da medula espinhal. Neste sentido, muitas pesquisas estão sendo atualmente realizadas para possibilitar o tratamento destas condições neuropatológicas por meio do transplante de células-tronco adultas. (Zuk et al., 2002; Lepski, 2007; Park et al., 2008; Sanchez-Ramos et al., 2008). Somando-se a estas questões, torna-se fundamental verificar e entender o processo de diferenciação destas células.

3. Métodos de diferenciação neural *in vitro* das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADAS)

A maioria dos estudos sobre o processo de diferenciação neural das células ADAS foram baseados, principalmente, em dois trabalhos publicados no ano de 2000, que diferenciaram as células derivadas da medula óssea

para tecido neural (Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2008). Detalhes sobre os métodos de indução destes dois trabalhos são apresentados no item 5- *How ADAS cells differentiate into neuronal cells* e na Tabela 4 do Capítulo 1. Subseqüente aos estudos de Sanchez-Ramos et al. e Woodbury et al. em 2000, vários estudos com células ADAS humanas ou de camundongos foram publicados utilizando os mesmos métodos ou variações dos mesmos, dos quais podem ser citados os de (Safford et al., 2002; Zuk et al., 2002; Ashjian et al., 2003; Tholpady et al., 2003; Safford et al., 2004; Krampera et al., 2007). Para maiores detalhes sobre os métodos de diferenciação das células ADAS humanas para tecido neural são apresentados no item 6- *Induction of adipose-derived adult stem cells* e na tabela 4 do Capítulo 1.

A fim de verificar se o processo de diferenciação foi efetivo a maioria das pesquisas observa alterações na morfologia das células por meio de microscopia óptica ou eletrônica e a expressão de alguns marcadores neurais. Nos trabalhos analisados, a presença dos marcadores neurais costuma ser verificado por imunocitoquímica ou *western blotting* para detectar as proteínas específicas e/ou por RT-PCR para os respectivos mRNAs. Na tabela 3 do Capítulo 1 foram apresentados os principais marcadores neurais com algumas informações relevantes sobre os mesmos.

As alterações morfológicas e a expressão de marcadores neurais representam alterações fenotípicas das células. No entanto, estes mesmos não são suficientes para confirmar a funcionalidade de um neurônio (Lu e Tuszynski, 2005). O fator mais importante para definir um neurônio funcional

é sua excitabilidade, a habilidade de ativar o potencial de ação e a capacidade de comunicar-se com outras células pela liberação de neurotransmissores nas sinapses (Kandel et al., 2000). Alguns estudos demonstraram a formação de neurônios maduros e funcionais *in vitro* a partir de células-tronco embrionárias (Okabe et al., 1996; Miles et al., 2004) e células-tronco adultas neurais (Song et al., 2002; Westerlund et al., 2003). Em relação às células-tronco do tecido adiposo, nenhum estudo conseguiu provar a funcionalidade das células neurais induzidas *in vitro* (Lu e Tuszynski, 2005). Para maiores detalhes dos estudos sobre a funcionalidade das células neurais induzidas *in vitro*, veja item 7- *How to confirm differentiation into functional neurons* no Capítulo 1.

4. A manutenção da integridade genômica durante o processo de diferenciação das células-tronco para tecido neural

As células eucarióticas, de uma maneira geral, são constantemente desafiadas pelo ambiente que as rodeia. O DNA dessas células costuma sofrer danos endógenos e exógenos continuamente. As chamadas vias de reparação de DNA são capazes de reconhecer um dano e removê-lo a fim de prevenir as consequências deletérias deste dano no DNA (Peterson e Cote, 2004; Sancar et al., 2004; Houtgraaf et al., 2006; Shrivastav et al., 2008; Pardo et al., 2009). No caso de danos no DNA que não são reparados, a célula conta com uma complexa via de sinalização que induz a

senescência ou a apoptose. Essas vias são induzidas quando a morte celular é mais adequada do que a proliferação da célula lesada. Assim, os defeitos na reparação do DNA, na apoptose ou na senescência estão envolvidos com o câncer e com o envelhecimento (von Zglinicki et al., 2001; Costa et al., 2003; Andressoo et al., 2006; Wilson e Bohr, 2007).

A frequência de mutação em alguns locos de células somáticas de mamíferos *in vivo* costuma ser na ordem de 10^{-4} mutações (Frosina, 2009). Esse alto nível de danos no DNA é claramente insustentável em células-tronco embrionárias que participarão do desenvolvimento do organismo e o estabelecimento de padrões corporais. Neste sentido, as células-tronco embrionárias são geneticamente menos suscetível à danos no DNA (Efroni et al., 2008), onde as frequências de mutações e de recombinação mitótica são em torno de 100 vezes menores quando comparadas com as células adultas somáticas ou com fibroblastos embrionários de camundongos isogênicos (Hong et al., 2007). Assim, as células-tronco embrionárias devem ser equipadas com mecanismos de defesa altamente eficientes contra vários tipos de estresse, incluindo danos no DNA (Maynard et al., 2008).

As células-tronco adultas são extremamente importantes para a manutenção dos tecidos ao longo da vida. Estas regeneram os tecidos lesados e substituem células senescentes por células novas (Kenyon e Gerson, 2007). O estresse oxidativo, a toxicidade de sub-produtos da atividade metabólica, a redução da função mitocondrial e os agentes externos levam a formação de danos no DNA por modificação de bases, erro na incorporação de fragmentos de desoxiribose, indução de fosfotriesteres,

quebra simples e duplas do DNA (Park e Gerson, 2005). Devido ao papel das células-tronco adultas na manutenção dos tecidos, acredita-se que essas células apresentem mecanismos de reparação do DNA diferenciados das demais células do organismo adulto. No artigo de revisão de Frosina et al. (2009) foi comparada a capacidade de reparação de DNA em células-tronco normais (embrionárias ou adultas humanas ou de camundongos) com células diferenciadas. Em 64% dos artigos foi observado um aumento da capacidade de reparação do DNA, mostrando que as células-tronco protegem seu genoma por meio do aumento da reparação no DNA. Da mesma forma, as células-tronco podem reduzir a taxa de proliferação e aumentar a atividade de proteínas envolvidas nos pontos de checagem (Frosina, 2009).

A importância da manutenção da integridade genômica na neurogênese é claramente ilustrada nas desordens neurológicas, relacionadas a pacientes com doenças hereditárias associadas a defeitos nos mecanismos de reparação do DNA. Entre as síndromes hereditárias relacionadas com os mecanismos de reparação do DNA podemos citar a xeroderma pigmentosa (XP), a síndrome de Cockayne (CS), a ataxia telangiectasia (AT) e a desordem semelhante a ataxia telangiectasia (ATLD) (Brooks, 2002).

Durante a neurogênese, os precursores neurais se dividem e geram neurônios novos. Alguns destes neurônios sofrem apoptose, o que é fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso central adulto. No entanto, as células progenitoras neurais e neurônios maduros que estão próximos a célula que sofreu apoptose continuam vivos (Cheng et al., 2007).

Não se sabe por que esses neurônios jovens são hipersensíveis à apoptose, mas tem sido sugerido que danos no DNA e/ou sinalização relacionada com o ciclo celular estejam envolvidos (Herrup et al., 2004; Kruman et al., 2004b).

Achados recentes sugerem que a telomerase e a proteína associada aos telômeros (TRF2) apresentem um importante papel na neurogênese. As células-tronco neurais em proliferação apresentam altos níveis de telomerase para manterem os telômeros e promoverem a sobrevivência celular. Os níveis de telomerase diminuem rapidamente logo após a diferenciação do sistema nervoso central, o que contribui para a vulnerabilidade dos neurônios recém formados à apoptose (Mattson et al., 2001; Zhang et al., 2007). A TRF2 parece ter um papel importante nas células-tronco neurais e em neurônios pós-mitóticos na presença de danos no DNA, em regiões não teloméricas. Existem ligações importantes entre as proteínas associadas aos telômeros e os mecanismos de reparação do DNA, mais notavelmente pela via de sinalização da proteína ATM (Kang et al., 2004; Zhang et al., 2007).

De forma controversa à manutenção da integridade genômica, estudos recentes têm demonstrado que o cérebro é um complexo mosaico genético de células aneoplóides e euplóides (Yang et al., 2003; Yurov et al., 2005; Kingsbury et al., 2006). A função precisa da aneuploidia neural e desse mosaico é desconhecida. Entretanto, acredita-se que a aneuploidia neural esteja envolvida com a diversidade celular, sinalização celular e com doenças no sistema nervoso central (Kingsbury et al., 2006).

5. Proteínas envolvidas na sinalização dos danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular

ATM e ATR

Os danos no DNA são causados por uma mistura de efeitos deletérios endógenos e exógenos. Quando a célula percebe a ocorrência dos danos no DNA, as proteínas sensoras sinalizam e levam a uma parada do ciclo celular. A família das fosfatidilinositol 3-cinases (PI3K) é formada por proteínas evolutivamente conservadas e que respondem a inúmeros estresses celulares por meio da fosforilação de proteínas chaves. Essas proteínas são conhecidas como proteínas sensoras de danos no DNA, cujos principais representantes são a proteína mutada para a ataxia telangiectasia (ATM), a proteína relacionada à ATM (ATR) e a subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKs (Garner e Costanzo, 2009). Essas proteínas são “sensoras” de tipos específicos de danos no DNA. A proteína ATM é considerada a primeira sensora de quebras duplas no DNA (DSB), enquanto que a proteína ATR é predominantemente ativada em regiões de fita simples de DNA (ssDNA; Figura 4) (Abraham, 2001). Estudos com ATM e ATR foram recentemente revisados em; (Lee e Paull, 2007; Cimprich e Cortez, 2008).

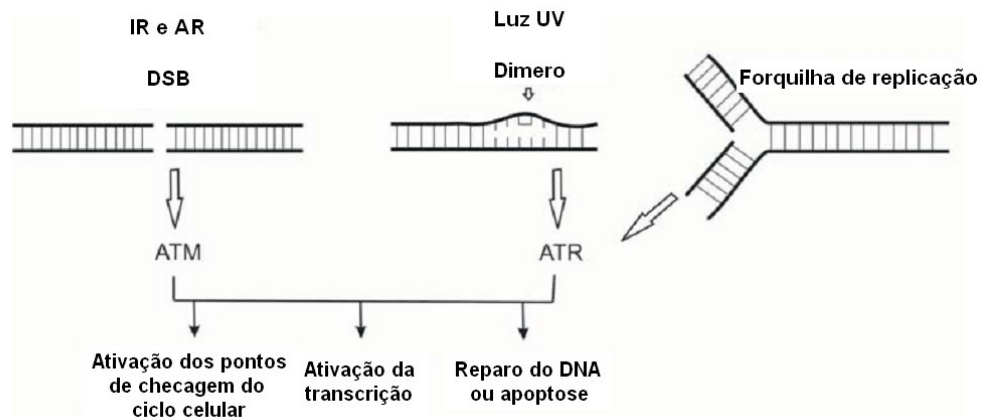


Figura 4- Agentes causadores de danos no DNA e a resposta celular aos danos. As quebras duplas do DNA (DSB) são induzidas por irradiação (IR) e agentes radiomiméticos (AR) que levam a ativação da cinase ATM. A cinase ATR é ativada por dímeros de pirimidina formados pela exposição à radiação UV ou no local de instalação da forquilha de replicação. Essas cinases fosforilam várias proteínas, as quais sinalizam a presença de danos no DNA, param o ciclo celular, alteram a transcrição, iniciam o reparação do DNA e se o dano não puder ser reparado, ativam a apoptose. (Adaptado de (Czornak et al., 2008))

As análises proteômicas recentes dos componentes da maquinaria de reparação do DNA revelaram a presença de uma enorme rede de comunicação com mais de 700 proteínas envolvidas (Matsuoka et al., 2007). Todas essas proteínas são fosforiladas por ATM e ATR em resposta aos danos no DNA. As proteínas substrato das cinases ATM e ATR estão envolvidas no metabolismo dos ácidos nucleicos e proteínas, regulação do ciclo celular, sinais de transdução, estrutura e proliferação celular e oncogênese (Czornak et al., 2008).

A proteína cinase nuclear ATM é uma ativadora massiva da resposta às DSBs (Shiloh, 2003; Biton et al., 2006; Shiloh, 2006). ATM gerencia a sinalização de uma rede de comunicação envolvida nos mecanismos de reparação do DNA, pontos de checagem do ciclo celular, mecanismos apoptóticos e várias outras respostas ao estresse que levam a célula ao reparo e sobrevivência ou a apoptose (Biton et al., 2006). Após a indução da quebra dupla do DNA, a proteína ATM é ativada e fosforila uma vasta quantidade de proteínas alvos. Cada uma dessas proteínas alvos modula um ou mais mecanismos de resposta (Shiloh, 2006). A ATM também atua na manutenção da estabilidade genômica eucariótica e os dados experimentais têm indicado que a ATM está funcionalmente ligada à conservação do tamanho e da integridade dos telômeros, um processo que é crucial para diminuir o envelhecimento celular e para bloquear o surgimento de tumores (Pandita, 2001; Chan e Blackburn, 2002; Kim Sh et al., 2002; Maser e DePinho, 2002)

A perda ou a inativação da ATM leva à síndrome denominada de ataxia telangiectasia, resultando em um aumento na instabilidade genômica. Essa síndrome é caracterizada por degeneração neuronal, imunodeficiência, instabilidade genética, sensibilidade à radiação ionizante e predisposição ao câncer (Taylor e Byrd, 2005). Uma das principais características da ataxia telangiectasia é uma progressiva perda motora que culmina em uma disfunção neurológica global (Allen et al., 2001). Inicialmente, há uma atrofia cortical do cerebelo que, posteriormente, afeta todas as áreas do cérebro (Taylor e Byrd, 2005). Por estas características, a ATM parece ser importante para a neurogênese e estudos demonstraram que a ATM e a

proteína p53 são necessárias para o desenvolvimento do sistema nervoso (Herzog et al., 1998; Chong et al., 2000; Lee et al., 2000). Além disso, Allen *et al.* (2001) mostraram que a perda de ATM em células-tronco progenitoras de neurônios resultava em instabilidades genômicas, apoptose ou proliferação anormal. Por outro lado, dados mais recentes indicaram que a diminuição da expressão de ATM pela tecnologia de RNA interferente em células-tronco embrionárias humanas (Biton et al., 2007) e em células de neuroblastoma (Biton et al., 2006) não afetam a diferenciação neural (Biton et al., 2007). Esses novos resultados sugerem que ATM não apresenta um papel crítico na diferenciação neural.

O mecanismo de ATR é ativado a partir da formação e reconhecimento de prolongamentos estendidos de fitas simples do DNA na forquilha de replicação (Jazayeri et al., 2006; Chanoux et al., 2009). A função de ATR na manutenção do genoma foi primeiramente indicada pelo aumento de quebras na cromatina em cultura de células deficientes em ATR (Brown e Baltimore, 2000). ATR é um gene essencial tanto em humanos como em camundongos (Brown e Baltimore, 2000; Cimprich e Cortez, 2008). A Síndrome de Seckel, doença humana caracterizada por retardo no desenvolvimento e crescimento, tem sido associada a mutações no gene da ATR. As células derivadas de pacientes com a Síndrome de Seckel apresentam baixa expressão de ATR, além de defeitos na sinalização mediada por ATR (Alderton et al., 2004). A completa ausência de ATR é letal e, neste sentido, a ATR é importantíssima na regulação da resposta ao estresse replicativo, à irradiação UV e também às ssDNA geradas na forquilha de replicação (Abraham, 2001; Shiloh, 2001; Shiloh, 2003). Além

disso, a ATR é necessária para prevenir a condensação prematura da cromatina quando existem danos no DNA (Shiloh, 2003).

A função da ATR no processo de diferenciação de células-tronco para tecido neural não é conhecida, mas levando-se em conta a função da ATR na reparação de DNA e na manutenção da cromatina durante a replicação de DNA, é esperado que essa proteína também possua uma função importante na diferenciação.

Proteínas Remodeladoras de Cromatina e a Histona H2AX

Além da complexidade bioquímica das proteínas que atuam nos mecanismos de sinalização e reparação de DNA, é preciso também considerar a estrutura da cromatina eucariótica. A cromatina eucariótica é uma estrutura altamente ordenada, formada por proteínas histônicas e não-histônicas condensadas ao DNA (Allard et al., 2004). Desta maneira, a cromatina necessita sofrer modificações para que a maquinaria de reparação de DNA tenha acesso às lesões (Allard et al., 2004). Estas modificações ou “remodelagens” da cromatina são realizadas por dois mecanismos: (i) modificação pós-traducionais das histonas nucleossomais (Peterson, 2002; Koundrioukoff et al., 2004) e (ii) uso da energia liberada pela hidrólise do ATP para alterar a estrutura da cromatina (Turner, 2002; Escargueil et al., 2008).

Foi demonstrado em células de mamíferos que um subtipo específico de histona H2A, conhecida como H2AX, se torna especialmente fosforilada na Ser 139 (γ -H2AX) em resposta as DSB (Rogakou et al., 1998). Mais

tarde, observações similares foram reportadas em leveduras (Downs et al., 2000). Seguindo dessas publicações, vários trabalhos tem focado no estudo do papel da H2AX na reparação do DNA. Esta modificação específica, embora não necessária nos passos iniciais do processo de reparação, é necessária para concentrar a maquinaria de reparação ao longo da lesão no DNA (Celeste et al., 2003), e recrutar modificadores de cromatina que permitam o relaxamento da estrutura da mesma perto da lesão do DNA (Downs et al., 2004). Recentemente, foi reportado, em leveduras, que a substituição do resíduo de serina fosforilada por um ácido glutâmico, o qual mimetiza a fosforilação de H2A, não induz modificações significativas na estrutura da cromatina. Este achado sugere que a H2A fosforilada atua, principalmente, recrutando os componentes de reparação de DSB antes de alterações na estrutura da cromatina (Fink et al., 2007).

A histona H2AX pode ser fosforilada pelas proteínas ATM e ATR (Allard et al., 2004; Stiff et al., 2004) originando a histona γ -H2AX. A γ -H2AX ativa uma cascata de cinases também pertencentes à família das PIKK e que rapidamente coordenarão os eventos de reparação de DNA, bem como induzirão à parada do ciclo celular (Zhou e Elledge, 2000; Rouse e Jackson, 2002; Escargueil et al., 2008). A γ -H2AX, conhecida por ser um marcador de DSB, é capaz de recrutar vários fatores de reparação de DNA ao redor da lesão, tais como o complexo MRN (MRE11/ RAD50/ NBN), e as proteínas BRCA1 e RAD51 (Paull et al., 2000; Escargueil et al., 2008).

Em função do importantíssimo papel da H2AX na sinalização das DSB e na manutenção da integridade genômica, as células deficientes em

H2AX mostram um aumento na sensibilidade à radiação ionizante bem como à instabilidades genômicas (Bassing et al., 2002).

A ativação da γ -H2AX durante o processo de diferenciação de células-tronco para tecido neural é praticamente desconhecido. Contudo, vários dados recentes têm demonstrado que a γ -H2AX é necessária juntamente com as proteínas ATM e DNA-PKcs para a manutenção da estabilidade genômica (Stiff et al., 2004; Czornak et al., 2008; Chanoux et al., 2009).

Os complexos HATs e a proteína TIP60

A reorganização ou remodelagem da cromatina eucariótica é necessária para diferentes processos metabólicos relacionados ao DNA, sendo que tanto a acetilação quanto a desacetilação de histonas tem sido relacionadas a estes processos. Embora os mecanismos moleculares relacionados a acetilação/desacetilação de histonas ainda não estejam completamente conhecidos, é sabido que a transcrição, a replicação, a recombinação e a reparação do DNA são dependentes da modificação estrutural da cromatina induzidas por complexos protéicos denominados histonas acetiltransferases (HATs) (Davie e Spencer, 1999; Kouzarides, 1999; Cheung et al., 2000; Sterner e Berger, 2000; Strahl e Allis, 2000; Wolffe, 2000; Sapountzi et al., 2006).

As HATs constituem um grupo variado de proteínas que atuam na acetilação de histonas. Dentre as principais famílias de proteínas HATs atualmente conhecidas destaca-se a MYST, que compreende as proteínas

humanas MOZ (Borrow et al., 1996), MORF(Champagne et al., 1999), TIP60 (Yamamoto e Horikoshi, 1997) e HBO1 (Iizuka e Stillman, 1999), assim como as proteínas de *Drosophila* MOF (Smith et al., 2000) e de *Saccharomyces cerevisiae* Sas2p (Reifsnyder et al., 1996), Sas3p (Takechi e Nakayama, 1999; John et al., 2000) e Esa1p (Smith et al., 1998) revisado em (Voss e Thomas, 2009). As proteínas da família MYST possuem um alto grau de similaridade entre si, destacando-se a presença de regiões conservadas do tipo dedos-de-zinco e sítios de ligação à acetil-coenzima A (acetil-CoA).

A proteína TIP60 (do inglês *Tat-interactive protein-60 kDa protein*) foi primeiramente identificada no complexo protéico Tat do retrovírus HIV-1 (Kamine et al., 1996). Posteriormente, mostrou-se que a TIP60 possui atividade do tipo HAT (Kamine et al., 1996), sendo a principal proteína de um complexo formado por vários polipeptídeos e que possui diversas atividades biológicas, tais como reparação do DNA, sinalização celular, ciclo celular, controle dos pontos de checagem e apoptose (Sapountzi et al., 2006). Entre essas funções, Tip60 apresenta um papel especial na reparação de DSB (Voss e Thomas, 2009)

Os embriões de camundongos com mutações em *TIP60* não são viáveis, pois morrem antes da implantação (Gorrini et al., 2007). Contudo, o tipo de morte celular ainda não foi descrito.

Foi demonstrado que o complexo TIP60 é capaz de interagir com receptores de andrógenos e é um co-ativador de receptores de esteróides, os quais possuem um papel-chave na transdiferenciação celular (Gaughan

et al., 2001). Durante o desenvolvimento do coração de galinhas, a TIP60 apresentou um aumento de expressão nos estágios iniciais de diferenciação celular, diminuindo nos estágios mais tardios (Lough, 2002). Em *Caenorhabditis elegans*, a TIP60 evita a parada do ciclo celular e o processo de diferenciação, pré-requisito necessários para a proliferação continuada (Ceol e Horvitz, 2004). Em estudo recente, utilizando a tecnologia de RNA interferente em células-tronco embrionárias de camundongos, foi demonstrado que a Tip60 é necessária para a diferenciação das células-tronco. Para complementar, uma vasta análise da expressão gênica revelou que na ausência de Tip60, vários genes importantes na diferenciação são suprimidos (Fazzio et al., 2008). Dessa forma, acredita-se que a proteína TIP60 é necessária para a pluripotencialidade das células-tronco embrionárias. Estes resultados suportam a hipótese de que a TIP60 poderia exercer uma função importante durante a proliferação e a diferenciação de células-tronco (Voss e Thomas, 2009).

TRRAP

A proteína TRRAP (*Transactivation/transformation-domain associated protein*), assim como o ortólogo de leveduras Trap1p, foram identificadas como subunidades protéicas formadoras de diferentes complexos HATs, tais como o PCAF/SAGA, a TIP60/NuA4, o TFTC, a SILK e a SLIK (Herceg et al., 2003). Vários fatores de transcrição interagem com os complexos TRRAP/ HAT e são regulados ou mediados pela atividade de TRRAP na modificação da cromatina (Yanagisawa et al., 2002; Cheng et al., 2006;

Sierra et al., 2006). Entre eles, foi demonstrado que a interação entre a oncoproteína c-Myc e o complexo TRRAP/HAT é necessário para a atividade da transcrição e transformação (Bouchard et al., 2001). As proteínas c-Myc e N-Myc regulam uma variedade de genes envolvidos no controle da proliferação e morte (Wilson et al., 2004; Laurenti et al., 2008).

A ausência do gene *TRRAP* em células de mamíferos é letal, resultando na inviabilidade do embrião, devido ao bloqueio da proliferação dos blastocistos (Herceg et al., 2001). A deficiência de *TRRAP* parece afetar vários genes relacionados ao ciclo celular, à transcrição, à reparação de DNA e à supressão de tumores (Herceg et al., 2003). Vários resultados têm demonstrado que a TRRAP controla os mecanismos dos pontos de checagem durante a transição da fase G₂ para a M, cuja ausência resulta em instabilidades cromossômicas (Herceg et al., 2001). Além disso, estudo utilizando a tecnologia de RNA interferente em células-tronco embrionárias de camundongos revelaram que o complexo Tip60/HAT é necessário para a manutenção da identidade das células tronco embrionárias (Fazzio et al., 2008).

Loizou et al. (2009) desenvolveram camundongos *knockout* que permitem a inativação do gene *TRRAP* de maneira temporal *in vivo*. Com essa tecnologia foi possível estudar a função de TRRAP/HAT e a acetilação de histonas em camundongos adultos e em células-tronco adultas. Este estudo revelou que TRRAP apresenta um papel fundamental no mecanismo de manutenção das células-tronco hematopoiéticas e no sistema hematopoiético. Além disso, foi evidenciado a importância de TRRAP e das

modificações nas histonas para a homeostasia dos tecidos (Loizou et al., 2009). O papel das HAT e da acetilação das histonas na manutenção de padrões distintos de cromatina exclusivos para as propriedades das células-tronco, permanecem desconhecidos (Shukla et al., 2008).

A Família MCM

O complexo de manutenção de minicromossomos (*minichromosome maintenance*; MCM) é formado por seis proteínas relacionadas (MCM 2-7) que atuam como helicases replicativas, tendo um papel fundamental na estabilidade genômica durante a replicação do DNA (Labib e Diffley, 2001; Maiorano et al., 2006). As proteínas MCM são necessárias para a processividade da replicação do DNA e são alvos de pontos de checagem da fase S. A perda da função das MCM leva a danos no DNA e à instabilidade genômica.

A expressão das MCM está aumentada em células proliferativas, sendo um marcador de células cancerosas ou de células com potencial de se tornarem malignas. O papel do complexo MCM na integridade genômica mostra atividade tanto na forquilha de replicação ativa como distante da forquilha (Bailis e Forsburg, 2004). As proteínas MCM são expressas em células que estão se dividindo, porém apresentam expressão diminuída e estão dissociadas da cromatina em células em repouso (Madine et al., 2000). Um dos maiores mecanismos pelo qual as proteínas MCM promovem a estabilidade genômica é por limitar a replicação do DNA a uma vez por ciclo (Bell e Dutta, 2002). Esse papel fundamental torna as proteínas MCMs

alvos potenciais de oncogenes celulares, os quais inibem ou desregulam o processo de replicação. A disfunção da MCM pode contribuir para proliferação celular anormal acompanhada de uma instabilidade genômica. Os defeitos na síntese de DNA e aumento dos níveis de proliferação celular em tumores estão associados ao aumento da expressão da cinase de MCM Cdc7/Dbf4 e das proteínas MCM (Hess et al., 1998; Freeman et al., 1999; Kumagai et al., 1999; Shohet et al., 2002).

As proteínas MCM são altamente expressas, não somente em células em replicação ativa, mas também em células com potencial de proliferação. Testes diagnósticos recentes apontam uma forte correlação entre células pré-cancerosas e células que expressam altos níveis das proteínas MCMs (Williams et al., 1998; Tan et al., 2001; Sirieix et al., 2003). As proteínas MCM são, contudo, marcadores moleculares sensíveis de células que têm a capacidade para proliferar, e assim podem ser usadas para identificar células pré-cancerosas antes que elas se tornem malignas (Bailis e Forsburg, 2004).

A proteína MCM2, como os outros membros da mesma família, também tem demonstrado ser um marcador de células proliferativas. Em megacariócitos, a expressão de MCM2 é maior do que a expressão do marcador proliferativo Ki-67 (Lampert et al., 2005). Em câncer renal, a MCM2 tem utilidade clínica como marcador prognóstico (Rodins et al., 2002). Um estudo realizado para verificar a expressão de MCM2 em câncer colorretal apresentou correlação entre alta expressão de MCM2 e a presença de metástases em linfonodos (Guzinska-Ustymowicz et al., 2008).

A MCM-2 é fosforilada pela ATR e outras proteínas da família PI3K, em resposta às múltiplas formas de danos no DNA e às ssDNAs geradas na forquilha de replicação (Cortez et al., 2004).

Telomerase

Os telômeros são regiões altamente repetitivas de DNA que se encontram na extremidade dos cromossomos. As repetições teloméricas das células somáticas humanas agem como um "relógio celular", pois diminuem com as divisões. Assim, quanto mais vezes uma linhagem celular se divide, mais os telômeros encurtam, até que atinjam um tamanho mínimo que limita as novas divisões celulares. Isso ocorre porque o DNA não pode mais ser duplicado corretamente nas extremidades da molécula de DNA. Este encurtamento promove a ativação de uma ribonucleo-proteína chamada telomerase, que adiciona novas repetições teloméricas nas extremidades cromossômicas (Blackburn, 1991; Blackburn, 2001). Em humanos, este processo é normalmente ativado somente em linhagens germinativas e em embriões nos estágios iniciais do desenvolvimento. Quando a telomerase está ativa em células somáticas, estas se tornam imortais. Por este motivo, a atividade da telomerase e o encurtamento do telômero têm sido estudados em diversos tipos de câncer, tendo valor prognóstico em muitos deles (Ju e Lenhard Rudolph, 2008).

Os telômeros nas células somáticas se encurtam pela falta de telomerase, desta forma limitando o número de divisões celulares pelas

quais as células podem passar. No entanto, em células germinativas e em células-tronco embrionárias, a elevada atividade da telomerase mantém a capacidade replicativa. A redução da atividade da enzima de linhagens em cultura está associada a uma diminuição dessa capacidade replicativa (Ju e Lenhard Rudolph, 2008). Por outro lado, o processo de “imortalização” de linhagens celulares é acompanhado do aumento da atividade da telomerase, e a transfecção do gene da *hTERT* em linhagens celulares epiteliais e fibroblastóides suprime a senescência (Wang et al., 1998), e prolonga a sobrevivência de células estromais da medula óssea murina em cultura (Mori et al., 2005).

A estabilidade dos telômeros é regulada por duas proteínas específicas ligadas aos telômeros, a TRF1 e a TRF2, as quais protegem os telômeros da degradação, recombinação homóloga e não-homóloga (de Lange, 2002). A inibição da ligação do TRF2 leva à instabilidade dos telômeros e dispara o gatilho de ativação da apoptose ou da senescência via ATM/p53. Além disso, mutações nas proteínas de reparação do DNA; DNA-PKcs, Ku70, Ku80, a ATM têm sido associadas à disfunção na estrutura dos telômeros (Hande et al., 2001; d'Adda di Fagagna et al., 2003).

Não é surpreendente que as mutações nos componentes da telomerase estejam associadas a doenças nas células-tronco, como na disqueratose congênita, uma doença rara caracterizada por falhas na medula óssea e anemia aplásica (Yamaguchi et al., 2003). As famílias com herança autossômica dominante para disqueratose congênita apresentam mutação no gene que codifica o componente de RNA da telomerase, *TERC*

(Yamaguchi et al., 2003). Nessas famílias, bem como em camundongos *Terc-/-*, a doença começa mais severa em gerações subseqüentes por causa do progressivo encurtamento dos telômeros (Park e Gerson, 2005).

Existe um consenso geral de que as células-tronco embrionárias apresentam altos níveis de telomerase para a manutenção do tamanho dos telômeros (Carpenter et al., 2004). No entanto, para as células-tronco adultas, os achados apresentam variações. Técnicas altamente sensíveis demonstraram baixos níveis de telomerase na maioria das células-tronco adultas, o que levaria a um encurtamento gradual dos telômeros durante a vida (Serakinci et al., 2008). A expressão de telomerase é cuidadosamente regulada de diversas formas nas células que necessitam da telomerase (Reddel e Bryan, 2003; Serakinci et al., 2008).

Os baixos níveis de telomerase e os telômeros relativamente curtos observados nas células-tronco adultas devem ser suficientes para uma proliferação “normal”. No entanto, várias situações patológicas podem levar a uma extensiva apoptose ou necrose em certas populações celulares, resultando em um período de proliferação mais intensa das células-tronco a fim de restabelecer o tecido lesado. Os baixos níveis de telomerase e o tamanho curto dos telômeros em células-tronco adultas, nesta situação, parecem ser inadequados. Entretanto, este pode ser considerado como um mecanismo de defesa contra o desenvolvimento de cânceres. Esta deve ser a razão para a existência de um cuidadoso balanço entre as necessidades de replicação e a expressão da telomerase em células-tronco adultas. Deve existir um mecanismo regulatório muito cuidadoso e rápido que, quando

necessário, é capaz de induzir a proliferação sem levar a perda extensiva dos telômeros ou levar ao aumento dos telômeros (Serakinci et al., 2008). Dessa forma, acredita-se que a telomerase tenha um papel fundamental na manutenção das células-tronco e possivelmente também no processo de diferenciação dessas células (Ju et al., 2007).

II-

OBJETIVOS

Objetivo geral

Esta tese tem como objetivo geral a análise da expressão de algumas proteínas e genes importantes para a sinalização dos danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular, durante o processo de diferenciação de células-tronco derivadas do tecido adiposo, especialmente na neurogênese, bem como a viabilidade e integridade celular durante este processo.

Objetivos específicos

- Revisar os dados da literatura sobre o processo de diferenciação de células-tronco do tecido adiposo humano em células neurais - “Estado da arte”
- Induzir o processo de diferenciação neural em células-tronco derivadas do tecido adiposo humano;
- Avaliar, utilizando ensaios de genotoxicidade, a integridade e viabilidade das células-tronco durante o processo de diferenciação;
- Analisar a expressão das proteínas ATM, ATR, TRRAP, TIP60, MCM e γ -H2AX por imunocitoquímica durante o processo de diferenciação de células-tronco na neurogênese;

- Analisar a expressão dos mRNAs de *ATM*, *ATR*, *TRRAP*, *TIP60* e *MCM* por qRT-PCR durante o processo de diferenciação de células-tronco na neurogênese;
- Avaliar a expressão da telomerase nas células-tronco e nas células diferenciadas;
- Relacionar os níveis de expressão das proteínas de reparação do DNA, de remodelagem da cromatina e de proliferação celular ao processo de diferenciação para tecido neural;
- Comparar a viabilidade e a integridade celular com a expressão das proteínas estudadas.

III-

CAPÍTULO 1

Artigo: “*Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work?*”

A necessidade de entender como ocorre o processo de diferenciação resultou no desenvolvimento de um artigo de revisão, que foi publicado em 2009 no periódico científico *Differentiation*. Neste artigo de revisão são abordados aspectos relevantes sobre as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADAS), sobre o processo de isolamento das mesmas, os principais marcadores neurais utilizados para confirmar a diferenciação, meios de indução da diferenciação para tecido neural, como confirmar se a indução levou a formação de neurônios funcionais e finalizando com um panorama geral sobre as principais implicações dos estudos de diferenciação das células ADAS para tecido neural

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

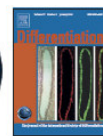
<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Differentiation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diff



Review

Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: Does it work?

Ana Paula Franco Lambert^a, Aline Fraga Zandonai^a, Diego Bonatto^b, Denise Cantarelli Machado^c, João Antônio Pêgas Henriques^{a,b,d,*}

^a Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS 91507-970, Brazil

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Departamento de Medicina Interna/Faculdade de Medicina, Centro de Terapia Celular-Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 September 2008
Received in revised form
3 October 2008
Accepted 9 October 2008

Keywords:
Adipose-derived adult stem (ADAS) cells
Neuronal tissue
Neuronal differentiation
Neuronal markers

ABSTRACT

Adipose tissue contains many cells and proteins that are of value not only for their potential therapeutic applications, but also for the low cost of their harvest and delivery. Mesenchymal stem cells (MSC) were originally isolated from the bone marrow, although similar populations have been isolated from adipose and other tissues. At one time, neural tissues were not regarded as regenerative populations of cells. Therefore, the identification of cell populations capable of neuronal differentiation has generated immense interest. Adipose tissue may represent an alternative source of cells that are capable of neuronal differentiation, potentially enhancing its use in the treatment of neurological disease. The aim of this review is to cover the current state of knowledge of the differentiation potential of human adipose-derived stem (ADAS) cells, specifically their ability to give rise to neuronal cells *in vitro*. This review presents and discusses different protocols used for inducing human ADAS cells to differentiate *in vitro*, and the neuronal markers utilized in each system.

© 2009 International Society of Differentiation. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	221
2. The nature of the source of ADAS cells.	222
3. Applied methods of ADAS isolation	222
4. Markers of neuronal tissues	223
5. How ADAS cells differentiate into neuronal cells.	223
6. Induction of adipose-derived adult stem cells	225
7. How to confirm differentiation into functional neurons?	226
8. Conclusion	226
Acknowledgment	227
References	227

1. Introduction

Stem cells represent a population of cells that possess the following characteristics: the capacity to self-renew, long-term

viability, and multi-lineage potential. The multi-lineage potential of embryonic stem cells and adult stem cells from the bone marrow has been extensively characterized. Although embryonic stem cells have enormous potential, there are many ethical and political issues associated with their use. Therefore, adult stem cells from the bone marrow stroma (i.e., mesenchymal stem cells, MSCs) have been proposed as an alternative source (Zuk et al., 2002). MSCs are multipotent somatic cells that hold promise for applications in regenerative medicine. Given the appropriate microenvironment, MSCs can differentiate into almost any kind

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS 91507-970, Brazil. Tel.: +55 51 33087602; fax: +55 51 3308 6084. E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A. Pêgas Henriques).

of cell in the body. MSCs were originally isolated from bone marrow, although similar populations have been isolated from adipose and other tissues (Schwartz et al., 2002; Zuk et al., 2002; Wagner et al., 2005). Adipose tissue contains many cells and proteins that are of value not only for their possible therapeutic applications, but also for the low cost of their harvest and delivery. Plastic surgeons have an operative domain that covers almost every major fat deposit, and therefore have a unique opportunity and a vested interest in expanding basic and clinical research into the various facets of adipose biology. The harvest and manipulation of adipose-derived adult stem (ADAS) cells originated as an innovation in the plastic surgery field, and promises to have implications for every major field of medicine. Due to the ease and efficiency of obtaining ADAS cells from autologous donors, and the ability to administer them in large numbers, ADAS cells are practical, appealing, and a potentially valuable clinical therapy (Tholpady et al., 2005).

At one time, neural tissues were not regarded as regenerative populations of cells. Consequently, the identification of cell populations capable of neuronal differentiation has generated immense interest (Reynolds and Weiss, 1992; Richards et al., 1992; Safford et al., 2002). Safford et al. (2002) reported that murine and human ADAS cells can be induced to undergo morphologic and phenotypic changes consistent with neuronal differentiation. Adipose tissue may represent an alternative source of cells capable of neuronal differentiation, potentially enhancing their use in the treatment of neurological disease. The aim of this review is to cover the current state of knowledge on the differentiation potential of human ADAS cells, specifically their ability to give rise to neuronal cells *in vitro*. This review presents and discusses different protocols used for inducing human ADAS cells to differentiate *in vitro*, and the neuronal markers utilized.

2. The nature of the source of ADAS cells

Adipose tissue contains a fraction of multipotent cells that can be isolated (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2001). These cells have previously been referred to using a variety of different names (Table 1). In this review, the term "adipose-derived adult stem" cells will be used.

Many reports have shown that ADAS cells have similar phenotypes and gene expression profiles to those derived from bone marrow stem cells (BMSC) (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2001, 2002; De Ugarte et al., 2003; Lee et al., 2004; Case et al., 2005; Dicker et al., 2005; Strem et al., 2005a; Wagner et al., 2005). However, in a recent study by Traktuev et al. (2008) conclude that

Table 1 Different names used to designate "adipose-derived adult stem (ADAS)" cells.

Used name (abbreviation)	Meaning	Used for (authors)
PLA	Processed lipoaspirate	Zuk et al. (2001)
ATSC, AD- MSC	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	Song et al. (2005)
MADS	Multipotent adipose-derived stem	Rodriguez et al. (2005a)
ASC	Adipose tissue-derived stem cells	Fujimura et al. (2005)
ADSC, ATSC	Adipose tissue-derived stromal cells	Gaustad et al. (2004), Yang et al. (2004), Seo et al. (2005), Hattori et al. (2006)
ADAS	Adipose tissue-derived adult stem	Safford et al. (2002)
ADAS	Adipose tissue-derived adult stromal	Cowan et al. (2004)
ADC	Adipose tissue-derived cells	Strem et al. (2005b)

Table 2 ADAS cell differentiation potential.

Cell type	Authors of the research
Adipocytes	Zuk et al. (2002), Rodriguez et al. (2004, 2005b)
Cardiomyocytes	Gaustad et al. (2004), Planat-Benard et al. (2004a), Strem et al. (2005b)
Chondrocytes	Erickson et al. (2002); Zuk et al. (2002); Huang et al. (2004); Betre et al. (2006)
Endothelial cells	Planat-Benard et al. (2004b), Cao et al. (2005)
Epithelial cells	Brzoska et al. (2005)
Hepatocytes	Seo et al. (2005)
Myocytes	Mizuno et al. (2002); Rodriguez et al. (2005b)
Neurons	Safford et al. (2002, 2004), Zuk et al. (2002), Ashjian et al. (2003), Kang et al. (2003), Tholpady et al. (2003), Yang et al. (2004), Case et al. (2005), Fujimura et al. (2005), Jack et al. (2005), Guilak et al. (2006)
Osteoblasts	Zuk et al. (2002), Cowan et al. (2004), Cho et al. (2005), Dragoo et al. (2005), Rodriguez et al. (2005a), Yang et al. (2004), Hattori et al. (2006)

ADAS cells present in quiescent adipose tissue contains a majority of pericytic properties, while harboring the ability to differentiate into multiple other distinct lineages (Traktuev et al., 2008).

In addition to their capacity for self-renewal and long-term growth, ADAS cells are capable of differentiating into diverse cell types (Table 2).

3. Applied methods of ADAS isolation

The first stage of ADAS cell isolation is essentially performed the same way in each protocol. Briefly, lipoaspirates are washed extensively with equal volumes of phosphate-buffered saline to remove contaminating red blood cells and debris. The extracellular matrix is subsequently digested with collagenase. The enzyme activity is reduced by dilution in 10% fetal bovine serum (FBS) and the cells are centrifuged. The resulting pellet, containing ADAS cells, is resuspended in complete culture medium consisting of Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing FBS, and antibiotic/antimycotic agents.

After many washes, and collagenase treatment, the cells can be cultured. Prior to inducing neuronal differentiation, it is important to determine the appropriate time to start the process, and whether this is the time when the cell culture is enriched with pluripotent cells.

In this review, we discuss protocols for neuronal induction that have previously been reported in Woodbury et al. (2000) and Sanchez-Ramos et al. (2000), that used MSCs derived from bone marrow, and also the data from other reports that tested this protocol in human ADAS cells.

In the classical work of Woodbury et al. (2000) with MSCs derived from bone marrow, the cells were originally cultured in DMEM supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 25 ng/ml amphotericin B. At each passage, the cells were plated at about 8 × 10³ cells/cm² and grown to confluency. At passage 6, the cells were transferred to DMEM with 20% FBS without additional supplementation, and were maintained beyond passage 20, when they were induced to differentiate into neuronal cells (Woodbury et al., 2000).

Alternatively, Sanchez-Ramos et al. (2000) used a magnetic cell sorting kit to label bone marrow cells with Sca1+ or CD34+ microbeads. These label bone marrow cells that express a specific stem cell antigen (Sca1 in mice and CD34 in humans). The labeled bone marrow cells were passed through a magnetic cell sorting column, allowing positive selection of the Sca1+ or CD34+ cells (Sanchez-Ramos et al., 2000).

Subsequently, many research groups based their investigations upon one of these protocols, using MSCs derived from fat. Safford et al. (2002), cultured human ADAS cells with DMEM supplemented with 20% FBS and penicillin/streptomycin for 7 days and replated the cells at 8×10^3 – 1×10^4 cells/well. After 24 h, they removed the non-adherent cells and expanded the adherent ADAS cells by serial passaging. For all experiments, they used cells at passages 4–5 (Safford et al., 2002).

Before attempting neuronal differentiation, Zuk et al. (2002) attempted to confirm whether processed lipoaspirated cells represented a stem cell population. In order to achieve this, they conducted an extensive molecular and biochemical characterization of the ADAS cell population and several clonal isolates. The putative ADAS cells were plated at limiting confluence to obtain single isolated cells. Cultures were maintained in control medium until well-defined colonies were formed. The colonies derived from single ADAS cells were harvested using sterile cloning rings and expanded in cloning medium (15% FBS, 1% antibiotics/antimycotics in F-12/ DMEM [1:1]). Expanded clones were sub-cloned by limiting dilution. All clones were analyzed for osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and neurogenic proteins (Zuk et al., 2002).

Ashjian et al. (2003) incubated the adipose-derived cells with no-inductor medium. Cells were washed thoroughly with phosphate-buffered saline after 24 h of incubation, and non-adherent cells were discarded. Fresh complete culture medium was added every 3 days. The cells were grown to 50–60% confluency, at which point neural differentiation was initiated (Ashjian et al., 2003).

Krampera et al. (2007) collected the stromal fraction from adipose tissue by centrifugation, and filtered it through a 70 µm nylon mesh to remove cell debris. Cells were then cultured in

25 cm² flasks at a concentration of 3×10^7 nucleated cells in high glucose DMEM (GLUTAMAX 1™), 15% FBS, penicillin and streptomycin. After 72 h, non-adherent cells were removed, and thereafter medium was changed twice a week. When adherent cells were 70–80% confluent, they were trypsinized, harvested and expanded in larger flasks. A more similar cell population in terms of morphology was normally obtained after 3–5 weeks of culture (Krampera et al., 2007).

In all the studies that we reviewed, the cells were passaged a number of times before beginning neuronal induction. This is because it is essential to have a homogenous population of cells for neuronal induction.

4. Markers of neuronal tissues

In order to assess whether neural induction was effective, most researchers have used immunocytochemistry or western blotting to detect specific proteins, and/or RT-PCR for respective mRNAs. Table 3 presents the most common markers used to confirm neuronal induction of ADAS cells.

5. How ADAS cells differentiate into neuronal cells

In 2000, neural differentiation from bone marrow-derived cells was first described by two groups; Sanchez-Ramos et al. and Woodbury et al. These experiments were extended to ADAS cells by several other research groups (Ashjian et al., 2003; Safford et al., 2002, 2004; Tholpady et al., 2003; Zuk et al., 2002;

Table 3
Common markers used to confirm neuronal induction.

Protein	Expressing cells or tissue	Additional information
Chat (choline acetyltransferase)	Cholinergic neurons	Choline acetyltransferase (ChAT) catalyzes the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) from choline and acetyl-CoA in cholinergic neurons
GAD65 (glutamic acid decarboxylase)	Cytoplasm of GABAergic neurons in the central nervous system, pancreatic beta cells, testis, oviduct and ovary	GAD catalyzes the conversion of L-glutamate to γ-aminobutyric acid (GABA), the main inhibitory neurotransmitter in the brain, and a putative paracrine signal molecule in pancreatic islets. GAD has a restricted tissue distribution. Involved in development and plasticity
GalC (galactocerebroside)	Oligodendrocyte lineage	Galactocerebroside is a major galactosphingolipid of myelin that plays a role in myelination
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Mature glial cells (astrocyte)	GFAP is specifically found in astroglia, a cell type which is highly responsive to neurologic insults
IF-M (intermediate filament protein M)/NF-M (neurofilament M)	Specifically in neurons	Neurofilaments are composed predominantly of three major proteins called NF-L, NF-M, and NF-H. NF-M is the middle or medium neurofilament subunit
MAP-2 (major microtubule associated protein of brain tissue)	Mature neuronal lineage. MAP-2 is expressed at higher levels in some types of neurons than in other types	MAP-2 is known to promote microtubule assembly and to form side-arms on microtubules. It also interacts with neurofilaments, actin, and other elements of the cytoskeleton
MBP (myelin basic protein)	Oligodendrocyte	The classic group of myelin basic proteins (MBP) has a role in both the formation and stabilization of myelin. The smaller isoforms might have an important role in the remyelination of denuded axons in multiple sclerosis. The non-classic group of MBP isoforms (isoforms 1 to 3/Golli MBPs) may preferentially have a role in the early developing brain long before myelination, perhaps as components of transcriptional complexes, and may also be involved in signaling pathways in T cells and neural cells
Nestin (neuroepithelial stem cell intermediate filament protein)	Developing nervous system, neural stem and early progenitor cells, myogenic cells, endothelial cells, and hepatic cells	Nestin is expressed in the developing central nervous system in early embryonic neuroepithelial stem cells. Furthermore, it is a superior angiogenic marker for the evaluation of neovascularity of endothelial cells in tumors
β III Tubulin (neuron-specific β III tubulin)	Abundant in the central and peripheral nervous systems where it is prominently expressed during fetal and postnatal development	In adult tissues, the distribution of beta III is almost exclusively neuron-specific
NeuN (neuronal nuclear antigen)	Neuronal nuclei, terminal differentiation of developing and post-mitotic neurons	NeuN protein distribution is apparently restricted to neuronal nuclei, perikarya and some proximal neuronal processes in both fetal and adult brain
NF-70 (70 kDa neurofilament)	Most neurons and neuronal processes in central and peripheral nerves (mature neuronal lineage)	They are particularly abundant in the large projection axons of neurons. They probably function to provide structural support for neurons and their synapses and to support the large axon diameters required for rapid conduction of impulses

Table 3 (continued)

Protein	Expressing cells or tissue	Additional information
NSE2 (neuron-specific enolase 2)	Early neuronal marker	Enolases have been characterized as highly conserved cytoplasmic glycolytic enzymes that may be involved in differentiation. Three isoenzymes have been identified, enolase molecules are dimers composed of three distinct subunits (alpha, beta and gamma). Enolase expression has been detected in most tissues, whereas beta enolase is expressed predominantly in muscle tissue and gamma enolase is detected only in nervous tissue
O4	Immature and mature oligodendrocytes	Oligodendrocytes and astrocytes are derived from common precursor cells, glioblasts. O4 Antigens are sulfatides, which function as differentiation markers on the surface of oligodendrocytes of the central nervous system
PMP-22	Oligodendrocyte marker	PMP-22 is a glycoprotein expressed in the compact myelin of the peripheral nervous system. PMP-22 is produced by myelinating Schwann cells and is co-expressed with the genes for myelin basic protein (MBP) during nerve development and regeneration
PSA-NCAM (neural cell adhesion molecule)	NCAM is expressed on most neuroectodermal-derived cell lines	As a member of the immunoglobulin superfamily of adhesion molecules is characterized by several immunoglobulin (Ig) like domains. The extracellular part of NCAM consists of five of these Ig domains and two fibronectin type III homology regions. NCAM is expressed on most neuroectodermal-derived cell lines, tissues and neoplastic tissues, such as retinoblastomas, medulloblastomas, astrocytomas and neuroblastomas
S100	S100 Protein is found in the cytoplasm and nuclei of astrocytes, Schwann cells, ependymomas and astroglomas	S100 belongs to a family of calcium-binding proteins, and other members include calmodulin and troponin C. S100 proteins are localized in the cytoplasm and/or nucleus in a wide range of cells, and are involved in the regulation of a number of cellular processes, such as cell cycle progression and differentiation. Reduced expression of this protein has been implicated in cardiomyopathies
Tau	Tau is a neuronal microtubule-associated protein found predominantly in axons	The function of tau is to promote tubulin polymerization and stabilize microtubules, but it also serves to link certain signalling pathways to the cytoskeleton
Trk-A	Expressed in central and peripheral nervous systems	TrkA binds to nerve growth factor (NGF) and autophosphorylates tyrosine residues. It is variably expressed throughout the central and peripheral nervous systems and activates multiple downstream effector proteins. The Trk proto-oncogene family contains four members; TrkA, TrkB, TrkC, and TrkE
Vimentin	Peripheral nerve (Schwann)	Most normal mesenchymal cells such as fibroblasts, smooth muscle cells, lipocytes, cells, vascular endothelial cells, macrophages (including Kupffer cells), as well as myoepithelial cells of sweat and salivary glands and breast cells express this protein Some large lymphocytes have also shown cytoplasmic immunoreactivity for this protein

Information extracted from <http://www.scbt.com>, <http://www.dakousa.com>, <http://www.antibodystation.com/>.

Table 4
Neurogenic medium compounds and neurogenic markers used *in vitro*.

Source	Author	Special compounds of neurogenic medium	Markers expressed	Markers not expressed
Bone marrow classical	Sanchez-Ramos et al. (2000)	Transferrin, putrescine, insulin, progesterone, selenium, all-trans-retinoic acid, and (BDNF)	Very low expression of Nestin, NeuN, and GFAP	Not specified
	Woodbury et al. (2000)	Pre-induction: (BME). Induction: BME or DMSO and BHA	Very high expression of NSE, NeuN, NF-M, and tau	Not specified
ADAS	Safford et al. (2002)	BHA, KCl, valproic acid, forskolin, hydrocortisone, and insulin.	Strong expression of IF-M, NeuN, and nestin	Not specified
	Zuk et al. (2002)	Pre-induction: BME. Induction: BME or DMSO and BHA	Expression of NSE and NeuN	No expression of MAP-2, NF-70 GalC, and GFAP was observed
	Ashjian et al. (2003)	Insulin, indomethacin, isobutylmethylxanthine	Increased expression of NSE, vimentin, trk-A, and NeuN	No expression of GFAP, MAP 2, and tau
	Krampera et al. (2007)	Pre-induction-(BME). Induction-BME or DMSO and BHA	Intense expression of PMP-22, GFAP, NeuN, PSA-NCAM, nestin, S-100, MAP 2 and Gal-C	Not specified
		Co-cultures with ADAS and Schwann cells	Expression of PMP-22 and S-100	No expression of central nervous system, glial or neuronal markers

Adipose-derived adult stem (ADAS), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), β-mercaptoethanol (BME), butylated hydroxyanisole (BHA), dimethylsulfoxide (DMSO), galactocerebroside (GalC), glial fibrillary acid protein (GFAP), intermediate filament M (IF-M), microtubule-associated protein (MAP), neurofilament-M (NF-M), neuron-specific enolase (NSE), potassium chloride (KCl).

Krampera et al., 2007). Table 4 shows the different protocols developed for neurogenesis from adult human stem cells.

Sanchez-Ramos et al. (2000) replated BMSCs after their first or second passage into 35-mm culture dishes in the presence

of neuronal growth medium (N5; Kaufman and Barrett, 1983), supplemented with 5% horse serum, 1% FBS, 100 mg/ml transferrin, 60 mM putrescine, 25 mg/ml insulin, 0.02 mM progesterone, 0.03 mM selenium, 0.5 mM all-trans-retinoic acid, and

brain-derived neurotrophic factor (BDNF) at a concentration of 10 ng/ml. They found that a small proportion (0.5–1%) of cells expressed the neuroepithelial stem cell marker nestin, the neuronal marker NeuN and the glial marker GFAP (Sanchez-Ramos et al., 2000; Table 4).

Woodbury et al. (2000) worked with bone marrow stromal cells, and subsequently with cells derived from adipose tissue (Zuk et al., 2002; Krampera et al., 2007). They replaced the culture media 24 h prior to neuronal induction with pre-induction media consisting of DMEM with 20% FBS, 1 mM β -mercaptoethanol (BME). To initiate neuronal differentiation, the pre-induction medium was removed, the cells were washed with PBS, and incubated with neuronal induction media composed of DMEM with 1–10 mM BME or DMEM, (2%) dimethylsulfoxide (DMSO) and 200 μ M butylated hydroxyanisole (BHA; Woodbury et al., 2000). Within hours, 80% of these cells reportedly expressed NSE, NeuN, neurofilament-M (NF-M), and tau. The dramatically different results reported by Woodbury and Sanchez-Ramos are most probably due to the different cell induction and MSC isolation protocols (Table 4).

6. Induction of adipose-derived adult stem cells

Safford et al. (2002) modified the following published protocols by Sanchez-Ramos et al. (2000), Woodbury et al. (2000), and O'Shea (2001) (O'Shea Neuronal medium: DMEM containing 10% FBS, 1.000 U/ml leukemia inhibitory factor, and 0.1 mM BME). In order to initiate neuronal differentiation, they replaced the control medium with neuronal induction medium composed of DMEM with 200 μ M BHA, 5 mM KCl, 2 μ M valproic acid, 10 μ M forskolin, 1 μ M hydrocortisone, and 5 g/ml insulin. They changed the culture medium every 3 days for the duration of each experiment. They analyzed cultures of cells at intervals from 3 h to 14 days following neuronal induction, and found that the ADAS cells displayed changes in cellular morphology. To verify neuronal induction, they used human antibodies directed against IF-M, nestin, and NeuN for immunocytochemistry, and other antibodies against GFAP, NeuN, and nestin for western blot analysis. They found that human ADAS cells growing under control conditions did not express nestin or NeuN, but did express low levels of IF-M. Following 24 h of neuronal induction, they detected strong staining for intermediate filament protein M (IF-M), NeuN, as well as nestin in the majority of cells (Safford et al., 2002; Table 4).

Safford et al. (2002) found no expression of GFAP, nestin, or NeuN in human ADAS cells before neuronal induction. After 24 h of neuronal induction, analysis of cell lysates confirmed the presence of GFAP, nestin, and NeuN. In a subset of experiments, they tested the effect of growth factors on the proliferation and differentiation of ADAS cells. Prior to neuronal induction, they cultured ADAS cells for 7 days in control media supplemented with 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) and 20 ng/ml basic fibroblastic growth factor (bFGF). They found that the pre-treatment induced neuronal morphological and immunocytochemical changes, and augmented the neuronal phenotype changes observed 24 h after neuronal induction (Safford et al., 2002; Table 4).

Zuk et al. (2002) induced neuronal differentiation following the protocols published by Woodbury et al. (2000). They analyzed the expression of NeuN, NSE, NF-70, MAP-2, GFAP, and Gal-C through immunohistochemistry. Samples were also analyzed by RT-PCR for nestin, GFAP, MBP, Chat, and GAD65. Neurogenic induction for 30 min resulted in a change in ADAS cell morphology, with 10% of the cells assuming a neuronal-like phenotype. Induction for three hours increased this phenotype to a maximum of 70%, and a non-significant increase in neurogenic induction was

observed beyond this induction time. Induction in neural medium resulted in NSE and NeuN expression, consistent with the neuronal lineage. No expression of MAP-2, NF-70 Gal-C, and GFAP was observed. The control ADAS cells did not express any markers by immunocytochemistry. RT-PCR analysis revealed that the expression of nestin was detectable in induced and non-induced ADAS cells. A similar gene expression profile was also observed in ADAS cells induced for 9 h in neuronal medium, followed by maintenance for up to 1 week in a medium designed to maintain neurogenic precursors (NPMM). No expression of GFAP, MBP, Chat or GAD65, was observed. These results suggest that ADAS cells may be capable of assuming an early neuronal or neural precursor phenotype (Zuk et al., 2002; Table 4).

Ashjian et al. (2003) used neural induction media composed of DMEM with 10% FBS, 1% antibiotics/antimycotics, 5 μ g/ml insulin, 200 μ M indomethacin, 0.5 mM isobutylmethylxanthine. The induction media was replaced every 3 days during the 2 weeks of differentiation. To determine the degree of neural differentiation, they evaluated cell morphology, and performed western blot, immunocytochemistry and electrophysiology analyses. As early as 3 days after neural induction, they observed morphologic changes. Specifically, the ADAS cells changed from flat, elongated, spindle-shaped cells to rounded cells with several branching extensions and refractile characteristics. Neuronal induction was conducted for 14 days, during which time the number of cells exhibiting the neuronal phenotype increased to a maximum of 20–25% of the total ADAS cell population (Ashjian et al., 2003; Table 4).

Ashjian et al. (2003) observed that non-induced ADAS cells (controls) expressed several markers characteristic of neural cells such as NSE, vimentin, trk-A, and NeuN. They also found that cells cultured in neural induction medium had an increased expression of NSE, vimentin, and trk-A, whereas the expression of NeuN remained unchanged. No expression of GFAP, MAP2, and tau was noted in either the induced or non-induced ADAS cells. By immunocytochemistry, the non-induced cells showed no expression of Trk-A, NeuN, MAP2, GFAP, and expressed NSE at low levels. In induced cells, expression of NSE, Trk-A, and NeuN was detected. Only cells that exhibited a neural-like structure stained positive for these markers. No inward currents were observed by electrophysiology at this stage of differentiation (Table 4).

Krampera et al. (2007) sought to evaluate and compare the neural differentiation potential of adult human MSCs obtained from different tissues (BM, fat, thymus, and spleen) using the Woodbury et al. (2000) protocol of chemical induction. They specifically analyzed the duration and selectivity of the process. In addition, they assessed the effects of co-culturing MSCs and Schwann cells on the process of neural differentiation of MSCs with different origins. The MSC populations used for differentiation were phenotypically homogeneous. After exposure to neural induction medium (Woodbury et al., 2000), the MSCs of all types exhibited morphological changes that occurred very rapidly. Most cells retracted their cytoplasm, forming spherical cell bodies, emitted cellular protrusions and completely ceased to proliferate, when compared to MSCs under basal conditions (BrdU experiments). At the end of this process, the authors identified three morphologically distinct subsets of MSCs: astro/neural-like, oligodendroglial-like, and MSC-like. About 50–70% of MSCs appeared as sharp, elongated bi- or tripolar cells with primary and secondary processes, morphologically reminiscent of neurons or astrocytes and expressed PMP-22, GFAP, NeuN, PSA-NCAM, nestin, S-100, MAP2, and Gal-C at high levels. The second population (about 15%) was characterized by irregular-shaped cells with short, multi-branched processes that were morphologically similar to cells of the oligodendroglial lineage, and selectively expressed Gal-C. The final population (15–20%) was similar to MSCs in basal conditions, i.e., they remained

undifferentiated and did not upregulate any neural markers. Alternatively, the neural differentiation induced from co-cultures with human Schwann cells established important and long-lasting (up to 12 days) morphological and phenotypic changes in all the types of MSCs. The process was typical of Schwann cell differentiation, thus indicating that cell plasticity is a common feature of all MSC types. In fact, co-culture with Schwann cells resulted in the selective expression of the Schwann cell-specific proteins PMP-22 and S-100 in MSCs, but no expression of central nervous system glial or neuronal markers. Comparison of the biological changes in the MSCs derived from different tissues after co-culture with Schwann cells demonstrated that the percentage of fat-derived MSCs undergoing Schwann cell differentiation was significantly greater than the differentiation achieved with MSCs derived from other tissues. In these latter cases, pre-treatment with neural differentiation medium increased the capability of the MSCs to differentiate towards a Schwann cell phenotype, up to levels comparable with the fat-derived MSCs. These observations suggest that neural differentiation medium may initiate the first steps of neural differentiation, as observed by Wenisch et al. (2006). In addition, the Schwann cell co-culture may provide the necessary conditions to complete such a process. With regard to the mechanisms underlying the Schwann cell differentiation of MSCs, the authors showed that direct contact between Schwann cells and MSCs was necessary to induce morphological and phenotypic changes in the MSCs. This was demonstrated by the absence of any differentiation effects when the supernatant from Schwann cells was simply added to MSC cultures (Krampera et al., 2007; Table 4).

7. How to confirm differentiation into functional neurons?

The important question to address is whether trans-differentiated neuronal cells from adipose tissue become functional neurons. A normal mature central nervous system neuron is defined not only by its polarity in cytology and specific protein expression in defined locations, but also more importantly, by its excitability, or its ability to fire action potentials and to communicate with other cells by releasing neurotransmitters at synapses (Lu and Tuszynski, 2005). Lu and Tuszynski (2005) reported the details of several studies that demonstrated that mature functional neurons can be generated *in vitro* from embryonic stem and embryonic or adult neural stem cells. In comparison, no study has shown that adipose tissue-derived stem cells can generate functional neurons. Most studies rely only upon morphological changes and/or neuronal marker gene expression at the mRNA or protein level. Some previous studies have attempted to perform electrophysiological analysis on potential bone marrow-derived neurons (Hofstetter et al., 2002; Padovan et al., 2003), however, these neuron-like cells lacked voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents and action potentials, as well as functional neurotransmitter receptors. However, other researchers have reported that bone marrow-derived neurons have electrical properties (Kohyama et al., 2001; Hung et al., 2002). However, the recorded resting membrane potentials were either higher than normal in functional neurons (Kohyama et al., 2001), or the observed elevation in [Ca²⁺]_i response induced by glutamate or high K⁺ buffer was slow or delayed (Hung et al., 2002). In addition, these studies did not report the establishment of neuronal polarity and synapses. To date, only one study (Jiang et al., 2003) demonstrated electrophysiological properties typical of neurons following long-term cell culture and a complicated neuronal induction protocol (Jiang et al., 2002, 2003). However, additional evidence of neuronal polarity and synapse formation has not been provided as of yet (Jiang et al., 2003).

8. Conclusion

A number of diverse protocols and a variety of results have been described with respect to the induction of neural cells. The variety of neuronal cell morphologies and the different neuronal protein expression profiles observed by different research groups is probably due to factors such as differences in the protocols, cell passage numbers, cell densities, donor age, time in culture, etc. Experimental protocols used to induce ADAS cell neural differentiation were largely adopted from earlier studies of neural differentiation using MSCs from bone marrow. These protocols generally relied on exposing cells to retinoic acid and cocktails of cytokines (Sanchez-Ramos et al., 2000; Case et al., 2005), butylated hydroxyanisole, di-methyl-sulfoxide (DMSO) (Woodbury et al., 2000, 2002; Safford et al., 2002; Zuk et al., 2002; Yaghoobi et al., 2005; Guilak et al., 2006), and agents that elevated intracellular cAMP levels (Deng et al., 2001; Ashjian et al., 2003; Suon et al., 2004; Fujimura et al., 2005).

Two independent studies by Neuhuber et al. (2004) and Lu et al. (2004) suggested that the simple chemical neuronal induction protocol of Woodbury et al. (2000), might in fact be an artifact of cell stress due to toxic chemicals. This hypothesis was based on the fact that not only MSCs, but also several other cell types lacking any stem cell characteristics (primary rat fibroblasts, HEK 293, PC-12 cells) responded rapidly to exposure to BME or DMSO/BHA by adopting a neuron-like appearance. These features are due to disruption of the cytoskeleton rather than true differentiation. The increased immunohistochemical staining observed for neuronal proteins was due to an increase of antigen levels per unit area, as opposed to an increase of overall protein concentrations (Neuhuber et al., 2004; Lu et al., 2004).

Several laboratories have found evidence for ectodermal differentiation of ADAS cells towards neuronal lineages, suggesting that there is a range of plasticity much broader than was originally thought.

Several studies observed multiple molecular markers being expressed simultaneously (Table 4). The simultaneous expression of both nestin (a marker of immature neural cells) and NeuN (a marker that indicates the presence of mature neural cells) is considered unusual and is not an indicative of differentiation *per se*. The fact that human ADAS cells express neuron-specific proteins in addition to the increased expression of several early neuronal and glial markers, is not a proof that these cells will ultimately differentiate into mature neurons. Zuk et al. (2002) explain that nestin expression has also been observed in myogenic cells, endothelial cells, and hepatic cells, showing that it cannot be used as a marker for putative neurogenic potential. However, neurogenic induction of ADAS cells also resulted in the assumption of a neuronal-like morphology supported by the increasing expression of two neuron-specific proteins, NSE and NeuN (Zuk et al., 2002). Other important issue is the fact that there is a pool of heterogeneous cell population in culture media where each cell population can express different types of marker. Yang et al. (2008) concluded that neural stem cells underwent deregulation of self-renewal related genes in long-term culture adaptation, leading to malignant transformation. This also could be occurring in ADAS cells in long-term culture and the variety of expression of neuronal marker may be an indicative of a tumor differentiation. Further studies are needed to evaluate various *in vitro* culture conditions and *in vivo* models to examine if ADAS cells will eventually form mature neurons and/or glial cells and participate in central nervous system integration and repair.

To date, no research group has produced clear evidence that ADAS cells are capable of differentiating into mature or functional neuronal cells *in vitro*. Expression of a delayed-rectifier type of K⁺

current may be indicative of a more functional neuronal phenotype; however, as yet, there has been no demonstration of neuronal depolarization or synaptic functioning in differentiated cells cultured *in vitro*. Perhaps new methods to induce trans-differentiation could improve the existing neuronal differentiation techniques. Neural-like morphology or expression of selective neuronal or glial markers does not appear to result from aberrantly induced gene expression. Instead, genuine neuronal differentiation of adult stem cells requires full cell functionality, which may be demonstrated through electrophysiology and expression of the complete profile of neuronal genes.

Acknowledgment

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Grant no. 552239/2005-4).

References

- Ashjian, P.H., Elbarbary, A.S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P.A., Lorenz, H.P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2003. *In vitro* differentiation of human processed liposipate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* 111, 1922–1931.
- Betre, H., Ong, S.R., Guilak, F., Chilkoti, A., Fermor, B., Setton, L.A., 2006. Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials* 27, 91–99.
- Brozka, M., Geiger, H., Gauer, S., Baer, P., 2005. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 142–150.
- Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q., Zhao, R.C., 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 370–379.
- Case, J., Horvath, T.L., Howell, J.C., Yoder, M.C., March, K.L., Srour, E.F., 2005. Clonal multilineage differentiation of murine common pluripotent stem cells isolated from skeletal muscle and adipose stromal cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 1044, 183–200.
- Cho, H.H., Park, H.T., Kim, Y.J., Bae, Y.C., Suh, K.T., Jung, J.S., 2005. Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J. Cell Biochem.* 96, 533–542.
- Cowan, C.M., Shi, Y.Y., Aalami, O.O., Chou, Y.F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C.H., Wu, B., Longaker, M.T., 2004. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat. Biotechnol.* 22, 560–567.
- De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Drago, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H., 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174, 101–109.
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., Prockop, D.J., 2001. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 148–152.
- Dicker, A., Le Blanc, K., Astrom, G., van Harmelen, V., Gotherstrom, C., Blomqvist, L., Arner, P., Ryden, M., 2005. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 308, 283–290.
- Dragoo, J.L., Lieberman, J.R., Lee, R.S., Deugarte, D.A., Lee, Y., Zuk, P.A., Hedrick, M.H., Benhaim, P., 2005. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast. Reconstr. Surg.* 115, 1665–1673.
- Erickson, G.R., Gimble, J.M., Franklin, D.M., Rice, H.E., Awad, H., Guilak, F., 2002. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 763–769.
- Fujimura, J., Ogawa, R., Mizuno, H., Fukunaga, Y., Suzuki, H., 2005. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 116–121.
- Gaustad, K.G., Boquest, A.C., Anderson, B.E., Gerdes, A.M., Collas, P., 2004. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 420–427.
- Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W., Gimble, J.M., 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiol.* 189 (1), 54–63.
- Guilak, F., Lott, K.E., Awad, H.A., Cao, Q., Hicok, K.C., Fermor, B., Gimble, J.M., 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell Physiol.* 206, 229–237.
- Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K., 2006. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 76, 230–239.
- Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D.J., Olson, L., 2002. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2199–2204.
- Huang, J.L., Zuk, P.A., Jones, N.F., Zhu, M., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., Benhaim, P., 2004. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 113, 585–594.
- Hung, S.C., Cheng, H., Pan, C.Y., Tsai, M.J., Kao, L.S., Ma, H.L., 2002. *In vitro* differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells* 20, 522–529.
- Jack, G.S., Almeida, F.G., Zhang, R., Alfonso, Z.C., Zuk, P.A., Rodriguez, L.V., 2005. Processed liposipate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J. Urol.* 174, 2041–2045.
- Jiang, Y., Henderson, D., Blackstad, M., Chen, A., Miller, R.F., Verfaillie, C.M., 2003. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11854–11860.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M., 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.
- Kang, S.K., Lee, D.H., Bae, Y.C., Kim, H.K., Baik, S.Y., Jung, J.S., 2003. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 183, 355–366.
- Kaufman, L.M., Barrett, J.N., 1983. Serum factor supporting long-term survival of rat central neurons in culture. *Science* 220, 1394–1396.
- Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J., Umezawa, A., 2001. Brain from bone: efficient meta-differentiation of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68, 235–244.
- Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galiè, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., Pizzolo, G., Sbarbati, A., Bonetti, B., 2007. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40, 382–390.
- Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C., Jung, J.S., 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol. Biochem.* 14, 311–324.
- Lu, P., Tuszynski, M.H., 2005. Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons? *Exp. Neurol.* 193, 273–278.
- Lu, P., Blech, A., Tuszynski, M.H., 2004. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77, 174–191.
- Mizuno, H., Zuk, P.A., Zhu, M., Lorenz, H.P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Myogenic differentiation by human processed liposipate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109, 199–209.
- Neuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., MacLay, A., Fischer, I., 2004. Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77, 192–204.
- O'Shea, K.S., 2001. Neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells: lineage selection and forced differentiation paradigms. *Blood Cells Mol. Dis.* 27, 705–712.
- Padovan, C.S., Jahn, K., Birnbaum, T., Reich, P., Sostak, P., Strupp, M., Straube, A., 2003. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant.* 12, 839–848.
- Planat-Benard, V., Menard, C., Andre, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.M., Penicaud, L., Casteilla, L., 2004a. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res.* 94, 223–229.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J.S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L., Casteilla, L., 2004b. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109, 656–663.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F., 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8591–8595.
- Rodriguez, A.M., Elabd, C., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dani, C., 2005a. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125–128.
- Rodriguez, A.M., Pisani, D., Chesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdzienkowski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J.P., Groux, H., Ailhaud, G., Dani, C., 2005b. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* 201, 1397–1405.
- Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.D., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., Rice, H.E., 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 371–379.
- Safford, K.M., Safford, S.D., Gimble, J.M., Shetty, A.K., Rice, H.E., 2004. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.* 187, 319–328.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., Sanberg, P.R., 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* 164, 247–256.
- Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., Verfaillie, C.M., 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109, 1291–1302.

- Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C., Jung, J.S., 2005. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 258–264.
- Song, H.Y., Jeon, E.S., Jung, J.S., Kim, J.H., 2005. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2357–2365.
- Strem, B.M., Hicok, K.C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R.E., Fraser, J.K., Hedrick, M.H., 2005a. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* 54, 132–141.
- Strem, B.M., Zhu, M., Alfonso, Z., Daniels, E.J., Schreiber, R., Begyui, R., MacLellan, W.R., Hedrick, M.H., Fraser, J.K., 2005b. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 7, 282–291.
- Suon, S., Jin, H., Donaldson, A.E., Catterson, E.J., Tuan, R.S., Deschenes, G., Marshall, C., Iacovitti, L., 2004. Transient differentiation of adult human bone marrow cells into neuron-like cells in culture: development of morphological and biochemical traits is mediated by different molecular mechanisms. *Stem Cells Dev.* 13, 625–635.
- Tholpady, S.S., Katz, A.J., Ogle, R.C., 2003. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation *in vitro*. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 272, 398–402.
- Tholpady, S.S., Aojanepong, C., Llull, R., Jeong, J.H., Mason, A.C., Futrell, J.W., Ogle, R.C., Katz, A.J., 2005. The cellular plasticity of human adipocytes. *Ann Plast Surg* 54 (6), 651–656.
- Traktuev, D.O., Merfeld-Clauss, S., Li, J., Kolonin, M., Arap, W., Pasqualini, R., Johnstone, B.H., March, K.L., 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* 102, 77–85.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansgor, W., Ho, A.D., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33, 1402–1416.
- Wenisch, S., Trinkaus, K., Hild, A., Hose, D., Heiss, C., Alt, V., Kisch, C., Meissl, H., Schnettler, R., 2006. Immunohistochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone* 38, 911–921.
- Woodbury, D., Reynolds, K., Black, I.B., 2002. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 69, 908–917.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., Black, I.B., 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364–370.
- Yaghoobi, M.M., Mowla, S.J., Tiraihi, T., 2005. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neurosci. Lett.* 390, 81–86.
- Yang, L.Y., Liu, X.M., Sun, B., Hui, G.Z., Fei, J., Guo, L.H., 2004. Adipose tissue-derived stromal cells express neuronal phenotypes. *Chin. Med. J.* 117, 425–429.
- Yang, S., Lin, G., Tan, Y.Q., Zhou, D., Deng, L.Y., Cheng, D.H., Luo, S.W., Liu, T.C., Zhou, X.Y., Sun, Z., Xiang, Y., Chen, T.J., Wen, J.F., Lu, G.X., 2008. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 665–679.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.L., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

IV-

CAPÍTULO 2

Artigo: “*The viability and integrity of ADAS cell differentiated in neural like cells*”

Este capítulo aborda um estudo de viabilidade e integridade das células tronco derivadas do tecido adiposo (ADAS) durante o processo de diferenciação para o tecido neural por meio do teste cometa, micronúcleo e viabilidade celular. Além disso, foi verificada a expressão de proteínas relacionadas com sinalização de danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular. Com essas análises é possível ter uma idéia da integridade genômica das células ADAS durante o processo de indução da diferenciação neuronal. A manutenção da integridade genômica das células-tronco durante a cultura celular e o processo de diferenciação é fundamental para uma posterior utilização dessas células na prática clínica.

The viability and integrity of ADAS cell differentiated in neural like cells

Ana Paula Franco Lambert¹, Dinara Moura¹, Aline Fraga Zandonai¹, Mariana Assis Lemos², Jeremiah Lubianca^{1,3}, Christian Viezzer, João Álvaro Souza da Silva³, Diego Bonato², Denise Cantarelli Machado³ and João Antônio Pêgas Henriques^{1,2,4,*}

¹Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil.

³Departamento de Medicina Interna/Faculdade de Medicina, Centro de Terapia Celular-Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

Short title: Genotoxicity of chemical neuronal induction medium

***Address to which correspondence should be sent:**

João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS,

Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970.

Telephone: 55-51-3308-7602; Fax: 55-51-3308-6084.

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Contract/grant sponsor: CNPq (research grant number 552239/2005-4).

Abstract

The harvest and manipulation of adipose-derived adult stem (ADAS) cells introduced an innovation in the plastic surgery field and promises to have implications for every major field of medicine. The differentiation of ADAS cells to neuronal cells has been accomplished by several groups. One important aspect related to ADAS cells is the maintenance of genomic stability during the differentiation process. In this sense, the maintenance of genomic stability by means of anti-stress defenses and DNA repair mechanisms in adult stem cells should be particularly stringent, where any genetic alteration can compromise the genomic stability and functionality of cell. The aim of this study was observed the viability and integrity of ADAS cells treated with neural induction medium, using the comet assay, micronucleus tests, and MTT cell viability assay. Moreover, the expression of some proteins related in DNA damage, chromatin remodeling and cell proliferation was analyzed. The data obtained from the present study clearly indicate that the chemical neuronal medium can be genotoxic to ADAS cells. Our results reveal that neuronal induction increases the damage frequency and damage index observed by comet assay. The induction of micronuclei was not observed for the same conditions, indicating that the neuronal induction medium does not cause chromosome loss and chromosome breakage. Considering the expression of MCM3, TIP60, telomerase and the variety of expression of neuronal marker the neural induction used in this work, may drive ADAS cells to malignant differentiation (not normal neural differentiation). This results alert to the importance of developing studies related to differentiation and cell integrity before using these cells for human therapies.

Introduction

In the last years human adult stem cells have evolved as important tools for several cell-based therapies; in particular, for tissue engineering approaches. Human mesenchymal stem cells (MSCs) are among the most promising candidates. Human adipose-derived stem (ADAS) cells show typical human MSC characteristics, including a common surface marker profile and differentiation potential *in vitro* and *in vivo* (1). Murine and human ADAS cells can undergo morphologic and phenotypic changes consistent with neuronal differentiation (2). In this sense, the adipose tissue may represent an alternative source of cells capable of neuronal differentiation, potentially enhancing their use for the treatment of different neurological diseases. The differentiation of ADAS cells to neural like cells as been accomplished by several groups (2-5) revised in Lambert et al., 2009.

One important aspect related to ADAS cells is the maintenance of genomic stability during the differentiation process. In this sense, the maintenance of genomic stability by means of anti-stress defenses and DNA repair mechanisms in adult stem cells should be particularly stringent, where any genetic alteration can compromise the genomic stability and functionality of an entire cell lineage. It is well documented that DNA is subject to damage from endogenous and exogenous sources on a continuous basis (6) and cells have evolved several DNA repair pathways to remove DNA mismatches and lesions, and thus prevent the deleterious consequences of DNA damage (6-10). In the case of persistent unrepaired DNA damage, cells induce complex signaling pathways that culminate in senescence or apoptosis. Interestingly, defects in DNA repair, cellular senescence and/or apoptosis have been implicated in cancer and aging (11-13). Some proteins implicated in DNA repair also acts in diverse biological processes, including apoptosis and senescence. For example, the ataxia-telangiectasia, mutated (ATM) and ATM and Rad3-related (ATR) are stress-response kinases which respond to a variety of insults including ionizing radiation, replication arrest, ultraviolet radiation and hypoxia/re-oxygenation (14). ATM is activated by DNA double-strand breaks (DSBs) caused by agents such as ionizing radiation or chemotherapeutic drugs, while ATR is activated by stresses that induce a replication-type insult such as hydroxyurea treatment, ultraviolet light (UV) and hypoxia (14).

In addition to ATM and ATR, it has been demonstrated that regulation of gene expression can be modified by epigenetic alterations like chromatin remodeling, and DNA methylation. (15). Chromatin structure plays a key role in most processes involving DNA metabolism, being implicated in the transcriptional regulation and DNA replication. In this sense, the epigenetic control of DNA metabolism relies in the use of different histone proteins, composing a histone code. This code, involving phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation, acetylation and methylation, regulates chromatin accessibility either by disrupting chromatin contacts or by recruiting non-histone proteins to chromatin (16). Recent evidences also suggest that a histone code is involved in DNA damage detection and repair. For example, formation of DSBs, results in phosphorylation of histone H2AX (the so-called gamma-H2AX) on the chromatin surrounding the DNA lesion (16). In addition to H2AX, many other proteins that affect chromatin structure also regulates the epigenetic control of DNA metabolism, like TRRAP, and TIP60 (17). TRRAP is a component of several multiprotein histone acetyltransferases (HAT) complexes, implicated in both transcriptional regulation and DNA repair (18). TIP60 was originally identified as a cellular HAT protein that interacts with HIV-1-associated protein Tat, affecting the functions of many targets, including transcriptional regulators, cell cycle and checkpoint machinery and DNA repair regulators (19). By its turn, the MCM2-7 complex act as a replicative helicase during DNA synthesis and plays a central role in S-phase genome stability (20, 21). Another important structure related to genetic stability is the telomeric region found in the extremities of chromosomes. Telomeres are maintained by telomerase, a specialized ribonucleoprotein complex that includes an RNA template and a reverse transcriptase catalytic subunit. Telomerase expression is low or absent in most human somatic tissues, whereas it is robust in early proliferative progenitor germ and stem cells (22).

Considering the importance of some proteins for genomic stability during differentiation process in adult stem cells, the aim of this study was observed the viability and integrity of ADAS cells treated with neural induction procedures. The genotoxic properties of neural induced medium was analyzed using the comet, micronucleus tests, and MTT cell viability assay in order to verify genomic and cellular integrity during in vitro neuronal differentiation. Moreover, the expression of some proteins related in DNA damage and DNA repair mechanisms was analyzed during differentiation process.

Materials and Methods

Human ADAS cell source

Human adipose tissue was obtained with informed consent from healthy patients who performed liposuction surgery for esthetic reasons in the Hospital São Lucas of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (Porto Alegre, RS – Brazil), as approved by the Ethics Committee of this University. No diabetes, hepatitis, metabolic diseases or other systemic complications were reported for these donors.

The liposuction tissue was digested with 0.015% type I collagenase and the stromal cell pellet was obtained by centrifugation (400 x g). The stromal cells were washed three times with PBS and collected again by centrifugation. The resulting cells were resuspended and plated in control medium (containing DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin) in tissue culture flasks. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 2-4 passages.

Cell culture and neuronal induction procedures

ADAS cells were initially cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin. After 2-4 passages, the cells were induced to neuronal cells. In the last passage before the induction, the cells were plated at about 8,000 cells/cm² and grown for 48 h. All subsequent assays were performed with induced and non-induced (control) cells.

Subconfluent cultures of human ADAS cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours prior neuronal induction culture medium were replaced with pre-induction medium consisting of DMEM supplemented with 20% FBS and 1 mM β-mercaptoethanol (BME). To initiate neuronal differentiation, the pre-induction medium were removed and the cells were washed with PBS and transferred to neuronal induction medium composed of DMEM supplemented with 2% dimethylsulfoxide (DMSO) and 200 μM butylated hydroxyanisole (BHA). After 24 h of induction, the experiment was performed.

Immunocytochemistry, quantification of morphological changes and immunolabeling

Chemical-induced ADAS cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 10 min. Nonspecific antibody reactions were blocked with 5% horse serum for 10 min at room temperature. Next, fixed cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. After three washes, cells were incubated with biotinylated universal secondary antibodies for 10 min at room temperature, washes and followed by 10 min of incubation in streptavidin/peroxidase complex at room temperature. Diaminobenzidine (0.05%) with nickel chloride (0.04%) was used as chromogen, and the reactions were performed for 6-10 min at room temperature. Omission of primary antibodies served as negative control.

The percentage of cells showing specific immunolabeling were quantified in three randomly selected fields at 200× with a bright field microscope. The number of cells exhibiting positive immunolabeling was divided by the total number of cells in the same field as determined by phase optics to obtain the mean percentage of cells that were immunolabeled.

Single-cell gel electrophoresis (Comet assay)

After 24h of neural induction cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized with 100 µL trypsin (0.15%). Alkaline comet assay was performed as described elsewhere with minor changes (23, 24). Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) Class 0 cells were undamaged, with no tail; (2) Class 1 cells had a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) Class 2 cells had a tail as long as 1-2× the diameter of the head; (4) Class 3 cells had a tail longer than 2× the diameter of the head; and (5) Class 4 cells had comets with no heads. International guidelines and recommendations for the comet assay consider visual scoring as a valid evaluation method (25, 26). A value (damage index) was assigned to each comet according to its class. Damage index (DI) and damage frequency (DF) are calculated according Tice et al.(25). Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments.

Micronucleus test

After treatment, the cells were separated from the plate by trypsinization and the cellular suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 5 min. Next, a micronucleus (MN) assay was performed accordingly to Matsuoka et al. with modifications (27, 28). Micronucleated cells were counted in 2000 cells with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech (2000).

Cell viability analysis by MTT assay

Cell survival was evaluated with the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay that is based on the formation of a visible dark blue formazan product by the action of cellular mitochondrial dehydrogenases as a marker for living cells. Analysis of MTT was made according to Mosmann (1993)(29).

RNA extraction and real-time polymerase chain reaction

Total RNA from a 60 cm² plate with ADAS cells induced or non-induced to neural tissue was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) following the cell culture protocol of the manufacturer's instructions. RNA was dissolved in water and spectroscopically quantified at 260 nm with the BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland.). The purity of RNA was verified by absorbance (A) using the ratio $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ between 1.80 and 2.06 (mean = 2.0). RNA was reverse transcribed into cDNA by RT2 First Strand kit (Superarray, Frederick, MD). Primers for nestin (PPH02388A), GFAP (PPH02408E), NSE (PPH02058A) were purchased from Superarray (available in: www.superarray.com). Primers from telomerase are (F CAGCTTTTCCTCACCAGGAG; R GTACAGGGCACACCTTTGGT). qPCR reactions were carried out using SYBR Green polymerase chain reaction master mix (SuperArray, Frederick, MD) in a iCycler (BioRad, Hercules, CA). PCR condition were: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. A final stage of 1 min at 95°C, 2 min at 65°C, and 65°C to 95°C at 2°C/ sec to determine dissociation curves of the amplified products. For each measurement, a threshold cycle value (Ct) was determined. This was defined as the number of cycles necessary to reach a point in which the fluorescent signal is first recorded as statistically significant above background. $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ values ≤ 0.5 or ≥ 1.5 were considered significant for down- or up- regulated levels respectively. The mRNA level relative to that of $\beta 2$ -

microglobulin (PPH01094E) was analyzed using the comparative critical threshold ($\Delta\Delta Ct$) method in which the amount of target RNA is adjusted to a reference (internal target RNA). The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method as previously described (30).

Results

ADAS cells undergo neurogenic differentiation *in vitro*

Induction of ADAS cells with Woodbury's protocol, containing β -mercaptoethanol (BME), dimethylsulfoxide (DMSO) and butylated hydroxyanisole (BHA) result in a responsive cells assumed neuronal morphological characteristics within 24 hs of induction (31). In induced ADAS cells we observed changes in morphology in the most cells (90-95%) by optical microscopy (Figure 1). These changes show neuronal morphological characteristics. To confirm if the morphological changes are related to neural induction, the expression of neuronal markers (nestin, NSE, GFAP, and S100) was measured by immunohistochemistry staining (Table 1). Expression of NSE (78%) was observed in the most cells with neuronal morphological characteristics and nestin (8%) expression was observed in cells with similar morphological characteristic. Expression of GFAP was less than 1% and S100 was not observed in differentiated cells. The expression of nestin, GFAP and NSE mRNAs were quantified by qRT-PCR (Figure 2) GFAP and NSE expression was significantly up regulated in induced cells ($P < 0,02$) however, nestin mRNA expression was very variable among the samples analyzed.

Genotoxicity assays

Comet assay is a versatile technique for detecting a wide variety of DNA altering lesions. Electrophoresis at pH alkaline facilitates the detection of single and double strand breaks, incomplete excision repair sites and cross links (23, 32). When comet assay was performed with induced and control cells, it was possible to observe an increase in damage frequency and damage index, especially in the neuronal-induced cells (Table 2). Indicated that neuronal induction medium can be genotoxic to ADAS cells.

In the micronuclei test, differences were not observed between neuronal-induced and control cells, both showing a micronuclei frequency of 0.001% per 1,000 cells evaluated. In addition, the MTT assay did not show any difference between control and neural-induced cells (Figure 3), indicating that this induction medium does not interfere with cell viability.

Expression of proteins related with DNA damage, chromatin remodeling and DNA replication

After 24 h of neural induction the expression of ATM, ATR, TRRAP, TIP60, MCM2, MCM3, and gamma-H2AX were analyzed by immunocytochemistry (Table 3). Expression of ATM, ATR TRRAP, MCM2 and gamma-H2AX were the same in non-induced and induced cells. However, TIP60 expression shows cytoplasmatic *foci* expression in non-induced and induced cell, but a characteristic high expression in induced cells was observed (Table 3). The expression of MCM3 was observed in both induced and non-induced cells but, the nuclear expression of MCM3 was characteristic more intensive in induced cells. (Table 3).

Expression of telomerase mRNA

The telomerase mRNA expressions by qRT-PCR was observed in Figure 4. Telomerase expression was significantly up regulated in induced cells ($P=0.0026$). This result demonstrated that neural induced medium increase the telomerase expression in ADAS cells.

Discussion

Our observations indicate that ADAS cells retain the capacity to express specific proteins from non-mesenchymal derivatives, specifically neurons, suggesting that intrinsic genomic mechanisms of commitment, lineage restriction, and cell fate can be reprogrammed using specific culture medium. After 24 hours of exposure to neuronal inducing medium, it was possible to observe morphological changes in ADAS cells in a similar manner as described by

Woodbury et al. (31). These experiments confirm that ADAS cells retain the capacity to express neuronal proteins, nestin and NSE by Immunocytochemistry and mRNA GFAP and NSE by qRT-PCR. Several studies observed multiple molecular markers being expressed simultaneously (2-5). As reviewed in Franco-Lambert et al. the simultaneous expression of both nestin (a marker of immature neural cells) and NSE (marker that indicates the presence of mature neural cells) is considered unusual and is not an indicative of differentiation per se (33). The fact that human ADAS cells express neuron-specific proteins in addition to the increased expression of several early neuronal and glial markers is not a proof that these cells will ultimately differentiate into mature neurons. Other important issue is the fact that there is a pool of heterogeneous cell population in culture where each cell population can express different types of marker (33). This pool of heterogeneous cells can explain a variability of nestin mRNA expression in the samples.

It should be noted that the efficacy of neural induction medium is dependent of the different chemical compounds, especially strong antioxidants substances like BME and BHA. The precise mechanisms by which BME induces neuronal differentiation are unclear, and its antioxidant properties, which enhance neuronal survival *in vitro* may be partially responsible for neuronal induction (34). In addition, Woodbury et al. (2000) treated bone marrow stem cells with DMSO, BHA, or butylated hydroxytoluene (BHT) alone and in combination. Each treatment elicited neuronal morphologies with a time course similar to that of BME, with the treatment with 2% DMSO and 200 mM BHA (DMSO/BHA) being the most effective (31). However, Lu et al. (2004) showed that exposure to BME results in progressive cell death over time, while BHA has cytotoxic effects in different cells lines (35-38). Moreover, it was suggested that a combination of DMSO with BHA could have synergistic cytotoxic effects on MSCs (38). On the other hand, BME induces protection against DNA fragmentation in embryos, stored in order to prevent damages induced by oxidative stress (39, 40). BHA is an antimutagenic and antigenotoxic agent *in vitro* (41, 42). Thus, the cytotoxic effects of BME or DMSO/BHA are controversial.

The results obtained in our genotoxicity assays suggest that an increase in the DNA damage observed by comet assay is induced by chemicals present in neural induction medium. The micronucleus assay has emerged as one of the preferred methods for assessing

chromosome damage because it enables both chromosome loss and chromosome breakage to be measured reliably (27). The study of DNA damage at the chromosome level is an essential part of genetic toxicology because chromosomal mutation is an important event in carcinogenesis. Moreover, the cells retain their viability as demonstrated by MTT assay. The maintenance of genomic stability in stem cells is a major requirement for its use regenerative medicine. The increased in mutation rates or an absence of DNA repair may give rise to failures in stem cell differentiation or even cancer stem cell induction. Thus, the study of the major proteins related to DNA repair and/or chromatin remodeling is necessary in order to verify the integrity of stem cells' genome.

ATM normally exists in an inactive dimeric form and upon DNA damage ATM is autophosphorylated and converted to an active, monomeric form that signals the existence of DNA lesions to downstream mediators. One well characterized target of ATM is the histone variant H2AX, which becomes phosphorylated at the C-terminus almost immediately after DNA damaging stimuli, such as ionising radiation (the phosphorylated form is termed gamma-H2AX) and acts as a landmark for DNA repair enzymes. Our results showed that gamma-H2AX expression was not observed in both induced and non-induced cells and ATM had similar expression in induced and non-induced cells by immunocytochemistry (Table 3). These results indicate that the DNA damage observed in comet assay possibly is not due to DSB. Moreover, this data corroborate the findings of Biton et al. (2007) suggesting that ATM may not have a critical role in neuronal differentiation in the conditions used.

Acetylation of ATM by TIP60 is required for efficient ATM autophosphorylation and upregulation of ATM kinase activity. The catalytic activity of TIP60 is stimulated in response to DNA damage, but does not appear to be regulated by ATM, which leads to the speculation that TIP60 functions upstream of ATM, sensing DNA damage-caused chromatin changes and signaling them to ATM (19). In our immunocytochemistry results, TIP60 expression did not presents a nuclear localization, but show cytoplasmatic *foci* expression in both non-induced and induced cell (Table 3), with a characteristic higher foci expression in induced cells (Table 3). It is known that TIP60 are predominantly nuclear proteins involved in nuclear processes (43-46), but in some cases TIP60 has been found to localize in the cytoplasm associated to internalized

membrane receptors, like IL-9 receptor, and thus regulating downstream kinase pathways or gene expression mechanisms, and proliferation, growth regulation and inhibition of apoptosis (19).

No differences were observed in the expression of MCM2 between induced and non-induced cells by immunocytochemistry (Table 3). However, it was possible to visualize a characteristic high nuclear expression of MCM3 in induced cells by immunocytochemistry. The MCM proteins are required for processive DNA replication and are a target of S-phase checkpoints, whose loss causes DNA damage and genome instability. One major mechanism by which the MCM proteins promote genome stability is by limiting DNA replication to once per cell cycle (47). This crucial role makes MCM proteins potential targets for cellular oncogenes, which inhibit or deregulate the replication process. Deregulation of MCM activity might, therefore, contribute to abnormal cell proliferation and accompanying genome instability. The deregulation of DNA synthesis and increased levels of cellular proliferation in tumors are associated with increased expression of both the MCM kinase Cdc7/Dbf4 and MCM proteins (48-50). This could be a consequence of increased replication in tumor cells, but MCM proteins also appear to be specifically targeted by oncogene activation (51). MCM proteins are highly expressed, not only in actively replicating cells, but also in cells with the potential to proliferate; recent diagnostic assays support a strong correlation between precancerous cells and cells that express high levels of MCM proteins (52-54). MCM proteins are, therefore, sensitive molecular markers for cells that have the capacity for proliferation and, as such, they may be used to identify precancerous cells before they become malignant (55).

Considering the fact that adult stem cells in general tend to give rise to a high number of daughter cells, one would expect, that adult stem cells would also express high amounts of telomerase. There is a general agreement that embryonic stem cells express a high level of telomerase and therefore maintain telomere length (56). As for adult stem cells, the picture is less clear. Highly sensitive telomerase assays have demonstrated very low levels of telomerase in most adult stem cells, but common for probably all adult stem cells is that telomeres are slowly shortened during life (57). Our results show an expression of telomerase mRNA was higher in induced cells. In normal differentiation of stem cell was expected higher telomerase

activity in non-differentiated cells that are more stemness. In this sense, it is known that telomerase activity has been found in almost all human tumors but not in adjacent normal cells and maintenance of telomere stability is required for the long-term proliferation of tumor cells. The escape from cellular senescence and thus becoming immortal by activating telomerase is required by most tumor cells for their ongoing proliferation (58).

Considering the expression of MCM3, TIP60, telomerase and the variety of expression of neuronal marker the neural induced medium used in this work may be drive the ADAS cells to malignant differentiation (not normal neural differentiation). The process of malignant transformation requires an initial step of immortalization and subsequent acquisition of the full malignant phenotype; different events are necessary to drive different cell types to malignancy (number of mutational events, oncogene expression levels, epigenetic changes, such as DNA methylation and more) (59). It may be possible that cells from older donors or individuals with inherited defects affecting MSCs, or different intrinsic biological factors, are more prone to malignant transformation. This results alert to the importance of developing studies related to differentiation and cell integrity before using these cells for human therapies. The maintenance of genomic stability in stem cells is a major requirement for its use regenerative medicine. Our findings indicate the importance of biosafety studies of mesenchymal stem cell biology to efficiently exploit their full clinical therapeutic potential.

Acknowledgments

This research was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (research grant number 552239/2005-4).

References

1. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007 May 11;100(9):1249-60.

2. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun 7;294(2):371-9.
3. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
4. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*. 2003 May;111(6):1922-31.
5. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, Mosna F, et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 2007 Feb;40(2):382-90.
6. Peterson CL, Cote J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*. 2004 Mar 15;18(6):602-16.
7. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2002 May 1;32(9):804-12.
8. Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006 Jul-Sep;7(3):165-72.
9. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
10. Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*. 2008 Sep;26(9):2266-74.
11. Andressoo JO, Hoeijmakers JH, Mitchell JR. Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell Cycle*. 2006 Dec;5(24):2886-8.
12. von Zglinicki T, Burkle A, Kirkwood TB. Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol*. 2001 Jul;36(7):1049-62.
13. Wilson DM, 3rd, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):544-59.
14. Hammond EM, Giaccia AJ. The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1117-22.

15. Mathews LA, Crea F, Farrar WL. Epigenetic gene regulation in stem cells and correlation to cancer. *Differentiation*. 2009 Jul;78(1):1-17.
16. Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen AK, Henriques JA. What histone code for DNA repair? *Mutat Res*. 2008 Mar-Apr;658(3):259-70.
17. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):959-67.
18. Herceg Z, Li H, Cuenin C, Shukla V, Radolf M, Steinlein P, et al. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the HAT cofactor Trrap in conditional knockout cells. *Nucleic Acids Res*. 2003 Dec 1;31(23):7011-23.
19. Sapountzi V, Logan IR, Robson CN. Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(9):1496-509.
20. Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Apr;18(2):130-6.
21. Labib K, Diffley JF. Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Feb;11(1):64-70.
22. Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jun;8(6):450-8.
23. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett*. 1997 Feb 7;90(2-3):183-8.
24. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91.
25. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
26. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res*. 2007 Feb 3;627(1):31-5.
27. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.

28. Matsuoka A, Yamazaki N, Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. *Mutat Res.* 1992 Dec;272(3):223-36.
29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
31. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000 Aug 15;61(4):364-70.
32. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26(3):249-61.
33. Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pegas Henriques JA. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation.* 2009 Mar;77(3):221-8.
34. Ishii K, Katayama M, Hori K, Yodoi J, Nakanishi T. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. *Neurosci Lett.* 1993 Dec 12;163(2):159-62.
35. Kirlin WG, Cai J, DeLong MJ, Patten EJ, Jones DP. Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *J Nutr.* 1999 Oct;129(10):1827-35.
36. Yu R, Mandlekar S, Kong AN. Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Mol Pharmacol.* 2000 Aug;58(2):431-7.
37. Sarafian TA, Kouyoumjian S, Tashkin D, Roth MD. Synergistic cytotoxicity of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and butylated hydroxyanisole. *Toxicol Lett.* 2002 Jul 21;133(2-3):171-9.
38. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res.* 2004 Jul 15;77(2):174-91.
39. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol.* 1999 Jan;38(1):65-81.

40. Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, Youngs CR. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. *Biol Reprod.* 1996 Nov;55(5):1179-84.
41. Horvathova E, Slamenova D, Bonatti S, Abbondandolo A. Reduction of genotoxic effects of MNNG by butylated hydroxyanisole. *Neoplasma.* 1999;46(6):356-62.
42. Slamenova D, Horvathova E, Robichova S, Hrusovska L, Gabelova A, Kleibl K, et al. Molecular and cellular influences of butylated hydroxyanisole on Chinese hamster V79 cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: antimutagenicity of butylated hydroxyanisole. *Environ Mol Mutagen.* 2003;41(1):28-36.
43. Yamamoto T, Horikoshi M. Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem.* 1997 Dec 5;272(49):30595-8.
44. Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 2001 Jul 6;293(5527):115-20.
45. Gavaravarapu S, Kamine J. Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Mar 24;269(3):758-66.
46. Ran Q, Pereira-Smith OM. Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (Tip60), Tip60(beta). *Gene.* 2000 Nov 27;258(1-2):141-6.
47. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:333-74.
48. Hess GF, Drong RF, Weiland KL, Slightom JL, Sclafani RA, Hollingsworth RE. A human homolog of the yeast CDC7 gene is overexpressed in some tumors and transformed cell lines. *Gene.* 1998 Apr 28;211(1):133-40.
49. Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):2121-32.
50. Kumagai H, Sato N, Yamada M, Mahony D, Seghezzi W, Lees E, et al. A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):5083-95.

51. Shohet JM, Hicks MJ, Plon SE, Burlingame SM, Stuart S, Chen SY, et al. Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2002 Feb 15;62(4):1123-8.
52. Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):14932-7.
53. Tan DF, Huberman JA, Hyland A, Loewen GM, Brooks JS, Beck AF, et al. MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer.* 2001;1:6.
54. Sirieix PS, O'Donovan M, Brown J, Save V, Coleman N, Fitzgerald RC. Surface expression of minichromosome maintenance proteins provides a novel method for detecting patients at risk for developing adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2560-6.
55. Bailis JM, Forsburg SL. MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Feb;14(1):17-21.
56. Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn.* 2004 Feb;229(2):243-58.
57. Serakinci N, Graakjaer J, Kolvraa S. Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells. *Biochimie.* 2008 Jan;90(1):33-40.
58. Rubio D, Garcia S, Paz MF, De la Cueva T, Lopez-Fernandez LA, Lloyd AC, et al. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE.* 2008;3(1):e1398.
59. Choumerianou DM, Dimitriou H, Perdikogianni C, Martimianaki G, Riminucci M, Kalmanti M. Study of oncogenic transformation in ex vivo expanded mesenchymal cells, from paediatric bone marrow. *Cell Prolif.* 2008 Dec;41(6):909-22.

Figures

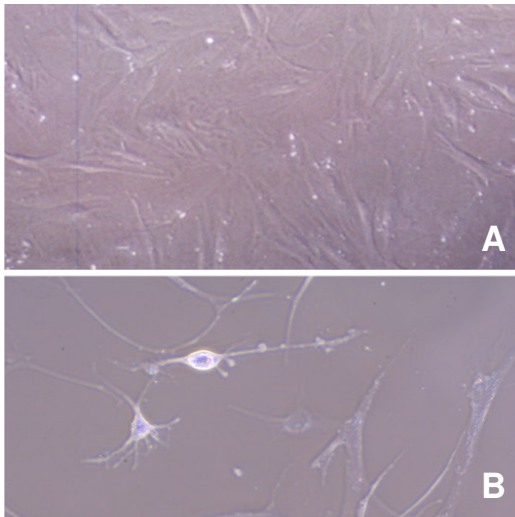


Figure 1. Morphologic changes following neuronal induction of ADAS cells. **A:** ADAS cells grown under control conditions (DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin) grow as a monolayer of large, flat cells. **B:** ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium display cytoplasmic retraction and a spherical cell body appearance (All images were obtained at 200 X magnification).

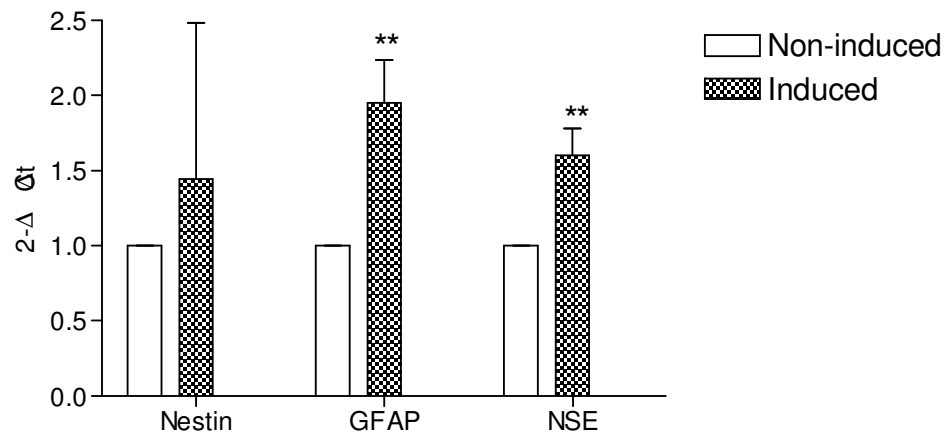


Figure 2. Expression of Neuronal Markers genes in non-induced and induced ADAS cells. **Non-Induced** - ADAS cells grown under control conditions in DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin. **Induced**- ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium. **($P < 0.003$).

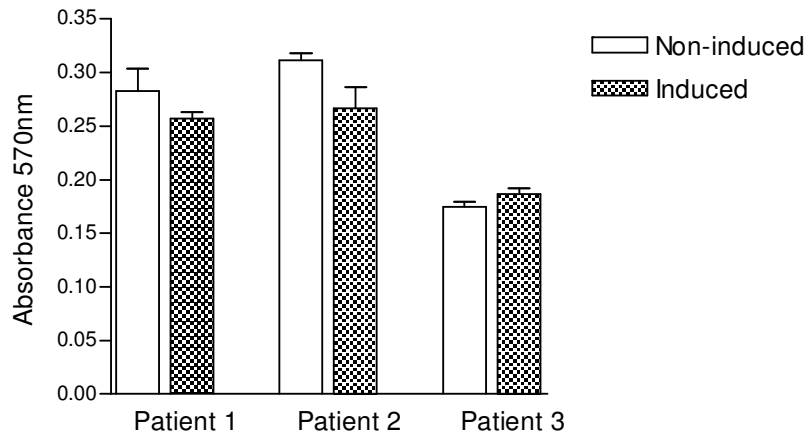


Figure 3. The cell viability after 24 h exposure to neural induced medium. The relative number of cell per well was determined by MTT assay. The data presented is the mean percentage cell viability \pm SD. **Non-induced** - ADAS cells grown under control conditions in DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin. **Induced**- ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium.

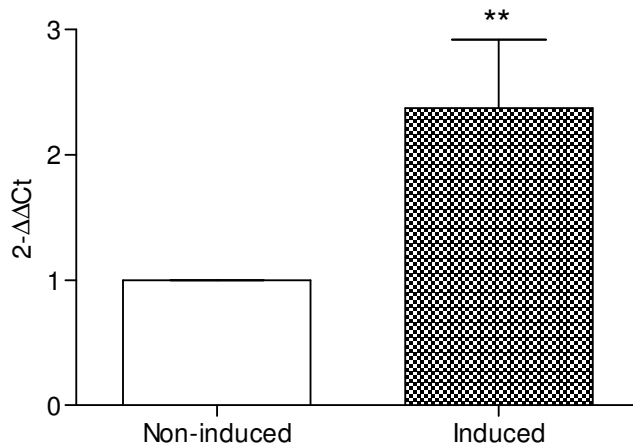
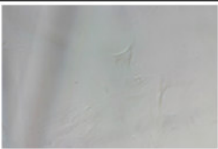
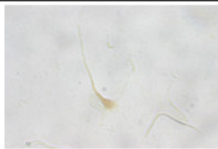

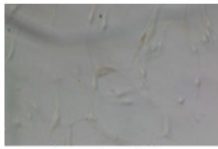
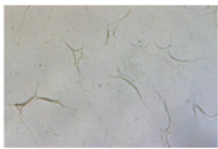
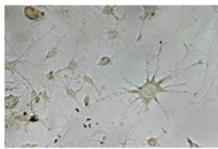
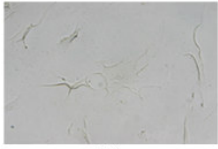
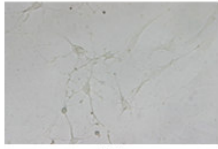


Figure 4. Expression of Telomerase mRNA in non-induced and induced ADAS cells. **Non-induced**- ADAS cells grown under control conditions in DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin. **Induced**- ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium. ******($P < 0.0026$).

Tables

Table 1. Immunocytochemistry of ADAS cells for neuronal and glial markers. Non-induced - ADAS cells grown under control conditions in DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin. **Induced**- ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium. Diamino benzidine (DAB) served as a brown chromagen. The percentage of cells showing specific immunolabeling were quantified in three randomly selected fields at 200× with a bright field microscope. The number of cells positive immunolabeling was divided by the total number of cells in the same field as determined by phase optics to obtain the percentage of cells that were immunolabeled. (All images were obtained at 200 X magnification).

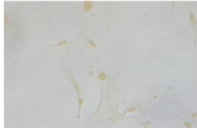
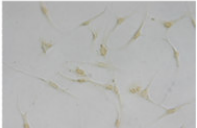
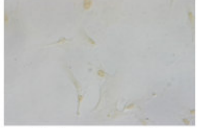
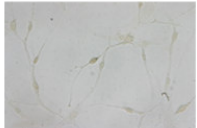
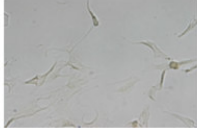


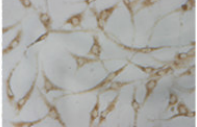
Cell Marker*	Specificity	Mean percentage of positive label cells	
		Non-induced	Induced
NESTIN	marker of immature neural cells	 0%	 8%
GFAP	mature glial cells (astrocyte)	 0%	 Less than 1%
NSE	early neuronal	 0%	 78%
S100	nuclei of astrocytes and Schwann cells	 0%	 0%

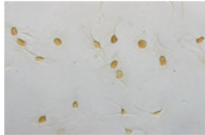
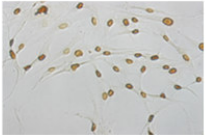
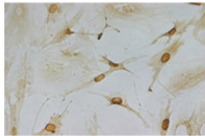
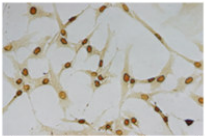
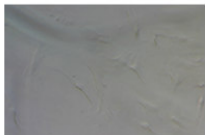
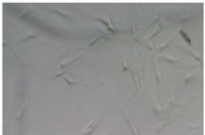
* GFAP (glial fibrillary acidic protein), NSE (neuron specific enolase)

Table 2- Evaluation of DNA damage by comet assay. Non-induced- ADAS cells grown under control conditions in DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin
Induced- ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium.

Patients	Damage frequency (DF)		Damage index (DI)	
	Non-induced	Induced	Non-induced	Induced
1	13.0 ± 5.44	23.8 ± 6.61	17.5 ± 3.88	33.0 ± 3.74
2	25.0 ± 10.80	51.5 ± 9.74	26.8 ± 12.20	72.8 ± 26.40
3	22.3 ± 9.07	67.0 ± 14.40	24.0 ± 11.10	165.6 ± 66.90

Table 3. Expression of proteins related with DNA damage signaling, chromatin remodeling and proliferation by immunocytochemistry. Non-induced - ADAS cells grown under control conditions in DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin.
Induced- ADAS cells after 24 h culture in neuronal induction medium. Diamino benzidine (DAB) served as a brown chromagen. (All images were obtained at 200 X magnification).

Proteins	Putative function	Characteristic of label cells	
		Non induced	Induced
ATM	detection of DNA damage	 Nuclear expression	 Nuclear expression
ATR	cell cycle progression, DNA recombination, detection of DNA damage	 Nuclear expression	 Nuclear expression
TRRAP	cell cycle progression, detection of DNA damage	 No or Low Nuclear expression	 No or Low Nuclear expression
TIP60	HAT that regulates chromatin remodeling and transcription	 Cytoplasmatic in foci expression	 Higher cytoplasmatic in foci expression

Proteins	Putative function	Characteristic of label cells	
		Non induced	Induced
MCM2	regulators of DNA replication	 <p>Nuclear expression</p>	 <p>Nuclear expression</p>
MCM3	regulators of DNA replication	 <p>Cytoplasmatic and nuclear expression</p>	 <p>Cytoplasmatic and higher nuclear expression</p>
α H2AX	mark of DSB	 <p>No expression</p>	 <p>No expression</p>

HAT-histone acetyltransferase, DSB- Double-strand breaks.

V-

DISCUSSÃO GERAL

Nesta discussão geral serão abordados alguns pontos importantes, relacionados aos capítulos 1 e 2 desta tese. Também serão discutidos alguns resultados apresentados no anexo 2 desta tese (resultados de qRT-PCR para proteínas sinalização de danos no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular em células-tronco derivadas do tecido adiposo induzidas para células neurais).

As implicações do processo de neurodiferenciação *in vitro*

Os avanços recentes dos estudos sobre a biologia das células-tronco vão ao encontro dos conceitos de medicina regenerativa. Esta área de pesquisas está centrada no potencial uso das células-tronco para o desenho de terapias voltadas para a reparação de lesões teciduais. Além de lesões, estas mesmas terapias poderão ser usadas para o tratamento de desordens de natureza degenerativa que estão associadas à perda de células-tronco adultas, como doenças hematológicas, cardiovasculares, musculares e neurológicas. Um exemplo claro da aplicação potencial das terapias regenerativas é no sistema nervoso. Diferente de muitos outros tecidos, o sistema nervoso tem uma capacidade limitada de auto-reparação. As células nervosas maduras apresentam-se incapazes em regenerar o tecido lesionado e as células-tronco neurais apresentam uma limitada habilidade para gerar neurônios funcionais em resposta a uma lesão. A maioria dos tratamentos das lesões neuronais limita-se ao alívio dos sintomas e a prevenção de danos adicionais. Por esta razão, há grande interesse na possibilidade de reparação do sistema nervoso por células neurais produzidas *in vitro*.

Ao elaborar o artigo de revisão “*Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: Does it work?*” publicado no periódico *Differentiation* (Capítulo 2) foi possível compreender o “estado-da-arte” relacionado ao processo de diferenciação de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo *in vitro*. Um grande número de protocolos e uma grande variabilidade nos resultados já foram descritos em relação ao processo de diferenciação neural *in vitro* (Franco Lambert et al., 2009). A grande variabilidade na morfologia das células induzidas e no perfil de expressão das proteínas neurais observadas por diferentes grupos de pesquisas é, provavelmente, em função dos diferentes protocolos usados, do número de passagens, da densidade celular, da idade do doador, do tempo que permanecem em cultura, entre outros fatores.

Com o objetivo de verificar a indução neural, a maioria das pesquisas têm usado imunocitoquímica ou imunodeteção (*western blotting*) para detectar proteínas específicas e/ou RT-PCR para o seu respectivos mRNAs (veja tabela 3, do Capítulo 1) (Franco Lambert et al., 2009). No Capítulo 2, o processo de diferenciação foi observado pelas mudanças morfológicas e confirmado por meio da expressão de marcadores neuronais como nestina GFAP, NSE por imunocitoquímica e pela quantificação do mRNA por qRT-PCR. No entanto, um neurônio maduro no sistema nervoso central não pode ser definido com tal por suas características citológicas, nem pela expressão de proteínas específicas. O fator mais importante que define a funcionalidade de um neurônio é a sua excitabilidade ou a sua habilidade de ativar o potencial de ação e, assim, comunicar-se com outras células através de neurotransmissores nas sinapses (Lu e Tuszynski, 2005). Na revisão de Lu e Tuszynski (2005) foram

apresentados alguns estudos que demonstraram que neurônios funcionalmente maduros podem ser gerados *in vitro* a partir de células-tronco embrionárias e células-tronco neurais adultas ou embrionárias (Lu e Tuszynski, 2005). Com relação às células-tronco derivadas do tecido adiposo, até o momento nenhum grupo produziu evidências claras de que essas células sejam capazes de transdiferenciarem-se em neurônios maduros e funcionais *in vitro* (Franco Lambert et al., 2009). Talvez este processo não possa ser completado totalmente *in vitro*, considerando a complexidade de um neurônio e a precisão necessária para o desenvolvimento da neurogênese. No entanto, as células em um processo inicial de neurodiferenciação talvez possuam um papel importante na medicina regenerativa e possam ser aplicadas para a reparação dos tecidos e prevenção de doenças. Segundo Croft et al. (2009), o tratamento de lesões cerebrais com células-tronco neurodiferenciadas *in vitro* apresentou um aumento da neurogênese no local da lesão quando comparado com o tratamento com células-tronco não diferenciadas (Croft e Przyborski, 2009). Estes achados corroboram a hipótese de que as células, em um processo inicial de diferenciação, podem ser capazes de completar o desenvolvimento *in vivo* e trazer benefícios na regeneração dos tecidos.

A reparação do DNA e remodelagem de cromatina na manutenção das células-tronco adultas

A estabilidade genética das células-tronco é essencial tanto para a sua auto-renovação quanto para a sua capacidade de diferenciação em outros tipos celulares (Cai et al., 2004; Park & Gerson, 2005). As células-tronco conservam

a sua integridade genômica de uma forma muito superior a das células diferenciadas de um organismo adulto, indicando a existência de uma base fisiológica para a manutenção de células-tronco adultas (Park & Gerson, 2005). Esta estabilidade genômica deve ser mantida, principalmente por meio de mecanismos de reparação de DNA (Park & Gerson, 2005), que reconhecem e reparam os danos presentes no genoma.

Estudos de expressão gênica demonstraram que os genes de reparação de DNA apresentam uma expressão muito mais elevada em diferentes populações de células-tronco quando comparado com células diferenciadas. Como exemplos de genes de reparação de DNA super-expressos em células-tronco podem ser citados o *XPG*, *KU80*, *MSH2*, e *RAD23B* (Ramalho-Santos et al., 2002) ou *XRCC1/LIG3*, *ERCC2/XPD*, e *MSH2* (Ivanova et al., 2002), pertencentes às vias de excisão e de recombinação. No nosso estudo foi observado uma maior expressão de *ATR*, *TRRAP*, *TIP60* e *MCM2* por qRT-PCR em células-tronco (Anexo 2). Além disso, ao analisar os resultados do teste cometa, que detectou um aumento na frequência e no índice de dano nas células-tronco induzidas (Capítulo 2), percebeu-se que a perda da “stemness” poderia estar influenciando esse aumento de danos.

Uma questão importante para o entendimento da biologia das células-tronco é saber como se mantém o “pool” de células-tronco adultas e como ocorre a renovação dessas células. Estudos recentes indicam que modificações nas histonas têm um papel essencial no estabelecimento e na propagação de diferentes padrões de expressão de genes necessários para a manutenção desse conjunto (Bernstein et al., 2006; Buszczak e Spradling,

2006). A importância do estado da cromatina na manutenção da pluripotencialidade das células-tronco foi ilustrada pelo fato de que “virtualmente” todas as células podem ser convertidas a estágios mais imaturos com alto potencial de diferenciação (Niwa, 2007). Segundo os estudos de Loizou *et al*, (2009) a proteína TRRAP apresenta uma função essencial na manutenção das células-tronco hematopoiéticas e na homeostasia do sistema hematopoiético (Loizou et al., 2009). Além disso, achados recentes usando a tecnologia de RNAi revelaram que TIP60 é necessária para a pluripotencialidade das células-tronco embrionárias e que tem a função de reprimir vários genes que são expressos durante o processo de diferenciação (Fazio et al., 2008). Com esses achados, podemos supor que uma diminuição na expressão de *TIP60* e *TRRAP* são necessárias para a indução da diferenciação, o que corrobora com nossos achados de qRT-PCR (anexo 2). Contudo, o mecanismo exato de como as proteínas remodeladoras de cromatina alteram a fisiologia das células-tronco ainda é amplamente desconhecido (Park & Gerson, 2005).

Evidências sobre o processo de reparação do DNA, remodelagem de cromatina e expressão da telomerase na neurogênese das células-tronco

O sistema nervoso é formado de neurônios pós-mitóticos e de células mitóticas da glia. Por serem células excitáveis e com alta demanda metabólica, estas são submetidas a altos níveis de estresse oxidativo. A sensibilidade dos

neurônios a uma resposta debilitada aos danos do DNA é demonstrada em desordens humanas hereditárias causadas por mutações em proteínas de reparação do DNA. Como exemplo pode-se citar a ataxia telangectasia (AT), na qual ocorre degeneração dos neurônios cerebelares e a Síndrome de Cockayne, onde várias partes do sistema nervoso sofrem danos (Rotman e Shiloh, 1997; Brooks, 2002). Os camundongos deficientes em algumas enzimas de reparação do DNA, como a subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA (DNA-Pkcs) e da uracil DNA glicosilase (UDG), exibem aumento da vulnerabilidade a danos oxidativos, metabólicos e excitotóxicos (Culmsee et al., 2001; Kruman et al., 2004a). Outros achados sugerem que neurônios pós-mitóticos podem sofrer apoptose quando eventos do ciclo celular são ativados de forma aberrante (Culmsee et al., 2001; Herrup et al., 2004). Kruman et al. (2004) perceberam que os danos no DNA podem ativar uma re-entrada no ciclo celular de neurônios pós-mitóticos terminalmente diferenciados. (Kruman et al., 2004b; Zhang et al., 2007). Deve ser ressaltado que, na presente tese, não foi verificada diferenças na expressão de ATM em células induzidas e não-induzidas por imunocitoquímica (Capítulo 2). Entretanto, para a expressão do mRNA da *ATM* por qRT-PCR, as amostras não apresentaram o mesmo padrão de expressão. Um dos pacientes apresentou aumento e os outros dois apresentaram diminuição da expressão de *ATM* nas células induzidas (anexo 2). No entanto, percebemos uma diminuição na expressão de proteínas de sinalização do dano no DNA, de remodelagem de cromatina e proliferação celular (*ATR*, *TRRAP*, *TIP60*, *MCM2*.) nas células induzidas para tecido neural por qRT-PCR (anexo 2). Esta diminuição da expressão pode ser considerada como um mecanismo de

sobrevivência da célula neuronal, por não levar a ativação dos mecanismos de reparação do DNA, que resultariam na apoptose das células.

Alguns autores demonstram que as células-tronco neurais, bem como os neurônios pós-mitóticos recém gerados, são particularmente vulneráveis a danos no DNA, indicado pela presença em larga escala de quebras duplas no DNA e de morte celular no início do desenvolvimento do sistema nervoso (Gilmore et al., 2000; Zhang et al., 2007). No presente estudo foi observado um aumento do índice e da frequência de danos em células que sofreram indução neural. No entanto, a presença de quebras duplas no DNA não foi confirmada pela presença da proteína gama-H2AX, o que também justificaria a expressão diminuída de *ATM* em dois pacientes. Como a maioria das células somáticas, os neurônios e os astrócitos completamente diferenciados são deficientes da atividade da enzima telomerase (Klapper et al., 2001; Flanary e Streit, 2004). No entanto, alguns estudos mostram que quando submetidos ao estresse oxidativo, hipoxia e citotoxicidade, a expressão da TERT e a atividade da telomerase aumentam em astrócitos (Flanary e Streit, 2004), neurônios (Kang et al., 2004) e células da microglia (Fu et al., 2002; Flanary e Streit, 2004). Contudo, a função da reativação da indução da telomerase pelo estresse não está claro. Masutomi et al. (2005) sugerem que a reativação poderia estar envolvida no reparação do DNA e na remodelagem de cromatina (Masutomi et al., 2005). Além disso, algumas evidências sugerem que a telomerase apresenta outras atividades além das teloméricas, como mediadoras da sobrevivência celular e das funções anti-apoptóticas contra vários tipos de estresses citotóxicos (Mattson et al., 2001; Chung et al., 2005).

Segundo Zhang et al (2007), durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os danos no DNA irão recrutar proteínas associadas aos telômeros, como a telomerase e TRF2, para regiões não teloméricas dos cromossomos, onde teriam como função o reparação do DNA e a remodelagem de cromatina (Zhang et al., 2007). O deslocamento do TRF2 dos telômeros pode contribuir para efeitos nos genes vizinhos dos telômeros, incluindo aqueles que codificam enzimas envolvidas na neurogênese (Ai et al., 2002). Além disso, Zhang et al observaram associação entre o dano no DNA e a diferenciação neural (Zhang et al., 2007). Durante a neurogênese, as alterações no padrão de silenciamento telomérico podem ser relacionadas com mudanças no padrão de transcrição. Os telômeros são replicados ao final da fase "S". Acredita-se que no início da fase "S" existam condições necessárias para que a transcrição ocorra, e no final da replicação os genes estariam envolvidos na cromatina, tornando-se transcricionalmente inativos (Zhang et al., 2007). Achados recentes demonstraram que alguns genes específicos da neuroectoderma podem mudar da fase tardia para a fase precoce de replicação, e assim se tornarem transcricionalmente ativos (Hiratani et al., 2004).

Um melhor entendimento da manutenção dos telômeros em células-tronco neurais e em neurônios pós-mitóticos irá ajudar no esclarecimento dos mecanismos de sobrevivência neural e de diferenciação na neurogênese, e poderá acrescentar para o desenvolvimento de novas estratégias para a aplicação das células-tronco para o tratamento de desordens neurológicas.

Evidências da transformação maligna no processo de diferenciação das células-tronco

A maioria das células cancerosas e alguns tipos de células-tronco apresentam a enzima telomerase, a qual é composta pela transcriptase reversa (TERT) e componente de RNA (TER). (Zhang et al., 2007). Diferentemente do esperado, foi observada uma maior expressão de telomerase nas células diferenciadas (Figura 4, Capítulo 2). Além disso, o meio de indução usado, bem como uma maior expressão nuclear de MCM3 e uma maior expressão citoplasmática *in foci* de TIP60 em células induzidas (Tabela 3, capítulo 2) remete à possibilidade de que estas células poderiam estar passando por um processo de transformação, isto é, uma diferenciação neural anormal. Sabemos que o processo de transformação maligna requer um passo inicial de imortalização e subsequente aquisição de fenótipos malignos. Vários eventos são necessários para a formação de células malignas, entre eles podemos citar: (i) mutações; (ii) expressão de oncogenes e (iii) efeitos epigenéticos, como metilação do DNA. Existem várias evidências experimentais mostrando que as células-tronco adultas estão envolvidas na formação dos mais agressivos cânceres humanos (Bapat et al., 2005; Ginestier et al., 2007; Mimeault et al., 2007; Aubert e Lansdorp, 2008). Em função da longevidade e da alta capacidade de proliferação, as células-tronco adultas são capazes de acumular alterações genéticas e epigenéticas que podem, subsequentemente, resultar em sua disfunção e na sua transformação em células-tronco tumorais (Mimeault et al., 2007). Novos conceitos sobre células-troncos tumorais sugerem que a maioria das células cancerosas e suas progênies malignas são dotadas de um alto potencial de auto-renovação e habilidade em diferenciação

anormal. As células-tronco tumorais têm um papel crítico na determinação do crescimento de tumor primário, de metástases nos tecidos em órgãos distantes, de resistência às terapias convencionais e na presença de recidivas da doença (Ginestier et al., 2007; Mimeault et al., 2007; Fillmore e Kuperwasser, 2008; Matsui et al., 2008). Essas evidências inviabilizam a possibilidade de transplante de células-tronco pré-diferenciadas *in vitro* para o tratamento de pacientes. O uso das células pré-induzidas *in vitro* em pacientes só será possível frente a inúmeros estudos que comprovem a segurança, integridade/viabilidade e a capacidade de geração de neurônios funcionalmente ativos e normais. Neste sentido, a “*Stemness*” pode ser considerada uma “faca de dois gumes”, pois se por um lado pode gerar células normais, por outro pode formar células-tronco tumorais. Portanto, um melhor entendimento da biologia das células-tronco irá ajudar tanto na promissora medicina regenerativa quanto no entendimento de outros processos celulares, como o surgimento de tumores e de câncer.

VI-

CONCLUSÃO

Conclusão Geral

Pesquisas clínicas recentes e com resultados satisfatórios em um curto prazo têm levado a um aumento do uso de células-tronco para o tratamento de diversas doenças ou lesões teciduais na prática clínica. Nossos estudos apresentam evidências claras que alertam sobre a importância e necessidade de realizar estudos sobre a biologia das células-tronco durante o processo de diferenciação. As células-tronco apresentam a capacidade de proliferar e gerar novas células iguais à original ou diferenciadas. No entanto, essas células-tronco podem sofrer danos que direcionam à formação de células anormais com características malignas e à formação de células-tronco tumorais. Um maior entendimento sobre a biologia das células-tronco é necessário para avaliar quais alterações fazem parte de um processo normal ou anormal de diferenciação. Portanto, é importante ter muita cautela no uso de células-tronco cultivadas e pré-diferenciadas *in vitro*.

Conclusões específicas

- O processo de indução de células-tronco para tecido neural encontra-se sobre intensa investigação. Existem diversos sinais da capacidade de indução para tecido neural, no entanto nenhum estudo conseguiu provar a funcionalidade dos neurônios induzidos a partir de células-tronco derivadas do tecido adiposo.

- Observou-se alterações morfológicas e expressão de marcadores neurais (nestina e NSE por imunocitoquímica e *GFAP* e *NSE* por qRT-PCR) compatíveis com a indução de um processo de diferenciação neural.
- O meio de indução utilizado leva a um aumento do índice e da frequência de danos no DNA das células induzidas. No entanto, estes danos não levaram à diminuição da viabilidade celular nem à formação de micronúcleo.
- Evidências apontam uma menor expressão de *ATR*, *TRRAP*, *TIP60* e *MCM2* por qRT-PCR e o aumento do índice e da frequência de danos no DNA nas células induzidas podem estar relacionados com a perda da “*stemness*”. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmação.
- As células induzidas para tecido neural podem estar passando por um processo de diferenciação anormal por apresentarem aumento da *telomerase* por qRT-PCR, aumento da expressão *in foci* citoplasmática de *TIP60* e aumento da expressão nuclear de *MCM3* por imunocitoquímica.

VII-

PERSPECTIVAS

As conclusões sobre o estudo da integridade gênômica durante a indução da neurogênese de células-tronco derivadas do tecido adiposo, obtidas nesta tese, sugerem diversos outros estudos. Estes estudos subsequentes são necessários para melhor compreensão dos mecanismos e para melhorias no processo de indução da neurogênese. Entre estes estudos, destacam-se:

- Incrementar, com outros agentes indutores, o meio de indução da neurogênese, com a finalidade de obter um processo de indução neural mais efetivo.
- Verificar, polaridade, receptores de glutamato, sinapsinas por imunocitoquímica e por meio da eletrofisiologia, a funcionalidade das células induzidas.
- Utilizar uma linhagem de células-tronco que apresente um comportamento homogêneo em todas as células, com a finalidade de evitar a variabilidade encontrada com o uso de um “*pool*” de células derivadas do tecido adiposo.
- Testar outros meios de cultura propostos por outros autores, e verificar se os danos e a expressão das proteínas de reparação e remodelagem de cromatina apresentam o mesmo padrão de comportamento.
- Investigar a expressão de vários genes envolvidas em outros mecanismos de reparação do DNA por meio de *arrays*, para ter uma compreensão mais abrangente destes mecanismos.
- Investigar a expressão de proteínas de reparação do DNA, de remodelagem de cromatina e de proliferação celular em outros processos de diferenciação, como por exemplo, na osteogênese.

- Utilizar metodologias de alta resolução para a análise da instabilidade genômica, estruturais e funcionais nas células-tronco como: análise de metilação, captura de mutações pontuais, cariotipagem, entre outras tecnologias.
- Verificar a presença de danos oxidativos nas células induzidas.

VIII-

BIBLIOGRAFIA

Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.

Ai, W., Bertram, P. G., Tsang, C. K., Chan, T. F., and Zheng, X. F. (2002). Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* 10, 1295-1305.

Alderton, G. K., Joenje, H., Varon, R., Borglum, A. D., Jeggo, P. A., and O'Driscoll, M. (2004). Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway. *Hum Mol Genet* 13, 3127-3138.

Allard, S., Masson, J. Y., and Cote, J. (2004). Chromatin remodeling and the maintenance of genome integrity. *Biochim Biophys Acta* 1677, 158-164.

Allen, D. M., van Praag, H., Ray, J., Weaver, Z., Winrow, C. J., Carter, T. A., Braquet, R., Harrington, E., Ried, T., Brown, K. D., *et al.* (2001). Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis. *Genes Dev* 15, 554-566.

Andressoo, J. O., Hoeijmakers, J. H., and Mitchell, J. R. (2006). Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell Cycle* 5, 2886-2888.

Ashjian, P. H., Elbarbary, A. S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P. A., Lorenz, H. P., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111, 1922-1931.

Aubert, G., and Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiol Rev* 88, 557-579.

Bailis, J. M., and Forsburg, S. L. (2004). MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Curr Opin Genet Dev* 14, 17-21.

Bapat, S. A., Mali, A. M., Koppikar, C. B., and Kurrey, N. K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 65, 3025-3029.

Barry, F. P., and Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 568-584.

Bassing, C. H., Chua, K. F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S. R., Fleming, J. C., Monroe, B. C., Ciccone, D. N., Yan, C., Vlasakova, K., *et al.* (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8173-8178.

Bell, S. P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.

Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.

Biton, S., Dar, I., Mittelman, L., Pereg, Y., Barzilai, A., and Shiloh, Y. (2006). Nuclear ataxia-telangiectasia mutated (ATM) mediates the cellular response to DNA double strand breaks in human neuron-like cells. *J Biol Chem* 281, 17482-17491.

Biton, S., Gropp, M., Itsykson, P., Pereg, Y., Mittelman, L., Johe, K., Reubinoff, B., and Shiloh, Y. (2007). ATM-mediated response to DNA double strand breaks in human neurons derived from stem cells. *DNA Repair (Amst)* 6, 128-134.

Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.

Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661-673.

Bobis, S., Jarocha, D., and Majka, M. (2006). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 44, 215-230.

Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Distèche, C., Dube, I., Frischauf, A. M., *et al.* (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 14, 33-41.

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-2047.

Brooks, P. J. (2002). DNA repair in neural cells: basic science and clinical implications. *Mutat Res* 509, 93-108.

Brown, E. J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 397-402.

Buszczak, M., and Spradling, A. C. (2006). Searching chromatin for stem cell identity. *Cell* 125, 233-236.

Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213, 341-347.

Carpenter, M. K., Rosler, E. S., Fisk, G. J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., Lucero, M., and Rao, M. S. (2004). Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 229, 243-258.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5, 675-679.

Ceol, C. J., and Horvitz, H. R. (2004). A new class of *C. elegans* synMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signaling. *Dev Cell* 6, 563-576.

Champagne, N., Bertos, N. R., Pelletier, N., Wang, A. H., Vezmar, M., Yang, Y., Heng, H. H., and Yang, X. J. (1999). Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* 274, 28528-28536.

Chan, S. W., and Blackburn, E. H. (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21, 553-563.

Chanoux, R. A., Yin, B., Urtishak, K. A., Asare, A., Bassing, C. H., and Brown, E. J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem* 284, 5994-6003.

Cheng, A., Shin-ya, K., Wan, R., Tang, S. C., Miura, T., Tang, H., Khatri, R., Gleichman, M., Ouyang, X., Liu, D., *et al.* (2007). Telomere protection mechanisms change during neurogenesis and neuronal maturation: newly generated neurons are hypersensitive to telomere and DNA damage. *J Neurosci* 27, 3722-3733.

Cheng, A. S., Jin, V. X., Fan, M., Smith, L. T., Liyanarachchi, S., Yan, P. S., Leu, Y. W., Chan, M. W., Plass, C., Nephew, K. P., *et al.* (2006). Combinatorial analysis of transcription factor partners reveals recruitment of c-MYC to estrogen receptor-alpha responsive promoters. *Mol Cell* 21, 393-404.

Cheung, W. L., Briggs, S. D., and Allis, C. D. (2000). Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* 12, 326-333.

- Chong, M. J., Murray, M. R., Gosink, E. C., Russell, H. R., Srinivasan, A., Kapsetaki, M., Korsmeyer, S. J., and McKinnon, P. J. (2000). Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 889-894.
- Chung, H. K., Cheong, C., Song, J., and Lee, H. W. (2005). Extratelomeric functions of telomerase. *Curr Mol Med* *5*, 233-241.
- Cimprich, K. A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 616-627.
- Cortez, D., Glick, G., and Elledge, S. J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10078-10083.
- Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H., and Menck, C. F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* *85*, 1083-1099.
- Croft, A. P., and Przyborski, S. A. (2009). Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells. *Exp Neurol* *216*, 329-341.
- Culmsee, C., Bondada, S., and Mattson, M. P. (2001). Hippocampal neurons of mice deficient in DNA-dependent protein kinase exhibit increased vulnerability to DNA damage, oxidative stress and excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* *87*, 257-262.
- Czornak, K., Chughtai, S., and Chrzanowska, K. H. (2008). Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* *49*, 383-396.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194-198.
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., and Nardi, N. B. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *26*, 2287-2299.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* *119*, 2204-2213.
- Davie, J. R., and Spencer, V. A. (1999). Control of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* *32-33*, 141-148.

de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.

Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P., and Cote, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* 16, 979-990.

Downs, J. A., Lowndes, N. F., and Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001-1004.

Efroni, S., Duttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoepfner, D. J., Dash, C., Bazett-Jones, D. P., Le Grice, S., McKay, R. D., Buetow, K. H., *et al.* (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 437-447.

Escargueil, A. E., Soares, D. G., Salvador, M., Larsen, A. K., and Henriques, J. A. (2008). What histone code for DNA repair? *Mutat Res* 658, 259-270.

Fazio, T. G., Huff, J. T., and Panning, B. (2008). An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 134, 162-174.

Fillmore, C. M., and Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 10, R25.

Fink, M., Imholz, D., and Thoma, F. (2007). Contribution of the serine 129 of histone H2A to chromatin structure. *Mol Cell Biol* 27, 3589-3600.

Flanary, B. E., and Streit, W. J. (2004). Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia* 45, 75-88.

Fodor, W. L. (2003). Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 102.

Franco Lambert, A. P., Fraga Zandonai, A., Bonatto, D., Cantarelli Machado, D., and Pegas Henriques, J. A. (2009). Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation* 77, 221-228.

Freeman, A., Morris, L. S., Mills, A. D., Stoeber, K., Laskey, R. A., Williams, G. H., and Coleman, N. (1999). Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 5, 2121-2132.

Frosina, G. (2009). DNA repair in normal and cancer stem cells, with special reference to the central nervous system. *Curr Med Chem* 16, 854-866.

Fu, W., Lee, J., Guo, Z., and Mattson, M. P. (2002). Seizures and tissue injury induce telomerase in hippocampal microglial cells. *Exp Neurol* 178, 294-300.

Fuchs, E., and Segre, J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100, 143-155.

Garcia-Castro, J., Trigueros, C., Madrenas, J., Perez-Simon, J. A., Rodriguez, R., and Menendez, P. (2008). Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med* 12, 2552-2565.

Garner, E., and Costanzo, V. (2009). Studying the DNA damage response using in vitro model systems. *DNA Repair (Amst)* 8, 1025-1037.

Gaughan, L., Brady, M. E., Cook, S., Neal, D. E., and Robson, C. N. (2001). Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 276, 46841-46848.

Gilmore, E. C., Nowakowski, R. S., Caviness, V. S., Jr., and Herrup, K. (2000). Cell birth, cell death, cell diversity and DNA breaks: how do they all fit together? *Trends Neurosci* 23, 100-105.

Gimble, J. M., Katz, A. J., and Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100, 1249-1260.

Gimble, J. M., and Nuttall, M. E. (2004). Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine* 23, 183-188.

Ginestier, C., Korkaya, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M. S., and Charafe-Jauffret, E. (2007). [The cancer stem cell: the breast cancer driver]. *Med Sci (Paris)* 23, 1133-1139.

Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., *et al.* (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* 448, 1063-1067.

Guzinska-Ustymowicz, K., Stepień, E., and Kemon, A. (2008). MCM-2, Ki-67 and PCNA protein expressions in pT3G2 colorectal cancer indicated lymph node involvement. *Anticancer Res* 28, 451-457.

Haas, S., Weidner, N., and Winkler, J. (2005). Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* 18, 59-64.

Hande, M. P., Balajee, A. S., Tchirkov, A., Wynshaw-Boris, A., and Lansdorp, P. M. (2001). Extra-chromosomal telomeric DNA in cells from *Atm*(^{-/-}) mice and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* *10*, 519-528.

Herceg, Z., Hulla, W., Gell, D., Cuenin, C., Leonart, M., Jackson, S., and Wang, Z. Q. (2001). Disruption of *Trrap* causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Nat Genet* *29*, 206-211.

Herceg, Z., Li, H., Cuenin, C., Shukla, V., Radolf, M., Steinlein, P., and Wang, Z. Q. (2003). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the HAT cofactor *Trrap* in conditional knockout cells. *Nucleic Acids Res* *31*, 7011-7023.

Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S. L., and Copani, A. (2004). Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* *24*, 9232-9239.

Herzog, K. H., Chong, M. J., Kapsetaki, M., Morgan, J. I., and McKinnon, P. J. (1998). Requirement for *Atm* in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science* *280*, 1089-1091.

Hess, G. F., Drong, R. F., Weiland, K. L., Slightom, J. L., Sclafani, R. A., and Hollingsworth, R. E. (1998). A human homolog of the yeast *CDC7* gene is overexpressed in some tumors and transformed cell lines. *Gene* *211*, 133-140.

Hiratani, I., Leskovar, A., and Gilbert, D. M. (2004). Differentiation-induced replication-timing changes are restricted to AT-rich/long interspersed nuclear element (LINE)-rich isochores. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16861-16866.

Hong, Y., Cervantes, R. B., Tichy, E., Tischfield, J. A., and Stambrook, P. J. (2007). Protecting genomic integrity in somatic cells and embryonic stem cells. *Mutat Res* *614*, 48-55.

Houtgraaf, J. H., Versmissen, J., and van der Giessen, W. J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* *7*, 165-172.

Iizuka, M., and Stillman, B. (1999). Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* *274*, 23027-23034.

Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., and Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *8*, 37-45.

John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R., and Workman, J. L. (2000). The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev* 14, 1196-1208.

Ju, Z., Jiang, H., Jaworski, M., Rathinam, C., Gompf, A., Klein, C., Trumpp, A., and Rudolph, K. L. (2007). Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nat Med* 13, 742-747.

Ju, Z., and Lenhard Rudolph, K. (2008). Telomere dysfunction and stem cell ageing. *Biochimie* 90, 24-32.

Kaji, E. H., and Leiden, J. M. (2001). Gene and stem cell therapies. *Jama* 285, 545-550.

Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996). Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 216, 357-366.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, (New York).

Kang, H. J., Choi, Y. S., Hong, S. B., Kim, K. W., Woo, R. S., Won, S. J., Kim, E. J., Jeon, H. K., Jo, S. Y., Kim, T. K., *et al.* (2004). Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *J Neurosci* 24, 1280-1287.

Kenyon, J., and Gerson, S. L. (2007). The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res* 35, 7557-7565.

Kim Sh, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (2002). Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 21, 503-511.

Kingsbury, M. A., Yung, Y. C., Peterson, S. E., Westra, J. W., and Chun, J. (2006). Aneuploidy in the normal and diseased brain. *Cell Mol Life Sci* 63, 2626-2641.

Klapper, W., Shin, T., and Mattson, M. P. (2001). Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice. *J Neurosci Res* 64, 252-260.

Kolf, C. M., Cho, E., and Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9, 204.

Kondo, M., Wagers, A. J., Manz, M. G., Prohaska, S. S., Scherer, D. C., Beilhack, G. F., Shizuru, J. A., and Weissman, I. L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21, 759-806.

Korbling, M., and Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349, 570-582.

Koundrioukoff, S., Polo, S., and Almouzni, G. (2004). Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair (Amst)* 3, 969-978.

Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-48.

Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., *et al.* (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40, 382-390.

Kruman, II, Schwartz, E., Kruman, Y., Cutler, R. G., Zhu, X., Greig, N. H., and Mattson, M. P. (2004a). Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 279, 43952-43960.

Kruman, II, Wersto, R. P., Cardozo-Pelaez, F., Smilenov, L., Chan, S. L., Chrest, F. J., Emokpae, R., Jr., Gorospe, M., and Mattson, M. P. (2004b). Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41, 549-561.

Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K., and Masai, H. (1999). A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 19, 5083-5095.

Labib, K., and Diffley, J. F. (2001). Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr Opin Genet Dev* 11, 64-70.

Lajtha, L. G. (1979). Stem cell concepts. *Differentiation* 14, 23-34.

Lampert, I. A., Horncastle, D., Dilworth, S., Roberts, I., Alison, M. R., and Naresh, K. N. (2005). The expression of minichromosome maintenance protein-2 in normal and abnormal

megakaryocytes and comparison with the proliferative marker Ki-67. *Br J Haematol* 131, 490-494.

Laurenti, E., Varnum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W. E., Ehninger, A., Knoepfler, P. S., Cheng, P. F., MacDonald, H. R., Eisenman, R. N., *et al.* (2008). Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. *Cell Stem Cell* 3, 611-624.

Lee, J. H., and Paull, T. T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7741-7748.

Lee, Y., Barnes, D. E., Lindahl, T., and McKinnon, P. J. (2000). Defective neurogenesis resulting from DNA ligase IV deficiency requires Atm. *Genes Dev* 14, 2576-2580.

Lepski, G. A. (2007) Diferenciação neuronal in vitro de células-tronco mesenquimais humanas para uso em transplante neuronal. , Universidade de São Paulo, São Paulo.

Liu, X., Huang, J., Chen, T., Wang, Y., Xin, S., Li, J., Pei, G., and Kang, J. (2008). Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res* 18, 1177-1189.

Liu, Z., and Martin, L. J. (2006). The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. *J Comp Neurol* 497, 468-488.

Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 675-699.

Loeffler, M., Bratke, T., Paulus, U., Li, Y. Q., and Potten, C. S. (1997). Clonality and life cycles of intestinal crypts explained by a state dependent stochastic model of epithelial stem cell organization. *J Theor Biol* 186, 41-54.

Loizou, J. I., Oser, G., Shukla, V., Sawan, C., Murr, R., Wang, Z. Q., Trumpp, A., and Herceg, Z. (2009). Histone Acetyltransferase Cofactor Trapp Is Essential for Maintaining the Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Pool. *J Immunol*.

Lough, J. W. (2002). Transient expression of TIP60 protein during early chick heart development. *Dev Dyn* 223, 419-425.

Lu, P., and Tuszynski, M. H. (2005). Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons? *Exp Neurol* 193, 273-278.

- Madine, M. A., Swietlik, M., Pelizon, C., Romanowski, P., Mills, A. D., and Laskey, R. A. (2000). The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol* 129, 198-210.
- Maiorano, D., Lutzmann, M., and Mechali, M. (2006). MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 18, 130-136.
- Maser, R. S., and DePinho, R. A. (2002). Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 297, 565-569.
- Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J. M., Currier, J. L., Tothova, Z., Manola, J. B., Ganesan, S., Lansdorp, P. M., Collins, K., and Hahn, W. C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8222-8227.
- Matsui, W., Wang, Q., Barber, J. P., Brennan, S., Smith, B. D., Borrello, I., McNiece, I., Lin, L., Ambinder, R. F., Peacock, C., *et al.* (2008). Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 68, 190-197.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Mattson, M. P., Fu, W., and Zhang, P. (2001). Emerging roles for telomerase in regulating cell differentiation and survival: a neuroscientist's perspective. *Mech Ageing Dev* 122, 659-671.
- Maynard, S., Swistowska, A. M., Lee, J. W., Liu, Y., Liu, S. T., Da Cruz, A. B., Rao, M., de Souza-Pinto, N. C., Zeng, X., and Bohr, V. A. (2008). Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 26, 2266-2274.
- Miles, G. B., Yohn, D. C., Wichterle, H., Jessell, T. M., Rafuse, V. F., and Brownstone, R. M. (2004). Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci* 24, 7848-7858.
- Mimeault, M., Hauke, R., and Batra, S. K. (2007). Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82, 252-264.

Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., *et al.* (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* *24*, 376-385.

Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., *et al.* (2005). Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* *25*, 5183-5195.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* *26*, 101-106.

Niwa, H. (2007). Open conformation chromatin and pluripotency. *Genes Dev* *21*, 2671-2676.

Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., and McKay, R. D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* *59*, 89-102.

Pandita, T. K. (2001). The role of ATM in telomere structure and function. *Radiat Res* *156*, 642-647.

Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., and Aguilera, A. (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* *66*, 1039-1056.

Park, D. H., Borlongan, C. V., Eve, D. J., and Sanberg, P. R. (2008). The emerging field of cell and tissue engineering. *Med Sci Monit* *14*, RA206-220.

Park, Y., and Gerson, S. L. (2005). DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med* *56*, 495-508.

Parker, A. M., and Katz, A. J. (2006). Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther* *6*, 567-578.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* *10*, 886-895.

- Pelicci, P. G. (2004). Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence? *J Clin Invest* *113*, 4-7.
- Peterson, C. L. (2002). Chromatin remodeling: nucleosomes bulging at the seams. *Curr Biol* *12*, R245-247.
- Peterson, C. L., and Cote, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* *18*, 602-616.
- Piscaglia, A. C. (2008). Stem cells, a two-edged sword: risks and potentials of regenerative medicine. *World J Gastroenterol* *14*, 4273-4279.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143-147.
- Reddel, R. R., and Bryan, T. M. (2003). Alternative lengthening of telomeres: dangerous road less travelled. *Lancet* *361*, 1840-1841.
- Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A., and Pillus, L. (1996). Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet* *14*, 42-49.
- Rodins, K., Cheale, M., Coleman, N., and Fox, S. B. (2002). Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res* *8*, 1075-1081.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* *273*, 5858-5868.
- Rotman, G., and Shiloh, Y. (1997). Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays* *19*, 911-917.
- Rouse, J., and Jackson, S. P. (2002). Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* *297*, 547-551.
- Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., and Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* *294*, 371-379.

- Safford, K. M., and Rice, H. E. (2005). Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr Drug Targets* 6, 57-62.
- Safford, K. M., Safford, S. D., Gimble, J. M., Shetty, A. K., and Rice, H. E. (2004). Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 187, 319-328.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cao, C., and Arendash, G. (2008). The potential of hematopoietic growth factors for treatment of Alzheimer's disease: a mini-review. *BMC Neurosci* 9 Suppl 2, S3.
- Sapountzi, V., Logan, I. R., and Robson, C. N. (2006). Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1496-1509.
- Serakinci, N., Graakjaer, J., and Kolvraa, S. (2008). Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells. *Biochimie* 90, 33-40.
- Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5, 91-116.
- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11, 71-77.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31, 402-410.
- Shohet, J. M., Hicks, M. J., Plon, S. E., Burlingame, S. M., Stuart, S., Chen, S. Y., Brenner, M. K., and Nuchtern, J. G. (2002). Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res* 62, 1123-1128.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., and Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18, 134-147.

Shukla, V., Vaissiere, T., and Herceg, Z. (2008). Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutat Res* 637, 1-15.

Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C. A., and Jones, K. A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev* 20, 586-600.

Sirieix, P. S., O'Donovan, M., Brown, J., Save, V., Coleman, N., and Fitzgerald, R. C. (2003). Surface expression of minichromosome maintenance proteins provides a novel method for detecting patients at risk for developing adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Clin Cancer Res* 9, 2560-2566.

Smith, E. R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R. G., Lucchesi, J. C., and Allis, C. D. (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3561-3565.

Smith, E. R., Pannuti, A., Gu, W., Steurnagel, A., Cook, R. G., Allis, C. D., and Lucchesi, J. C. (2000). The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol Cell Biol* 20, 312-318.

Song, H. J., Stevens, C. F., and Gage, F. H. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 5, 438-445.

Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64, 2390-2396.

Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

- Takechi, S., and Nakayama, T. (1999). Sas3 is a histone acetyltransferase and requires a zinc finger motif. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 405-410.
- Tan, D. F., Huberman, J. A., Hyland, A., Loewen, G. M., Brooks, J. S., Beck, A. F., Todorov, I. T., and Bepler, G. (2001). MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer* 1, 6.
- Taylor, A. M., and Byrd, P. J. (2005). Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 58, 1009-1015.
- Tholpady, S. S., Katz, A. J., and Ogle, R. C. (2003). Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272, 398-402.
- Tohill, M., and Terenghi, G. (2004). Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem* 40, 17-24.
- Trounson, A. (2009). New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med* 7, 29.
- Tuan, R. S., Boland, G., and Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5, 32-45.
- Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291.
- Vescovi, A. L., Rietze, R., Magli, M. C., and Bjornson, C. (2002). Hematopoietic potential of neural stem cells. *Nat Med* 8, 535; author reply 536-537.
- von Zglinicki, T., Burkle, A., and Kirkwood, T. B. (2001). Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol* 36, 1049-1062.
- Voss, A. K., and Thomas, T. (2009). MYST family histone acetyltransferases take center stage in stem cells and development. *Bioessays* 31, 1050-1061.
- Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12, 1769-1774.
- Westerlund, U., Moe, M. C., Varghese, M., Berg-Johnsen, J., Ohlsson, M., Langmoen, I. A., and Svensson, M. (2003). Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Exp Cell Res* 289, 378-383.

Williams, G. H., Romanowski, P., Morris, L., Madine, M., Mills, A. D., Stoeber, K., Marr, J., Laskey, R. A., and Coleman, N. (1998). Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14932-14937.

Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., Pasche, A. C., Knabenhans, C., Macdonald, H. R., and Trumpp, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* *18*, 2747-2763.

Wilson, D. M., 3rd, and Bohr, V. A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)* *6*, 544-559.

Wolffe, A. P. (2000). Transcriptional control: imprinting insulation. *Curr Biol* *10*, R463-465.

Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., and Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* *61*, 364-370.

Yamaguchi, H., Baerlocher, G. M., Lansdorp, P. M., Chanock, S. J., Nunez, O., Sloand, E., and Young, N. S. (2003). Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* *102*, 916-918.

Yamamoto, T., and Horikoshi, M. (1997). Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem* *272*, 30595-30598.

Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S. B., *et al.* (2002). Nuclear receptor function requires a TFIIA-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell* *9*, 553-562.

Yang, A. H., Kaushal, D., Rehen, S. K., Kriedt, K., Kingsbury, M. A., McConnell, M. J., and Chun, J. (2003). Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. *J Neurosci* *23*, 10454-10462.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917-1920.

Yurov, Y. B., Iourov, I. Y., Monakhov, V. V., Soloviev, I. V., Vostrikov, V. M., and Vorsanova, S. G. (2005). The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study. *J Histochem Cytochem* *53*, 385-390.

Zago M. A., C. D. T. (2006). *Células-tronco, a nova fronteira da medicina*, (São Paulo: Editora Atheneu).

Zhang, P., Dilley, C., and Mattson, M. P. (2007). DNA damage responses in neural cells: Focus on the telomere. *Neuroscience* 145, 1439-1448.

Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.

IX-

ANEXOS

ANEXO I- Termo de consentimento livre e esclarecido

Titulo da pesquisa: QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO ADULTAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO

A justificativa e objetivos da pesquisa.

As células tronco são fundamentais, não somente para a coordenar a formação dos órgãos desde a fase embrionária até o indivíduo adulto, mas também pelo seu papel na regeneração e reparo dos tecidos.

Há três tipos principais de células tronco, classificadas de acordo com a sua origem: as células tronco embrionárias, as células tronco do cordão umbilical e as células tronco adultas. Essas últimas estão localizadas na medula óssea e na gordura, músculos e tecido nervoso. Devido às dificuldades práticas de obtenção de células tronco dos embriões, e considerando os aspectos éticos e legais, as pesquisas com células tronco adultas estão sendo feitas com células derivadas da medula óssea. Mais recentemente, conseguiu-se separar células tronco da gordura, através da lipoaspiração.

O objetivo desta pesquisa é comparar, num mesmo indivíduo, as células tronco adultas da gordura com as células tronco adultas da medula óssea.

Os procedimentos a serem utilizados.

A cirurgia para o tratamento do seu problema de coluna será realizada pelo seu ortopedista. No início desse procedimento, será necessário retirar um fragmento de osso (enxerto ósseo) da região direita da bacia.

A coleta das células tronco da gordura e da medula óssea será realizada pela Equipe da Cirurgia Plástica.

Antes da retirada do enxerto ósseo, a equipe da cirurgia plástica fará a coleta da gordura da região lombar através da lipoaspiração. O volume a ser aspirado será de 10 ml.

Após a retirada do enxerto ósseo, a medula óssea será aspirada com seringa. O volume a ser aspirado será de 5 ml.

Todos os procedimentos serão realizados sob anestesia geral.

Os desconfortos ou riscos esperados.

O desconforto possível da lipoaspiração e da punção da medula óssea será dor pós-operatória localizada na região da retirada do enxerto ósseo da bacia. Excluindo outras complicações que podem ocorrer em qualquer cirurgia, esta pesquisa não acarretará nenhum incômodo, a mais, aos pacientes.

Esses procedimentos não aumentarão a média de tempo de duração da retirada do enxerto ósseo.

Os benefícios que se pode obter.

Poderá haver uma constatação de que, num mesmo indivíduo, há diferença quantitativa e qualitativa entre as células tronco adultas derivadas da gordura e da medula óssea. A

obtenção de células da gordura por lipoaspiração é mais fácil e menos dolorosa do que a aspiração da medula óssea.

Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos.

Nenhum.

Garantia de resposta a qualquer pergunta

O Pesquisador e a equipe médica responsável garantem, aos pacientes desta pesquisa, prestar a assistência médica assegurada pelo SUS, além de responder as suas perguntas e esclarecer suas dúvidas.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si

A paciente terá liberdade em abandonar a pesquisa, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para si ou na continuidade do seu tratamento.

Garantia de privacidade

Eu,.....(paciente ou responsável) fui informada dos objetivos desta pesquisa de maneira clara e detalhada. Recebi explicações do tratamento que receberei e esclareci todas as minhas dúvidas. O pesquisador responsável Dr. Pedro Djacir Escobar Martins certificou-me que durante o desenvolvimento desta pesquisa será mantido todo o sigilo, de acordo com os preceitos da ética médica. Os dados desta pesquisa são confidenciais. É garantida a privacidade das pessoas que dela participarem.

Compromisso com informação atualizada do estudo

Durante este estudo e no que refere a sua pessoa, toda a paciente tem o direito de ser informada e atualizada do andamento do seu tratamento e da pesquisa. Caso eu tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar o pesquisador responsável, Dr. Pedro Djacir Escobar Martins no telefone xxx 51 33158455 ou xxx 51 99774980

Disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso danos

Fui informado que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente por esta pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei.

Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa

Também fui informado que, caso existirem gastos adicionais, nesta pesquisa, esses serão absorvidos pelo seu orçamento.

Como participante deste estudo, se eu necessitar de mais esclarecimentos sobre os meus direitos ou se me sentir prejudicado pela participação, devo procurar o orientador desta pesquisa, Dr. Jefferson Braga da Silva, telefone xxx 51 33205040.

Declaro que recebi copia deste Termo de Consentimento.

Assinatura Nome do Paciente Data

Assinatura Pesquisador Data

Este formulário foi lido para _____
pelo Dr. Pedro Djacir Escobar Martins, enquanto eu estava presente.

Assinatura Nome da Testemunha Data

ANEXO II- Resultados de qRT-PCR para proteínas de sinalização do dano no DNA, remodelagem de cromatina e proliferação celular em células-tronco derivadas do tecido adiposo induzidas para células neurais.

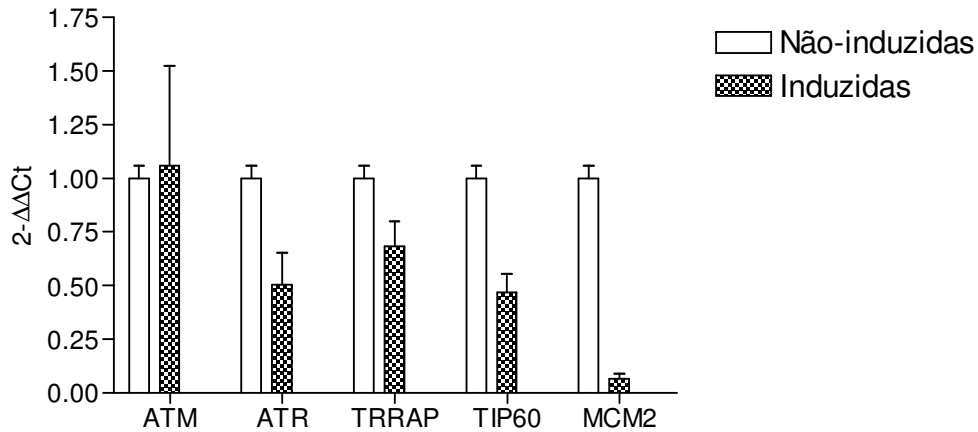


Figura 1. Expressão de mRNA de *ATM*, *ATR*, *TRRAP*, *TIP60* e *MCM2* em células ADAS induzidas e não induzidas.

Os detalhes sobre os materiais e métodos destes resultados estão descritos no capítulo 2 dessa tese. Os primers utilizados foram ATM (PPH00325B), ATR (PPH03318B), TRRAP (PPH14362A), H2AX (PPH12636A), TIP60 (PPH01029A), MCM2 (PPH00961A) fornecidos pela empresa Superarray (available in: www.superarray.com).

*“Ideias buscamos fora!
Respostas encontramos dentro de nós através
do desenvolvimento de nossas diversas
habilidades.”*

Ana Paula Franco Lambert
Defesa de Tese de Doutorado
Janeiro de 2010