

Caracterização de células-tronco mesenquimais de camundongos normais e do modelo murino de MPS I

Lindolfo da Silva Meirelles

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Nance Beyer Nardi

Porto Alegre

2003

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento de FAPERGS, CAPES, PADCT.

Agradecimentos

À professora Deusa Aparecida Vendite, pelo auxílio em tentativas de detecção de diferenciação neuronal por imunocitoquímica

Ao professor Vivaldo Moura Neto e colaboradores, pelo fornecimento de anticorpos para marcação de neurônios

À professora Sídia Maria Callegari-Jacques, pelo auxílio com a análise estatística

À Lisandra Nied, do Serviço de Radioterapia do HCPA, pela irradiação de células

Ao amigo Leonardo Augusto Karam Teixeira, pela disposição de ajudar e pelo envio de material do Rio de Janeiro

À amiga Christiane Dresh, pelo incentivo dado no início e ao longo deste trabalho

Aos amigos Alessandra Peres, Andrés Delgado Cañedo e Elvira Alicia Aparicio Cordero, por estarem sempre dispostos a auxiliar quando necessário

À Tassiana Fronza, pelo auxílio prestado no início deste trabalho

A todos do Laboratório de Imunogenética, pelo agradável ambiente de trabalho

À professora Nance Beyer Nardi, por proporcionar as condições necessárias para este estudo, e pela amizade

Àquela que ilumina minha vida, Adriana, por TUDO

Lista de abreviaturas utilizadas

GAGs – glicosaminoglicanos

G-CSF - *granulocyte-colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônia de granulócitos

HSC – *hematopoietic stem cell*, célula-tronco hematopoiética

IDUA - α -L-iduronidase

LIF – *leukemia inhibitory factor*, fator inibidor de leucemia

LTC – *long-term culture*, cultura de longa duração

MAPC - *multipotent adult progenitor cell*, célula progenitora adulta multipotente

mMAPC – *murine multipotent adult progenitor cell*, célula progenitora adulta multipotente murina

M-CSF - *monocyte-colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônia de monócitos

MPC – *mesenchymal precursor cell*, célula progenitora mesenquimal

MPS I – mucopolissacaridose tipo I

MSC – *mesenchymal stem cell*, célula-tronco mesenquimal

mMSC – *murine mesenchymal stem cell*, célula-tronco mesenquimal murina

hMSC – *human mesenchymal stem cell*, célula-tronco mesenquimal humana

SCF – *stem cell factor*, fator de célula-tronco

SNC – sistema nervoso central

TRE – terapia de reposição enzimática

Sumário

| Tópico | Página |
|---|---------------|
| Introdução e objetivos | 1 |
| <i>Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization</i> | 10 |
| Discussão | 39 |
| Resumo e conclusões | 41 |
| Summary and conclusions | 42 |
| Referências bibliográficas | 43 |

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Células-tronco

Células-tronco são aquelas capazes de auto-renovação ilimitada ou prolongada e que podem também dar origem a pelo menos um tipo celular em estágio de diferenciação mais avançado (Morrison et al., 1997; Watt e Hogan, 2000). A célula-tronco embrionária é totipotente e dá origem a todas as células do organismo (Odorico et al., 2001; van der Kooy e Weiss, 2000). Indivíduos adultos também possuem células-tronco, mas estas não são totipotentes como a embrionária. Em humanos adultos, a primeira célula-tronco reportada foi a hematopoiética (HSC) (revisado por Weissman, 2000). Esta célula localiza-se na medula óssea, e já foi extensivamente caracterizada, demonstrando ser uma célula multipotente que dá origem às diferentes células do sangue – as da linhagem mielóide (eritrócitos, megacariócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos) e as da linhagem linfóide (linfócitos T, linfócitos B e células *natural killer*) (revisado por Nardi e Alfonso, 1999).

Além da HSC, outras células-tronco já foram descritas, dentre as quais situam-se epitelial, neural e mesenquimal. A primeira é encontrada no intestino e na epiderme, e dá origem a todas as células em camadas epiteliais (Slack, 2000). A célula-tronco neural situa-se no cérebro, e origina neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e, surpreendentemente, células sangüíneas (McKay, 1997; Bjornson et al., 1999; Gage, 2000). A célula-tronco mesenquimal (MSC), a exemplo da HSC, é encontrada primariamente na medula óssea, e gera ossos, tendão, cartilagem, tecidos adiposo e muscular, estroma medular e, interessantemente, células neurais (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Kopen et al., 1999).

Medula óssea e estroma

A medula óssea adulta pode ser vista como um compartimento onde ocorrem interações entre sistemas celulares distintos, que formam um microambiente que propicia a hematopoiese. O compartimento medular é composto basicamente por três sistemas celulares: hematopoiético, epitelial e estromal (revisado por Deans e Moseley, 2000). O termo estroma refere-se ao conjunto composto pelo sistema celular estromal – que inclui fibroblastos, células endoteliais, células reticulares, adipócitos e osteoblastos – conjuntamente com a matriz extracelular a ele associada, bem como outros tipos celulares, tais como macrófagos. Estes, embora sejam de origem hematopoiética, são considerados componentes estromais funcionais (Bordignon et al., 1999). O referido sistema celular estromal foi proposto por Owen em 1985 (ap. Deans e Moseley, 2000) e baseia-se em uma

analogia com o sistema hematopoiético. Neste modelo, células-tronco mesenquimais residem na medula, mantêm um determinado grau de auto-renovação, e dão origem a células que podem diferenciar-se em várias linhagens de tecido conjuntivo e em tecidos estromais.

As células do estroma produzem fatores solúveis que agem sobre as células precursoras hematopoiéticas, e também garantem suporte mecânico às mesmas. O contato físico entre as células do estroma e as células hematopoiéticas também é relevante para a hematopoiese. Embora já tenha sido demonstrado que esse contato não é fundamental para que esta ocorra (Verfaillie, 1992), existem evidências de que ele esteja relacionado com a qualidade das células hematopoiéticas produzidas (Breems et al., 1998).

Célula-tronco mesenquimal

A primeira evidência direta de que a medula óssea contém células precursoras de tecidos mesenquimais não hematopoiéticos advém do trabalho de Friedenstein e colaboradores, iniciado em Moscou nos anos 60 - 70 (revisado por Phinney, 2002). Em seus experimentos, Friedenstein dispensava amostras de medula óssea em placas de cultura de tecido plásticas, e descartava as células não aderentes após 4 horas de incubação. Com este procedimento, HSCs e sua progênie (que a princípio não aderem ao plástico) foram grandemente eliminadas, e as células remanescentes mantidas em cultura apresentavam-se fusiformes, semelhantes a fibroblastos, formando agrupamentos de duas a quatro células, que permaneciam dormentes por dois a quatro dias, quando então passavam a se multiplicar rapidamente. Não obstante, a característica mais marcante dessas células era sua capacidade de se diferenciar em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem. Nos anos 80, diversos estudos estabeleceram que as células isoladas pelo método de Friedenstein eram multipotentes e capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos, adipócitos, e até mioblastos (revisado por Prockop, 1997).

Não existe um consenso quanto à nomenclatura utilizada para referir-se a essas células. Os termos “célula do estroma medular” e “célula-tronco mesenquimal” têm sido muitas vezes utilizados erroneamente como sinônimos por vários autores. As células do estroma medular são todas aquelas que estão presentes na medula óssea e que não fazem parte do sistema hematopoiético. Quando nos referimos às células-tronco mesenquimais, estamos falando de uma pequena população de células presentes no organismo, que têm como característica a capacidade de gerar outras células-tronco mesenquimais, bem como assumir rotas de diferenciação que culminarão, em última análise, na formação de tecidos mesenquimais. Os protocolos de isolamento de células da medula por adesão das mesmas a superfícies plásticas levam à obtenção imediata de células do estroma medular, e não

diretamente à obtenção de células-tronco mesenquimais. Um termo mais adequado para nos referirmos à grande quantidade de tipos celulares com potencial de diferenciação em tecidos mesenquimais seria “célula progenitora mesenquimal” (MPC), que abrangeria todas as células compreendidas desde o nível hierárquico imediatamente acima ao da MSC até o nível imediatamente inferior àquele representado pelos tipos celulares mesenquimais já diferenciados.

Outro fator que gera controvérsia quanto à nomenclatura dessas células é o fato de que a HSC é de origem mesodérmica, logo, um tipo de célula-tronco mesenquimal. Por isso, alguns autores preferem utilizar o termo “célula-tronco mesenquimal não hematopoiética”. Além disso, o fato de estas células poderem assumir vias de diferenciação que transcendem a fronteira entre mesoderma e ectoderma (como ocorre no caso da diferenciação neuronal das mesmas) torna o termo “mesenquimal” inadequado. Talvez o melhor conjunto de palavras para definir este tipo celular seria “célula-tronco adulta não hematopoiética”, acrescido de “aderente ao plástico, derivada da medula óssea”. Para evitar maiores dificuldades, o termo utilizado para referir-se a esse tipo celular nesta dissertação é célula-tronco mesenquimal (MSC).

Obtenção e caracterização da MSC

MSCs são encontradas primariamente na medula óssea, onde estão imersas no estroma (Pittenger et al., 1999). Sua frequência é baixa, sendo estimada em 0,125% da fração celular da medula óssea (revisado por Nardi e Alfonso, 1999). Essas células também podem ser isoladas de tecido adiposo (Zuk et al., 2001). A MSC tem sido obtida basicamente por cultivo das células aderentes da medula óssea em placas plásticas (MacKay et al., 1998; Muraglia et al., 2000; Makino et al., 1999; Wakitani et al., 1995). A expansão desta célula em cultura através das técnicas convencionais tem sido difícil (Sekiya et al., 2002), e por isso ainda existem poucos dados abrangentes referentes à “tronquicidade”^{*} das mesmas.

Recentemente, o grupo liderado por Catherine M. Verfaillie publicou uma série de trabalhos (Reyes et al., 2001; Jiang et al., 2002a; Jiang et al., 2002b) descrevendo um tipo celular que sob vários aspectos assemelha-se à MSC. Este foi chamado de “célula progenitora adulta multipotente” (*multipotent adult progenitor cell*, MAPC), e foi isolado de cérebro, músculo e medula óssea de camundongo. A questão da correspondência entre MSC e MAPC permanece não resolvida. No entanto, está aberta a perspectiva de que

^{*} Esta palavra é utilizada numa tentativa de trazer para o idioma português o significado do termo *stemness* utilizado em inglês, que denota o quão capaz de diferenciação e proliferação uma célula-tronco é.

tecidos adultos possuem células-tronco semelhantes, cujas diferenças entre si são governadas pelo tecido no qual estão imersas.

Sabe-se pouco a respeito da presença de MSCs no sangue. Existem trabalhos que confirmam a existência de MSCs/MPCs circulantes em sangue periférico (Zvaifler et al., 2000) e de cordão umbilical (Alfonso et al., 2000). A idéia do estabelecimento de uma metodologia de isolamento de MSCs/MPCs de sangue periférico é bastante atraente por tal procedimento garantir uma fonte dessas células que não requer um procedimento como a extração de medula óssea.

O primeiro passo para o isolamento de MSCs/MPCs do sangue é o conhecimento de marcadores específicos das mesmas. Para tanto, os procedimentos de purificação e cultivo de MSCs obtidas a partir da medula óssea devem ser bem compreendidos, bem como a expansão das mesmas deve ser otimizada. Isso proporcionaria boas quantidades dessas células não apenas para aplicações clínicas diretas, mas também para estudos de caracterização do repertório de marcadores - moléculas secretadas ou moléculas de superfície - das mesmas. Além disso, o conhecimento de uma vasta gama de marcadores para MSCs obtidas da medula óssea poderia se mostrar útil no mapeamento de rotas de diferenciação de células precursoras derivadas das mesmas, utilizando-se a presença/ausência dos mesmos como critério para avaliação do grau de diferenciação de células precursoras de origem mesenquimal.

Vários marcadores moleculares já foram descritos para progenitores mesenquimais comprometidos e para os estágios fenotípicos finais (Seshi et al., 2000; Long, 2001; Bruder et al., 1994). Marcadores moleculares candidatos para a definição de MSCs humanas estão incluídos numa longa lista (revisado por Deans e Moseley, 2000). Dentre estes, podem-se destacar as moléculas de superfície CD44, CD29, CD90, e os fatores secretados LIF (*leukemia inhibitory factor*, fator inibitório de leucemia), M-CSF (*monocyte-colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônia de monócitos), e SCF (*stem cell factor*, fator de célula-tronco). A verificação dos marcadores específicos de MSCs murinas ainda não é possível devido à dificuldade de obtenção de uma população pura através das técnicas convencionais (Phinney et al., 1999).

A melhor maneira de se estudar a MSC murina seria, portanto, considerar operacionalmente a população de células obtida por tais técnicas como um todo. Pode-se considerar uma dada população de células em cultura como MSCs se a mesma possuir todas as características funcionais que o conceito de MSC define, ou seja, se **a**) for capaz de auto-renovação (capaz de ser mantida em cultura de longa duração) **b**) for capaz de dar origem, em condições adequadas de cultivo, a diferentes tipos celulares de origem mesenquimal, tais como adipócitos, condrócitos e osteócitos. Outra característica importante, quando tratamos de MSCs derivadas do estroma medular, é a capacidade de as

mesmas o reconstituírem *in vitro*. Em condições adequadas de cultivo, MSCs podem estabelecer uma monocamada com as características do estroma medular. Por definição, o estroma medular provê suporte à hematopoiese. A reconstituição do estroma medular pode ser verificada em condições experimentais se a monocamada estabelecida a partir das MSCs isoladas for capaz de suportar a proliferação de células tronco/precursoras hematopoiéticas.

MSC: características e aplicações

MSCs já vêm sendo exploradas há algum tempo com o propósito de se obter regeneração esquelética (Bruder et al., 1994). Além disso, a MSC apresenta características que a capacitam para várias outras aplicações experimentais. Dentre estas, podem-se citar o seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, sua sensibilidade elevada a moléculas sinalizadoras específicas e uma relativa facilidade de manuseio *in vitro* (Caplan e Bruder, 2001). Isso torna a MSC uma ferramenta importante para, entre outras coisas, a engenharia de tecidos, compreendendo desde a regeneração de tecidos *in vivo* até a produção dos mesmos *in vitro*.

Uma aplicação experimental envolvendo as três propriedades inerentes à MSC supracitadas visando a regeneração de tecido *in vivo* já foi realizada em um trabalho no qual MSCs de roedores foram isoladas e transfectadas com o gene codificante da proteína morfogenética recombinante humana 2 (rhBMP-2). Esta proteína induz a diferenciação de MSCs para a linhagem osteogênica em murinos. Quando as células transfectadas foram re-inseridas nesses animais, em pontos do fêmur que exibiam defeito ósseo grave, observou-se uma cura substancial em 8 semanas. Isso demonstrou uma resposta parácrina e autócrina a rhBMP-2 (Lieberman, 1998, ap. Caplan e Bruder, 2001).

Um trabalho que gerou grande repercussão foi a tentativa de correção da *osteogenesis imperfecta* (OI) – doença genética causada pela deficiência da produção de colágeno tipo I - em crianças utilizando-se transplante de medula óssea de doadores compatíveis, cujos resultados ainda vêm sendo descritos (Horwitz et al., 1999; Horwitz et al, 2001). Esse trabalho baseia-se no fato de que a medula óssea contém MSCs capazes de diferenciar-se em células envolvidas na produção de ossos, cartilagem e músculo, e que podem auxiliar a regeneração desses tecidos nos pacientes afetados por suprirem a deficiência de produção de colágeno tipo I das células dos indivíduos receptores.

Além de serem ponto chave em estratégias de terapia celular/genética, MSCs previamente isoladas e expandidas *ex vivo* têm sido utilizadas também como coadjuvante em transplantes de medula óssea. Nestas circunstâncias, espera-se que as mesmas migrem para o compartimento medular e auxiliem na reconstituição do estroma original,

danificado pela radiação. Isso propicia uma maior eficiência no estabelecimento das células precursoras hematopoiéticas transplantadas na medula óssea. Bons resultados práticos desta metodologia já foram obtidos utilizando-se modelos animais. Resultados semelhantes ainda não foram obtidos em humanos, o que poderia ser explicado pela baixa frequência de MPCs obtidas para o transplante (Bordignon et al., 1999).

Em 1997, Eglitis e Mezey demonstraram que células derivadas da medula óssea eram capazes de localizar-se no cérebro quando injetadas sistemicamente em camundongos submetidos a radiação sub-letal, diferenciando-se em células da macróglia e da astróglia. Neste estudo, constatou-se que a migração era rápida, e que as novas células distribuíam-se por todo o cérebro. Posteriormente, reportou-se o fato de que MSCs são capazes de migrar através do prosencéfalo e do cerebelo quando injetadas no ventrículo lateral de camundongos recém nascidos, diferenciando-se em astrócitos (Kopen et al., 1999). Em 2000, Mezey e colaboradores demonstraram que células da medula óssea migravam para o cérebro e lá se diferenciavam em tipos celulares que exibiam antígenos específicos de neurônios (Mezey et al., 2000), enquanto Woodbury e colaboradores demonstravam que MSCs de rato podiam diferenciar-se em neurônios (Woodbury et al., 2000). Esses dados evidenciam a capacidade de células isoladas a partir da medula óssea trespassarem a barreira hemato-encefálica, e, ainda, sugerem fortemente que a MSC esteja envolvida neste processo. Essa perspectiva expande ainda mais as fronteiras da MSC como veículo de terapia genética, colocando-a como uma possível transportadora de genes de interesse para o sistema nervoso central (SNC) sem que haja a necessidade de procedimentos cirúrgicos. Dada a contribuição da MSC para diferentes tecidos observada por Pereira e colaboradores (1995; 1998), o efeito terapêutico abrangeria o organismo como um todo.

Mucopolissacaridoses

Mucopolissacaridoses (MPSs) são um grupo de doenças de armazenagem lisossômica, cada uma caracterizada como uma deficiência, herdada, de uma das hidrolases ácidas lisossômicas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). A deficiência de enzima resulta no acúmulo de GAGs nos tecidos. As MPSs são divididas em sete subgrupos distintos, cada um resultante da deficiência de uma diferente enzima. Os sintomas clínicos das MPSs incluem enrijecimento facial, disostose múltipla, anomalias nas articulações, hepatoesplenomegalia, entumescimento córneo, graus variáveis de anomalias do SNC, e morte prematura (Neufeld e Muenzer, 1995).

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é resultante da deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA), requerida para a degradação lisossômica dos glicosaminoglicanos heparan sulfato e dermatan sulfato. A MPS I manifesta-se como uma doença com herança

autossômica recessiva e apresenta três formas clínicas principais: grave, denominada síndrome de Hurler; intermediária, denominada síndrome de Hurler-Scheie; e branda, denominada síndrome de Scheie. Os portadores da forma grave de MPS I apresentam vários problemas médicos, incluindo retardo progressivo no desenvolvimento, entumescimento córneo, obstrução das vias respiratórias, doenças cardíacas, hepatoesplenomegalia, e restrições sérias nas articulações, sendo que a maior parte morre por volta dos 10 anos de idade. Os pacientes portadores da síndrome de Hurler-Scheie apresentam vários problemas em comum com os que apresentam síndrome de Hurler, mas a taxa de progressão é mais lenta, com pouco ou nenhum retardo mental, e morrem na adolescência ou por volta dos 20 anos de idade. Os portadores da síndrome de Scheie, por sua vez, são afetados com menor severidade e podem ter uma longevidade normal. A diferença entre a gravidade das formas de MPS I deve-se basicamente ao efeito de diferentes mutações no gene codificante da α -L-iduronidase, algumas das quais permitem atividade enzimática residual (ibid.).

Em 1997, Clarke e colaboradores criaram camundongos deficientes em α -L-iduronidase através da interrupção do gene *IDUA*, abrindo as portas para o desenvolvimento de um modelo murino para a MPS I. Posteriormente, os sintomas da doença apresentados por camundongos e humanos foram comparados e considerados semelhantes, o que indica que o modelo murino de MPS I é adequado (Russell et al., 1998). O grupo liderado por Elizabeth F. Neufeld (UCLA *School of Medicine*), a exemplo de Clarke e colaboradores, desenvolveu um modelo murino de MPS I através da inserção de um gene de resistência a neomicina dentro do exon 6 do gene *IDUA*, e colocou o gene mutante na linhagem murina C57BL/6 através de repetidos retrocruzamentos (Zheng et al., 2001).

Atualmente, as estratégias utilizadas para o tratamento de doenças de armazenagem lisossômica envolvem transplante de medula óssea (TMO), terapia de reposição enzimática (TRE), e terapia por reposição de genes de células somáticas (TRGCS) (Turner et al., 2000). Recentemente, Kakkis e colaboradores (2001) relataram o tratamento de 10 pacientes portadores de MPS I por TRE. Os pacientes tratados apresentaram uma melhora em seu quadro clínico, com normalização do tamanho do fígado e uma redução no nível de GAGs excretados na urina para níveis próximos do normal. A capacidade de o tratamento sanar a deficiência da enzima no SNC não foi abordada, uma vez que a maior parte dos pacientes não portava a forma grave de MPS I, não apresentando retardo mental evidente.

Em um estudo preliminar, Shull e colaboradores (1994) demonstraram que a TRE não era eficiente para sanar a deficiência de *IDUA* em tecidos chave como cérebro, cartilagem e válvulas cardíacas no modelo canino de MPS I. Isso reflete a necessidade do desenvolvimento de terapias capazes de corrigir a doença também no SNC. Neste contexto, o grupo de Neufeld demonstrou, em seu modelo murino de MPS I, que animais com

genótipo *IDUA* - / - que recebem medula de animais normais tinham níveis de α -L-iduronidase abaixo do normal, mas suficientes para reduzir o acúmulo de GAGs, enquanto a quantidade de enzima detectada era mínima nos rins e nenhuma no cérebro; entretanto, quando a medula óssea era transduzida com um vetor retroviral carregando o gene *IDUA*, não apenas o fígado e o baço dos receptores apresentavam níveis de α -L-iduronidase várias vezes acima do normal, como também o rim. Neste último caso, o nível de enzima no cérebro foi normalizado em 2 de 3 camundongos (Zheng et al., 2001).

MSC e MPS I

Tomando-se as características da MSC e as evidências de que ela é capaz de migrar para o cérebro em conjunto, o modelo murino de MPS I pode ser utilizado para o desenvolvimento de uma terapia genética da MPS I em humanos, utilizando-se a MSC como transportadora do gene da *IDUA*. Isso requer MSCs em quantidade e qualidade suficientes para os experimentos, e uma boa compreensão de sua biologia, incluindo aspectos de isolamento, expansão em cultura e diferenciação dessas células.

Objetivos

Dado o grande potencial para aplicações científicas e clínicas da célula-tronco mesenquimal, este trabalho teve como principal objetivo realizar um estudo minucioso da biologia da MSC de camundongo, procurando:

- a) estabelecer a metodologia para o isolamento, cultivo e expansão dessa célula a partir da medula óssea;
- b) conhecer que condições determinam sua diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*;
- c) avaliar sua capacidade de manutenção das células tronco hematopoiéticas durante o cultivo *in vitro*;
- d) caracterizar esse tipo celular quanto a seu repertório de moléculas de superfície;
- e) estimar sua frequência na medula óssea;
- f) observar se animais normais diferem de animais do modelo murino de MPS I, utilizando como meio de comparação o resultado das observações supracitadas.

MURINE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL: ISOLATION, *IN VITRO* EXPANSION, AND CHARACTERIZATION*

Lindolfo da Silva Meirelles and Nance Beyer Nardi

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Research supported by: FAPERGS, CAPES, CNPq

Correspondence to: Lindolfo da S Meirelles

Departamento de Genética, UFRGS

Caixa Postal 15053, 91501-900, Porto Alegre RS, Brasil

Phone number: +55 (51) 33166737

FAX number: +55 (51) 33167311

e-mail: lindolfo_meirelles@hotmail.com

3,142 words

Chosen scientific heading: Hematopoiesis

Title for running head: CHARACTERIZATION OF MURINE MESENCHYMAL STEM CELL

* (Trabalho a ser submetido à revista *Blood*)

ABSTRACT

In spite of good amount of information available regarding mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow of humans and other species, there is a lack of information about murine MSCs. In order to contribute to knowledge in this area, we have established conditions for the *in vitro* expansion of plastic-adherent cells collected from the bone marrow of four murine individuals, for up to 40 passages. These cells were shown to differentiate along osteogenic and adipogenic pathways, and support the growth and differentiation of hematopoietic stem cells. This cell population was operationally defined as murine mesenchymal stem cells (mMSCs). mMSCs were positive for the surface markers CD44, CD49e, CD29 and Sca-1, and exhibited a homogeneous, distinctive morphology. Their frequency in adult bone marrow was preliminarily estimated to be 1 per 11300 – 27000 nucleated cells. The emergence of the methodology for the culture of mMSCs will make the development of cellular and genetic therapy protocols in murine models possible, and provide new perspectives in the field of adult stem cells research.
lindolfo_meirelles@hotmail.com

INTRODUCTION

Postnatal bone marrow (BM) contains cells that can differentiate along mesenchymal pathways during *in vitro* cultivation, given adequate conditions. Culture conditions for the maintenance of these cells began to be described in the 70's (reviewed by Prockop¹). Over the years that followed the initial observations, the nomenclature regarding this cell type varied from the early designation colony-forming unit – fibroblast (CFU-F), through mesenchymal progenitor cells, marrow stromal cells and mesenchymal stem cells (MSCs) (reviewed by Phinney²). MSCs have been isolated from a number of species, including man³, mouse⁴, rat⁵, dog⁶, baboon⁷, pig⁷, sheep⁷, goat⁷, rabbit⁷ and cat⁸. In those studies, the isolation of MSCs was accomplished through its property to adhere to plastic, and they were shown to be capable of osteogenic, chondrogenic, adipogenic and myogenic differentiation. Another important characteristic of MSCs is their ability to produce cytokines and growth factors that support and regulate hematopoiesis^{9, 10}. Neuronal differentiation of these cells¹¹ is an important finding, since it denotes transcendence of the mesodermal to an ectodermal developmental pathway. In fact, it seems that the term “mesenchymal” may not be the best one to describe this particular stem cell. Recently, a related cell type termed multipotent adult progenitor cell (MAPC) was obtained from humans¹², rat and mouse¹³. Similar cells can be isolated from postnatal murine BM, muscle, and brain¹⁴. The methodology described for the culture of MAPCs includes growth on a fibronectin-coated surface, and murine MAPCs were reported to be leukemia inhibitory factor dependent. It is not clear how close MSCs and MAPCs are, and further studies are necessary to verify whether or not they represent two faces of the same coin.

Expansion of MSCs during culture is still difficult to achieve for they tend to lose their proliferative and differentiation capabilities under standard culture conditions^{15, 16}. The isolation of murine mesenchymal stem cells (mMSCs) using standard methods render a heterogeneous cell population with high degree of hematopoietic contaminants¹⁷. The *in vitro* expansion of mMSCs may provide raw matter for *in vivo* studies concerning cell and genetic therapy, and subsequent development of pre-clinical protocols to treat a wide range of diseases.

We have established simple culture conditions for murine bone marrow that result in the establishment of a homogeneous cell population capable to differentiate along osteogenic and adipogenic pathways, as well as to support hematopoiesis. This cell population can be expanded for up to 40 passages without losing its differentiation potential, and hence is operationally referred to as mMSCs. Flow cytometer analysis using 14 surface markers revealed mMSCs are positive for CD29, CD49e, CD44 and Sca-1. They share morphologic characteristics with cells in colonies of CFU-F assays, what allowed the evaluation of their frequency in bone marrow by this method. This is, to our knowledge, the

first report of culture methods allowing the *in vitro* expansion of murine MSCs with standard techniques.

METHODS

Animals

C57Bl/6 and BALB/c adult mice were purchased from LACEN (Porto Alegre, RS, Brazil). C57Bl/6 knockout mice, deficient for α -L-iduronidase (IDUA-KO), were derived from animals kindly provided by Dr. Elizabeth Neufeld (UCLA School of Medicine) and kept in standard conditions. Animals between 2 and 10 months were used in the experiments.

Tissue culture media

Normal tissue culture medium (NM) consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DME; Sigma Chemical, St Louis, MO) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Cultiab, São Paulo, Brazil). By the end of this study, DME added of 5.96 g HEPES buffer (Gibco BRL, Grand Island, NY) per liter was used as NM. No antibiotics were added to NM. Hematopoietic maintenance medium used was Iscove's modified Eagle's medium (IMDM; Sigma) containing 2% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco).

mMSC primary culture

BM was obtained from tibias and femurs of 8 – 39 weeks old mice killed by cervical dislocation. One of the ends of each bone was cut away, and a syringe filled with normal medium was inserted through the opposite end. BM was flushed out and dispersed by repeated flushing in and out the syringe. Cells were collected by centrifugation at 400 x g for 10 minutes, and resuspended in 5 ml of NM. Viable cells were counted in a hemocytometer using Trypan Blue exclusion method. The centrifugation step was repeated, and the pellet was resuspended in NM to a final concentration of 5×10^6 viable cells per ml. To initiate a mMSC culture, 3.5 ml of this suspension was dispensed in a well of a 6-well tissue culture dish (TPP; Trasadingen, Switzerland). The culture was kept in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C for at least 72 h, when non-adherent cells were removed by changing the medium. Confluence was attained by the sixth day after plating.

mMSC subculture

Confluent primary cultures were washed once with Ca²⁺Mg²⁺-free Hank's balanced salt solution (Sigma). A 0.25% trypsin solution containing 0.01% EDTA (Sigma) was laid onto the monolayer, and allowed to act for 10 min at 37°C. Detached cells were resuspended in NM to a final volume of 10.5 ml, and the resulting suspension was split into three new wells. Subsequent passages were performed similarly, but incubation was done for 5 min at room temperature (RT) and split ratios were 1:2. By passage 4 or 5, cultures were fairly homogeneous and were transferred to 75 cm² flasks (TPP). Subculture was performed when

cultures reached a minimum of 90% confluence. The split ratio was set to 1:6 at passage 5 or 6, 1:9 at passage 11 and reached a maximum of 1:12 at passage 30. Those values were defined empirically to permit subculture to be performed twice a week. Culture medium was changed every 3 – 4 days.

Morphological analysis and photographs

mMSC cultures were routinely observed on an inverted phase-contrast microscope (Zeiss, Germany). For detailed observations, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with ethanol for 5 min at RT, and stained for 2 min 30 sec with Giemsa. In some occasions fixation with ethanol was skipped. Photos were taken by a digital camera (AxioCam; Zeiss) coupled to an inverted microscope (AxioVert; Zeiss), using AxioVision 3.1 software (Zeiss).

Differentiation assays

Osteogenic differentiation was induced culturing mMSCs for up to 4 weeks in NM supplemented with 10^{-8} M dexamethasone, 5 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid 2-phosphate and 10 mM β -glycerophosphate as previously described¹⁷. To observe calcium deposition, cultures were washed once with PBS, and stained for 5 min at RT with Alizarin Red S stain (Nuclear, São Paulo, SP, Brazil), pH 4.2. Excess stain was removed by several washes with distilled water.

To induce adipogenic differentiation, mMSCs were cultured for up to 4 weeks in NM supplemented with 10^{-8} M dexamethasone and 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin, a slight modification a previously described protocol¹⁷. Adipocytes were easily discerned from the undifferentiated cells by phase-contrast microscopy. To further confirm their identity, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hour at RT, and stained with either Oil Red O (Sigma) solution (three volumes of 3.75% Oil Red O in isopropanol plus two volumes of distilled water) or Sudan Black B (Sigma) solution (tree volumes of 2% Sudan Black B in isopropanol plus two volumes of distilled water) for 5 min at RT.

Hematopoietic support assay

To determine the capacity of mMSCs to support hematopoiesis, two long-term cultures (LTCs) established from C57Bl/6 BM were analyzed. Cells from LTC 1 and LTC 2 were transferred to 24-well plates at passages 26 and 9, respectively, and were used on day 10 when they were confluent. A subculture of LTC 1 at passage 29 was used after 2 days, reaching about 30% confluence. Cells were irradiated with a dose of 1500 rad using a linear accelerator with 6 MV photons at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brazil). 1×10^5 hematopoietic stem cells, isolated from 8 weeks old C57Bl/6 mice by positive magnetic cell sorting using anti-Sca-1⁺ antibody (Sca-1 Multisort kit, MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA),

were added to 4 wells of each of the irradiated LTCs and also to 4 wells containing no adherent layer. After 7 days of culture with no change in medium, the non-adherent cells of each well were collected and the presence of hematopoietic precursors was determined by the hematopoietic colony-forming unit (CFU-H) assay. Cells were transferred to semisolid medium containing hematopoietic growth factors (Methocult; StemCell Technologies, Vancouver, Canada) in 24-well plates. Colonies were scored under inverted microscope observation, after 6 – 14 days of culture at 37° C.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Cells were trypsinized, collected and incubated for 30 minutes at 4°C with phycoerythrin (PE)- or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies against murine Sca-1, Gr-1, CD11b, CD13, CD18 CD19, CD29, CD31, CD44, CD45, CD49d, CD49e, CD90.2, CD117 and IgG (Pharmingen, San Diego, CA). Excess antibody was removed by washing. Detection of PE and FITC staining was accomplished on a FACScan cytometer equipped with a 488 nm argon laser (Becton Dickinson, San Diego, CA) using CellQuest software. WinMDI 2.8 software was used for building histograms.

CFU-F assay

The CFU-F assay was performed using a modification of a previously described protocol¹⁸. Cells obtained from fresh BM were resuspended in NM to a concentration of 2.25×10^5 viable cells/ml. 2 ml of this cell suspension were dispensed into each well of a 6-well plate. Medium was changed at days 3 and 8 of culture. On the 13th day, cultures were fixed and stained with Giemsa. The number of colonies displaying 5 or more cells was scored under inverted microscope examination. Colonies that had 4 cells were included in the counting only when one of them presented two nuclei. Colonies whose morphology clearly differed from the known mMSC morphology were excluded from the results.

RESULTS

mMSC long-term culture (LTC)

Several different culture conditions were attempted until standard conditions for the *in vitro* expansion of mMSCs were defined. Those involved the type of culture medium, cell concentration, plating density, incubation time until removal of non-adherent cells and split ratio (data not shown). One of the most important factors to determine the establishment of the long-term culture of mesenchymal stem cells was the density of the starting culture. When cultures were initiated with 3.5 ml of a 5×10^6 cell suspension per 9.03 cm^2 , LTCs developed. Lower plating densities did not provide the same result, as depicted in Figure 1. Cultures usually remained heterogeneous until passage 3 or 4. It was by passage 4 or 5 that a reasonable degree of homogeneity was achieved, and at this stage split ratios could be higher.

Four LTCs were analyzed during this study (Table 1). The morphology of the mesenchymal stem cells was very similar among all cultures (Figure 2). mMSCs are flat, plastic-adherent cells, with a size of around $90 \mu\text{m}$. They present a nucleus of about $30 \mu\text{m}$ diameter, with characteristic scattered granules. Cryopreservation of LTC 2 cells at passage 4, followed by thawing and cultivation, resulted in cultures with the same morphological and functional characteristics of cells grown continually.

mMSC growth kinetics

Confluence was usually reached 6 or 7 days after beginning of the cultures, under the conditions defined in this work. The interval between passages varied greatly until passage 10, as seen in Figure 3. Cell growth was continuous for all cultures (Figure 4). LTC 1 showed an increasing growth rate that reached a stable value after about 50 days in culture, while the growth rate of LTC 2 seemed to become stable about 70 days after thawing. LTC 3 reached its maximal growth rate after about 70 days of culture, and LTC 4 exhibited a stable growth rate after passage 5, by the 35th day of culture.

Differentiation of mMSCs

When subjected to osteogenic and adipogenic media, mMSCs differentiated into osteoblasts (Figure 5A) and adipocytes (Figure 5B). mMSC LTC 1 differed from the other LTCs in that osteogenic differentiation was accompanied by adipogenic differentiation (Figure 5C). Also, spontaneous adipogenic differentiation was observed when mMSCs were kept confluent for extended periods (Figure 5D). Absence of hematopoietic precursors was shown by the fact that mMSCs from LTCs 1 and 2 at passages 22 and 16, respectively, did not produce any observable hematopoietic colony when subjected to CFU-H assay.

mMSCs hematopoietic support

The ability of mMSCs to support hematopoiesis was assessed through co-culture with hematopoietic stem cells (HSCs) for one week. The results are summarized in Table 2. A small number of mMSCs at passage 29, which exhibited 30% confluence, were shown to nurse as many HSCs as a stromal monolayer derived from BM primary culture. Confluent monolayers derived from passages 9 and 26 were more efficient at keeping HSCs alive, so that CFU-H assays presented too many colonies to be precisely counted.

FACS analysis

When mMSC LTCs 1, 2 and 3 were analyzed at passages 26, 14 and 10, respectively, they showed a similar surface marker profile (Figures 6, 7 and 8). These three LTCs were positive for CD29, CD44, CD49e and Sca-1, and negative for CD11b, CD13, CD18, CD31, CD45, CD49d, CD19, surface Ig and Gr-1. mMSC LTC 2 differed from the others in that it expressed a low level of CD117. In turn, mMSC LTC 1 expressed CD90.2 while the others did not. These data indicate that after 10 passages, mMSCs cultures can be viewed as free from terminally differentiated hematopoietic cells.

Estimate of mMSC frequency in BM

We have found morphological correspondence among mMSC LTC cells and colonies observed in CFU-F assays (Figure 9). There was great variation in the number of colonies detected in CFU-F assays (Table 3). This led to comparison between groups to be performed using Kruskal-Wallis independent samples test (Table 4). As a preliminary estimate for the frequency of MSC in adult murine BM, all means were taken into account to find a value of 28.218 ± 11.589 MSCs per 4.5×10^5 nucleated cells (95% confidence interval), what corresponds to one mMSC per 11300 – 27000 BM cells.

DISCUSSION

The cell populations described in this work present characteristics that allow us to classify them as mesenchymal stem cells. They can differentiate along osteogenic and adipogenic pathways, and give support to hematopoietic stem cells. Besides this, their ability to sustain prolonged self-renewal is remarkable. This is, to our knowledge, the first report of *in vitro* expansion of murine MSCs using standard tissue culture techniques. The assumption that a stem cell must remain and proliferate in culture, while more differentiated cells are lost, directed the research, leading to the finding that some of the adherent cells from bone marrow can win the competition against terminally differentiated cells in long term culture. Other studies have described the *in vitro* expansion of mMSCs using retroviral transduction¹⁹, or irradiation²⁰. Since animal models are necessary for the development of clinical applications that require minimal *ex vivo* manipulation, the use of such techniques is not adequate. Other studies have focused on the isolation of mMSCs through positive selection of TGF- β 1-responsive BM cells²¹, but in that case prolonged self-renewal capacity of the cell population obtained was not demonstrated. The possibility of the mMSC LTCs described in this work represent the result of any sort of genetic transformation was not examined. Notwithstanding, the methods employed generated reproducible results, and hence it is not likely that genetic alterations were present. Cells with the same characteristic morphology and growth profile of mMSCs were obtained from BALB/c mice (data not shown), indicating that the results presented here are not strain-specific.

When observed at the molecular level by flow cytometry, three mMSC long-term cultures showed little difference concerning the expression of surface markers. Particularly, the expression of CD117 by mMSC LTC 2 should be interpreted cautiously, for it may represent a transitory state during the course of the culture. Future FACS analysis of that culture will help to solve this question. The other dissimilarity is the expression of CD90.2 by mMSC LTC 1. The monoclonal antibody used against CD90.2 (30-H12) does not cross-react with CD90.1 (information from the manufacturer), and hence there may exist different isoforms of CD90 other than CD90.2 being expressed by mMSC LTC 2 and 3, or none. Notwithstanding, the surface profile of mMSCs is compatible with that of murine stromal cell lineages²² and human MSCs (reviewed by Deans and Moseley²³). To date, the only report of adherent, BM derived stem cells from murine bone marrow are the ones termed mMAPCs¹³. These cells have been described as being positive for Flk-1, Sca-1, CD90, CD13 and stage-specific antigen I (SSEA-I), and negative for CD34, CD44, CD45, CD117, major histocompatibility complex (MHC) class I and II. Given the different culture conditions, a direct comparison of mMSCs to mMAPCs is not possible. On the other hand, the possibility

of the differences between these two cell populations being a consequence of culture conditions deserves to be investigated.

The finding that mMSCs have a distinctive morphology was surprising and useful to drive the search for the best conditions for their expansion, after the first LTC was established. One direct consequence of that was the comparison to colonies observed in CFU-F assays. After a period of 13 days in culture, an adherent cell that exhibited a typical mMSC morphology was not included in the counts, for one of the criteria to define such a cell type is the capacity of proliferation. Hence, colonies with 5 mMSC-like cells and up were counted, and occasionally colonies with 4 cells presenting one binucleated cell were counted. The results of CFU-F assays (Table 3) were used to estimate that one mMSC can be found in a range of 11300 – 27000 BM cells from adult mice, consistently with other data from the literature²⁴.

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disease resulting from deficiency of the lysosomal enzyme α -L-iduronidase (IDUA), and IDUA-KO animals have been reported to show phenotypic features similar to severe MPS I in humans²⁵. No obvious differences could be perceived among mMSCs generated from both normal and IDUA-KO animals. Bone marrow from normal and IDUA-KO animals does not seem to present differences in MSC frequency as well. It makes the murine model of MPS I adequate for future experiments aiming the correction of IDUA levels through cellular or genetic therapy mediated by mMSCs, since the pathology is not expected to affect the normal conditions of these cells *in vivo*.

The *in vitro* expansion of mMSCs has important implications for the development of basic research and also therapeutic strategies such as cellular and genetic therapy using murine models. Experiments that require large amounts of mMSCs can now be performed. Procedures that require a highly purified mMSC population, such as the assessment of the growth factors and surface molecules expressed by these cells, may take place as well. Further studies are necessary to explore the full potential of the mMSC.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Lisandra Nied, from the Radiotherapy Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, for irradiation of the culture plates, and professor Sídia Maria Callegari-Jacques for help with statistics. This work was supported by FAPERGS, CNPq and CAPES.

REFERENCES

- 1- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-74.
- 2- Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl*. 2002;38:7-12.
- 3- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- 4- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4857-4861.
- 5- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18:1417-1426.
- 6- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997;6:125-134.
- 7- Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, et al. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop*. 2000;379S:S71-S90.
- 8- Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol*. 2002;30:879-886.
- 9- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 α . *J Cell Physiol*. 1996;166:585-592.
- 10- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:57-66.
- 11- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
- 12- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625.
- 13- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-49.

- 14- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol.* 2002;30:896-904.
- 15- Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000;28:707-715.
- 16- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-g, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem cells.* 2002;20:530-541.
- 17- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;72:570-585.
- 18- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980;56:289-301.
- 19- Kitano Y, Radu A, Shaaban A, Flake AW. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells. *Exp Hematol.* 2000;28:1460-1469.
- 20- Dormandy SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang X-M, Basch RS. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10:125-140.
- 21- Hall FL, Han B, Kundu RK, Yee A, Nimni ME, Gordon EM. Phenotypic differentiation of TGF- β 1-responsive pluripotent premesenchymal prehematopoietic progenitor (P4 stem) cells from murine bone marrow. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10:261-271.
- 22- Charbord P, Oostendorp R, Pang W, et al. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues. *Exp Hematol.* 2002;30:1202-1210.
- 23- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-884.
- 24- Wu X, Peters JM, Gonzalez FJ, Prasad HS, Rohrer MD, Gimble JM. Frequency of stromal lineage colony forming units in bone marrow of peroxisome proliferator-activated receptor- α -null mice. *Bone.* 2000;26:21-26.
- 25- Russell C, Hendson G, Jevon G, et al. Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 1998;53:349-361.

TABLES

Table 1. **Characteristics of mice used to generate the mMSC long-term cultures.**

| Culture | Strain | Gender | Genotype | Age |
|----------------|---------------|---------------|-----------------|------------|
| LTC 1 | C57Bl/6 | male | normal | 10 weeks |
| LTC 2 | C57Bl/6 | male | normal | 8 weeks |
| LTC 3 | C57Bl/6 | female | IDUA-KO | 39 weeks |
| LTC 4 | C57Bl/6 | male | IDUA-KO | 21 weeks |

Table 2. **Hematopoietic support provided by mMSCs.** 1×10^5 Sca-1⁺ cells were cultured for 7 days in the presence or absence of an adherent layer formed by cells from LTC 1, LTC 2 or BM cultured for 5 days. After co-culture, cells were transferred to semi-solid medium containing hematopoietic growth factors, and hematopoietic colonies were enumerated. CFU-H assay revealed that the number CFU-Hs per 1×10^3 Sca-1⁺-enriched cells was 6.5 ± 0.75 (mean \pm SEM).

| Condition | Number of hematopoietic colonies after 7 days of co-culture (mean \pm SEM) |
|--|--|
| Sca-1 ⁺ cells cultured in absence of stromal cells | 0 |
| Sca-1 ⁺ cells cultured on 30% confluent, LTC 1 cells at passage 29 | $14.5 \pm 2.18^*$ |
| Sca-1 ⁺ cells cultured on a confluent monolayer formed by BM cultured in standard conditions for 5 days | $9.0 \pm 1.68^*$ |
| Sca-1 ⁺ cells cultured on a confluent monolayer of LTC 2 cells at passage 9 | > 20 |
| Sca-1 ⁺ cells cultured on a confluent monolayer formed by LTC 1 cells at passage 26 | > 25 |

* do not differ statistically; Student's t-test, $p = 0.1843$

Table 3. Number of colonies observed in CFU-F assays per 4.5×10^5 viable BM cells from 13 individuals.

| Age (weeks) | Genotype | Gender | Strain | CFU-F number (mean \pm SEM) |
|-------------|----------|--------|---------|-------------------------------|
| 21 | IDUA-KO | male | C57Bl/6 | 53.50 \pm 2.45 |
| 21 | IDUA-KO | male | C57Bl/6 | 23.17 \pm 1.30 |
| 21 | normal | male | C57Bl/6 | 47.50 \pm 2.17 |
| 12 | normal | male | C57Bl/6 | 18.83 \pm 1.33 |
| 12 | normal | male | C57Bl/6 | 13.00 \pm 1.00 |
| 8 | normal | male | C57Bl/6 | 63.00 \pm 2.77 |
| 8 | normal | male | C57Bl/6 | 54.83 \pm 0.79 |
| 8 | normal | female | C57Bl/6 | 23.33 \pm 2.26 |
| 8 | normal | female | C57Bl/6 | 8.67 \pm 0.99 |
| 8 | normal | female | C57Bl/6 | 14.33 \pm 1.76 |
| 8 | - | male | BALB/c | 21.67 \pm 1.17 |
| 8 | - | male | BALB/c | 13.83 \pm 1.47 |
| 8 | - | male | BALB/c | 11.17 \pm 1.17 |

Table 4. **Comparison of the mean number of CFU-Fs among groups.** No differences between groups could be observed when Kruskal-Wallis independent samples test was applied.

| Mean \pm SEM | Group | p value | | | | |
|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------|-------------|---------------------|
| | | 8 weeks old animals | 12 weeks old animals | female C57Bl/6 | male BALB/c | male normal C57Bl/6 |
| 38.3334 \pm 15.1667 | male IDUA-KO C57Bl/6 | 0.433 | 0.121 | 0.248 | 0.083 | 1.000 |
| 39.4333 \pm 9.9516 | male normal C57Bl/6 | - | - | 0.180 | 0.180 | - |
| 39.1190 \pm 7.6259 | male C57Bl/6 | - | - | 0.138 | 0.087 | - |
| 15.5556 \pm 3.1510 | male BALB/c | - | - | 0.827 | - | - |
| 15.4444 \pm 4.2702 | female C57Bl/6 | - | - | - | - | - |
| 41.3889 \pm 9.2743 | 21 weeks old animals | 0.307 | 0.083 | - | - | - |
| 15.9167 \pm 2.9167 | 12 weeks old animals | 0.602 | - | - | - | - |
| 26.3542 \pm 7.3556 | 8 weeks old animals | - | - | - | - | - |
| | | 8 weeks old animals | 12 weeks old animals | female C57Bl/6 | male BALB/c | male normal C57Bl/6 |

FIGURE LEGENDS

Figure 1. **Phase contrast pictures of three different cultures established from bone marrow of a C57Bl/6 mouse, at passages 1, 3 and 5.** The cultures were initiated from 3.5 ml (upper line), 2 ml (middle line) and 0.8 ml (bottom line) of a 5×10^6 nucleated marrow cell suspension, and kept in 3.5 ml of normal medium from the first medium change on. Passages of the three cultures were performed at the same time, at dilution rates of 1:3 on the first passage and 1:2 from then on. Cells on the middle and bottom lines failed to thrive at passage 4, while those on the upper line established a long-term culture. All pictures, 100 X magnification.

Figure 2. **Morphology of mMSCs.** LTCs were generated from BM of two normal (A, C and E) and two IDUA-deficient C57Bl/6 animals (B and D). Pictures show mMSCs after passage 19 (A), 8 (B), 39 (C, E) and 14 (D) passages, stained with Giemsa. A – D, 100-X. E, 400-X.

Figure 3. **Interval among passages.** Each point represents the number of days passed from the subsequent passage until the present one.

Figure 4. **Growth kinetics of three mMSC LTCs.** The growth area (GA) occupied by a primary mMSC culture was arbitrarily given the value 1. When the second passage took place, the split ratio at passage 1 (1:2) was multiplied by that value, meaning that at the end of passage 1 the cumulative GA was 2. By the time of third passage, the split ratio at passage 2 (1:2) was multiplied by the cumulative GA at passage 1 (1:2), giving a value of 4 to the cumulative GA at passage 2. This procedure was repeated for each passage, providing a theoretical growth curve that is directly proportional to the cell number. The black box in the LTC 2 curve is to show that the fourth passage involved cryopreservation of the cells for a week, thawing and transfer of the whole cell number to a new flask of same size.

Figure 5. **Differentiation of mMSCs.** (A) 8th passage cells from mMSC LTC 3 subjected to osteogenic differentiation, stained with Alizarin Red S. (B) Induced adipogenic differentiation of 33rd passage cells from LTC 1 is evidenced by Oil Red O-stained fat vacuoles. (C) 33rd passage cells from mMSC LTC 1 subjected to osteo-inductive conditions, stained with Alizarin Red S and Sudan Black B, evidencing adipogenic differentiation along with osteogenic differentiation. (D) Spontaneous adipogenic differentiation of 33rd passage cells from LTC 1 kept confluent for 4 weeks evidenced by Oil Red O staining.

Figure 6. Expression of surface markers by mMSC LTC 1 cells at passage 26. Histograms demonstrating the expression of the indicated surface molecules (black lines) are plotted against controls (green lines, surface Ig; red lines, CD19).

Figure 7. Expression of surface markers by mMSC LTC 2 cells at passage 14. Histograms demonstrating the expression of the indicated surface molecules (black lines) are plotted against controls (green lines, surface Ig; red lines, CD19).

Figure 8. Expression of surface markers by mMSC LTC 3 cells at passage 10. Histograms demonstrating the expression of the indicated surface molecules (black lines) are plotted against controls (green lines, surface Ig; red lines, CD19).

Figure 9. Morphology of mMSC LTC cells as compared to colonies in CFU-F assays. Morphological comparison of colonies formed by 25th passage cells from a male C57Bl/6 individual, seeded at 400 cells/9.2 cm² (A) with colonies observed in CFU-F assays from (B) a normal 5 months old C57Bl/6 male; (C) a 5 months old IDUA-KO male; (D) a 3 months old BALB/c male. Heterogeneous colonies with small hematopoietic contaminants scattered among the flat, large putative mMSCs were also observed (E). All pictures are in 50 X magnification.

Figure 1

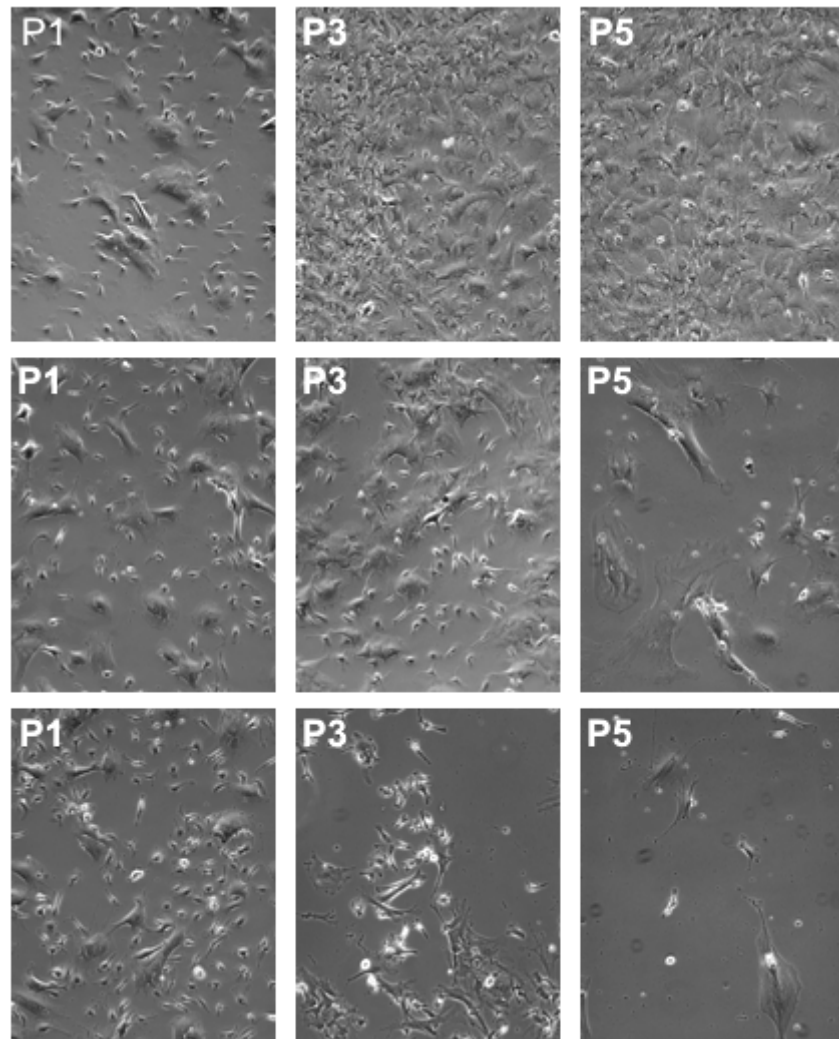


Figure 2

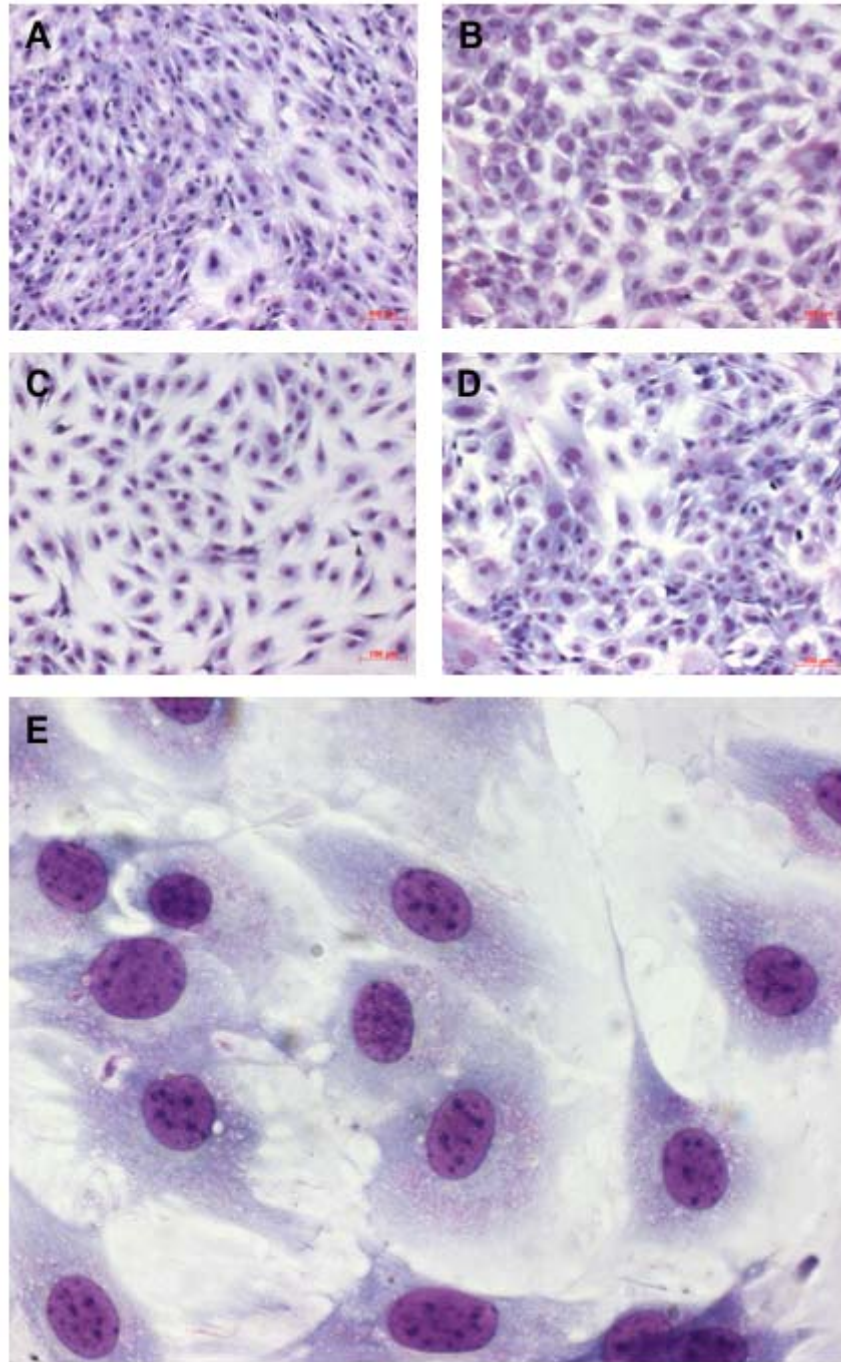


Figure 3

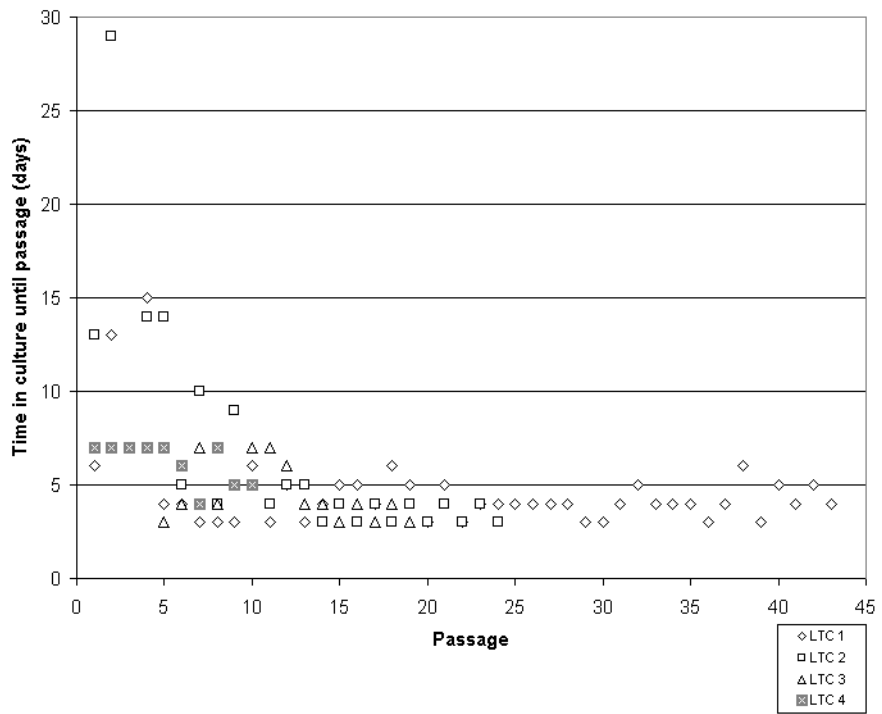


Figure 4

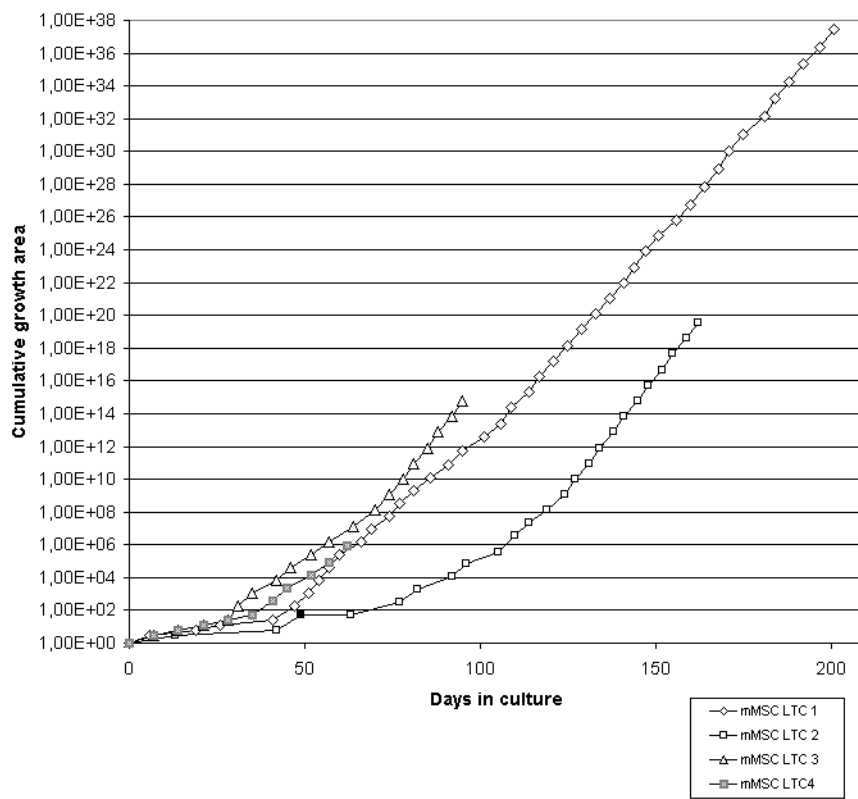


Figure 5

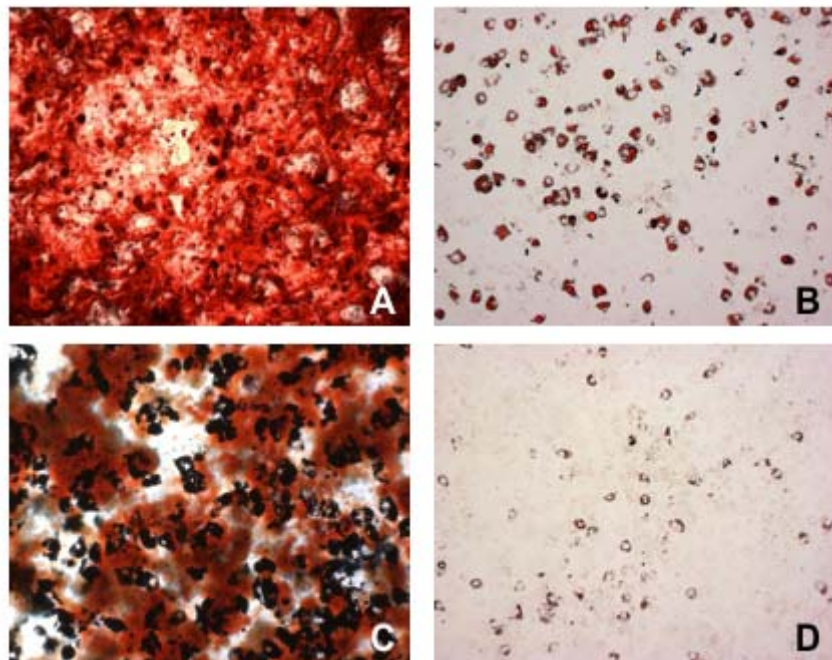


Figure 6

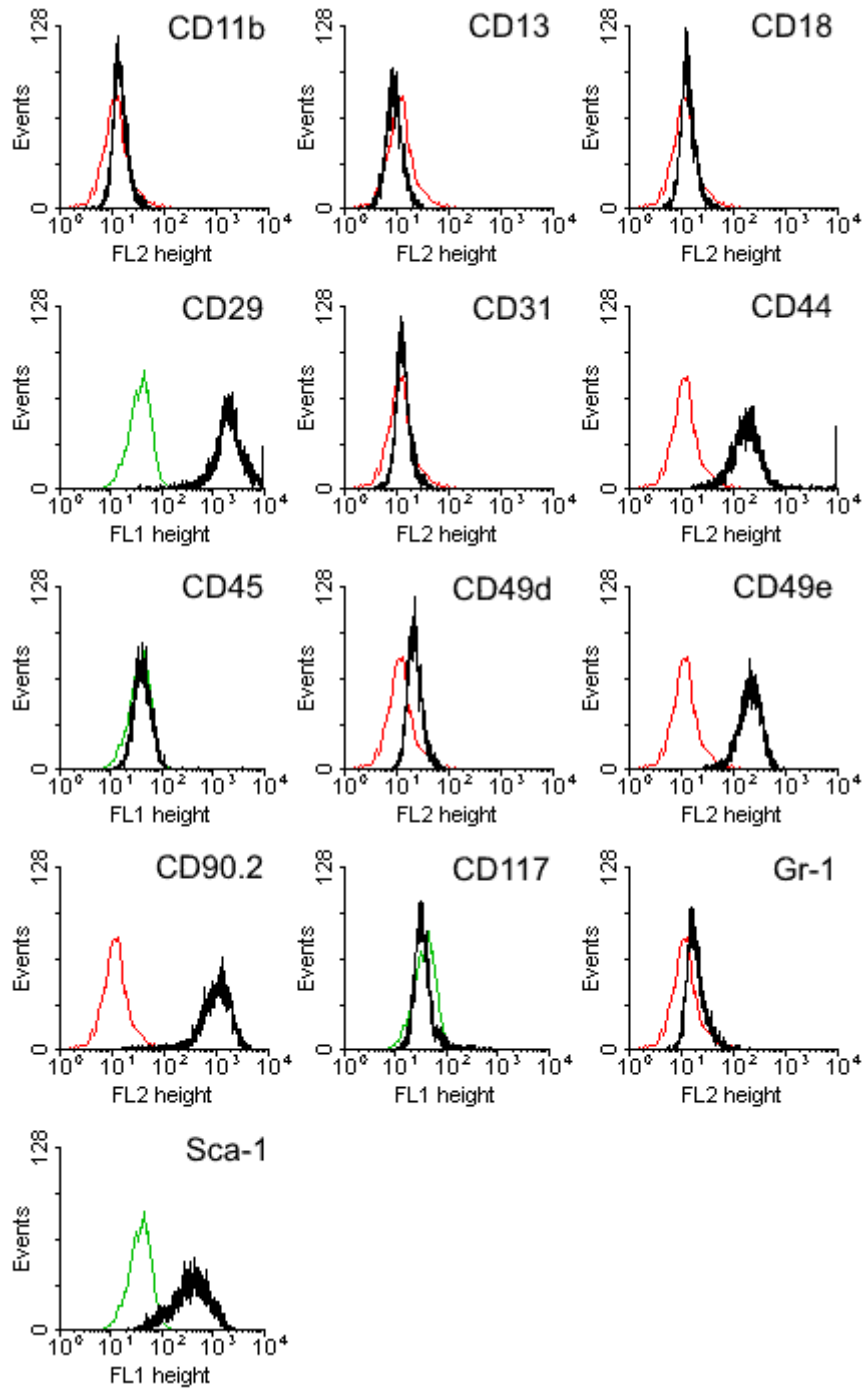


Figure 7

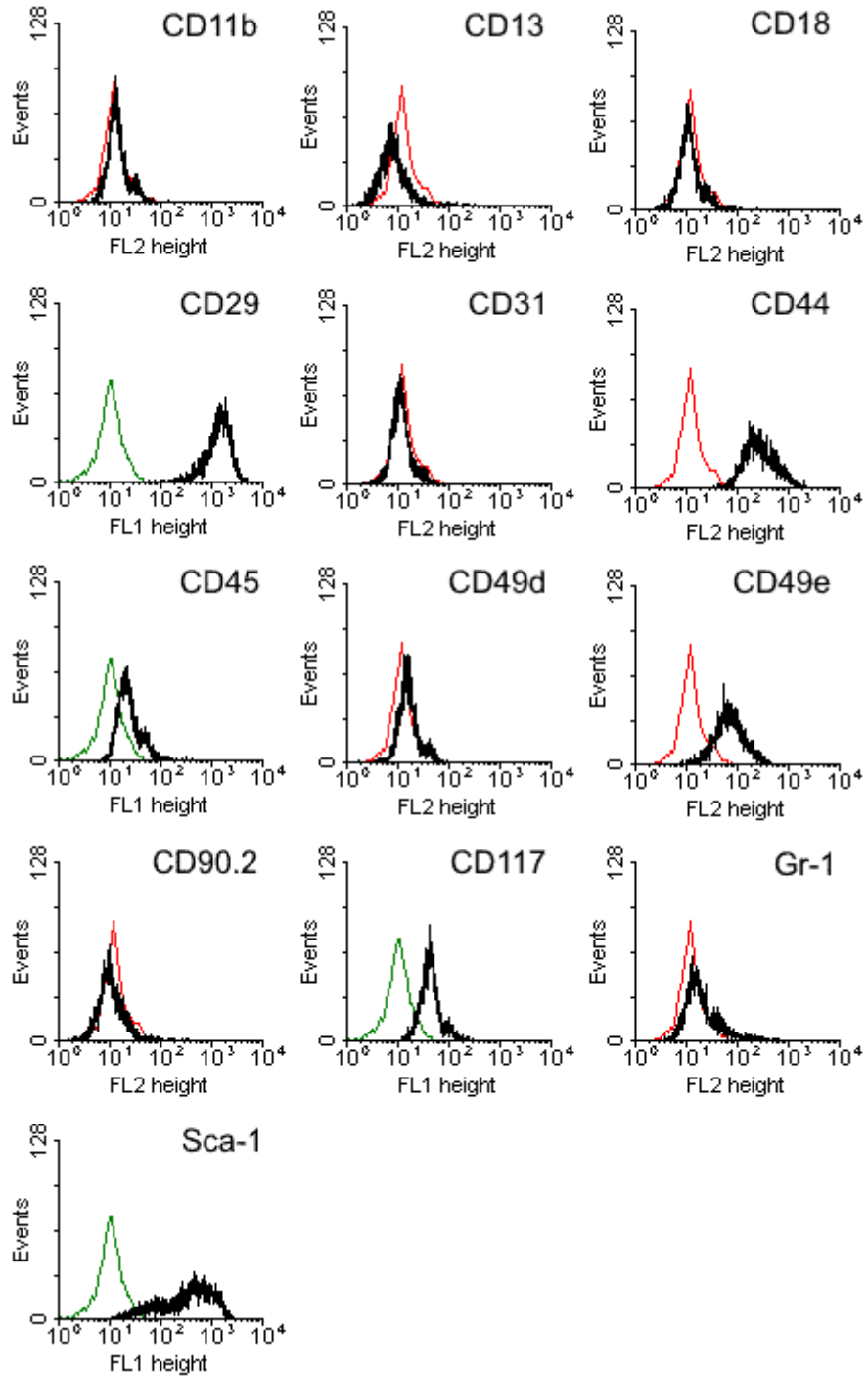


Figure 8

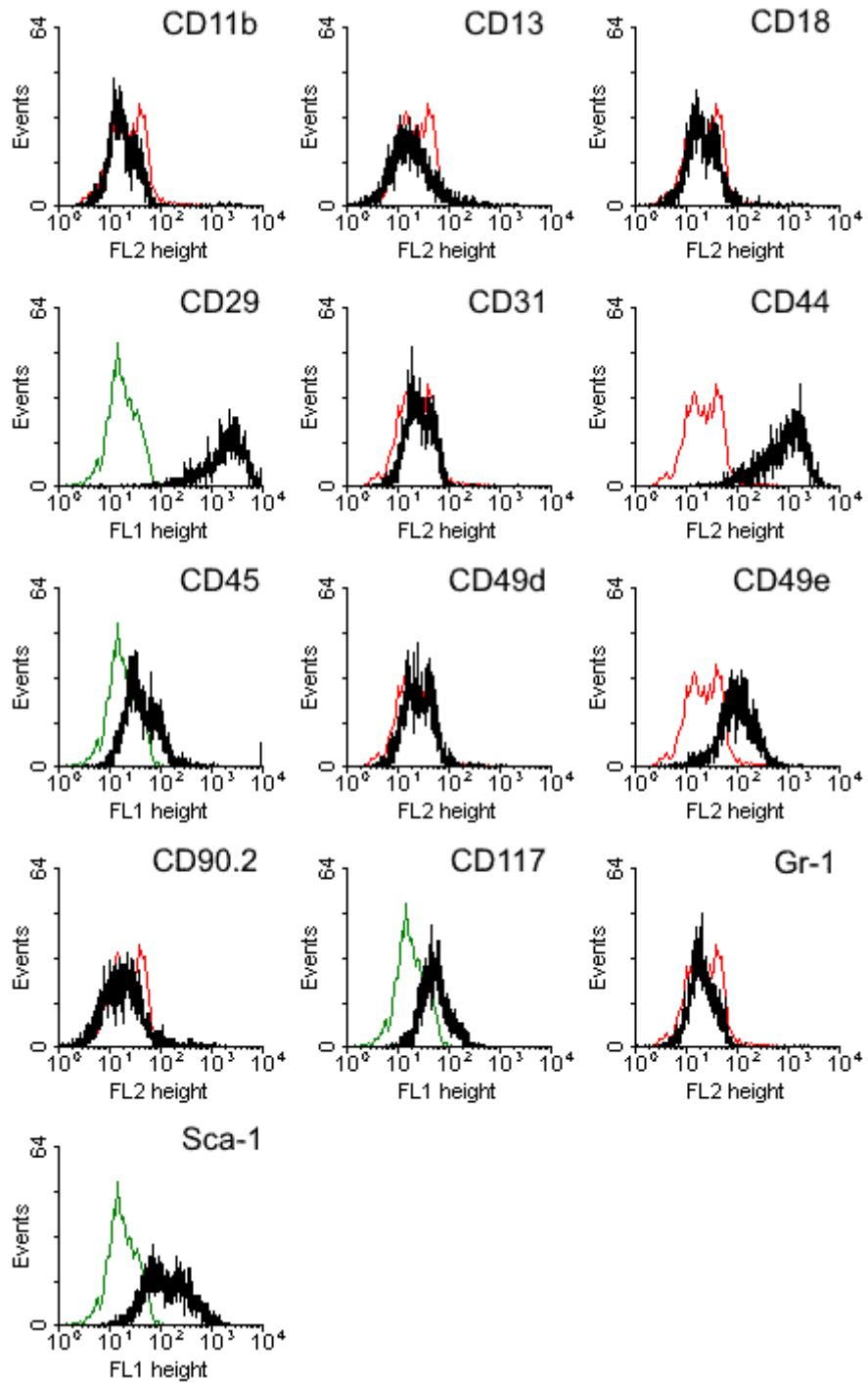
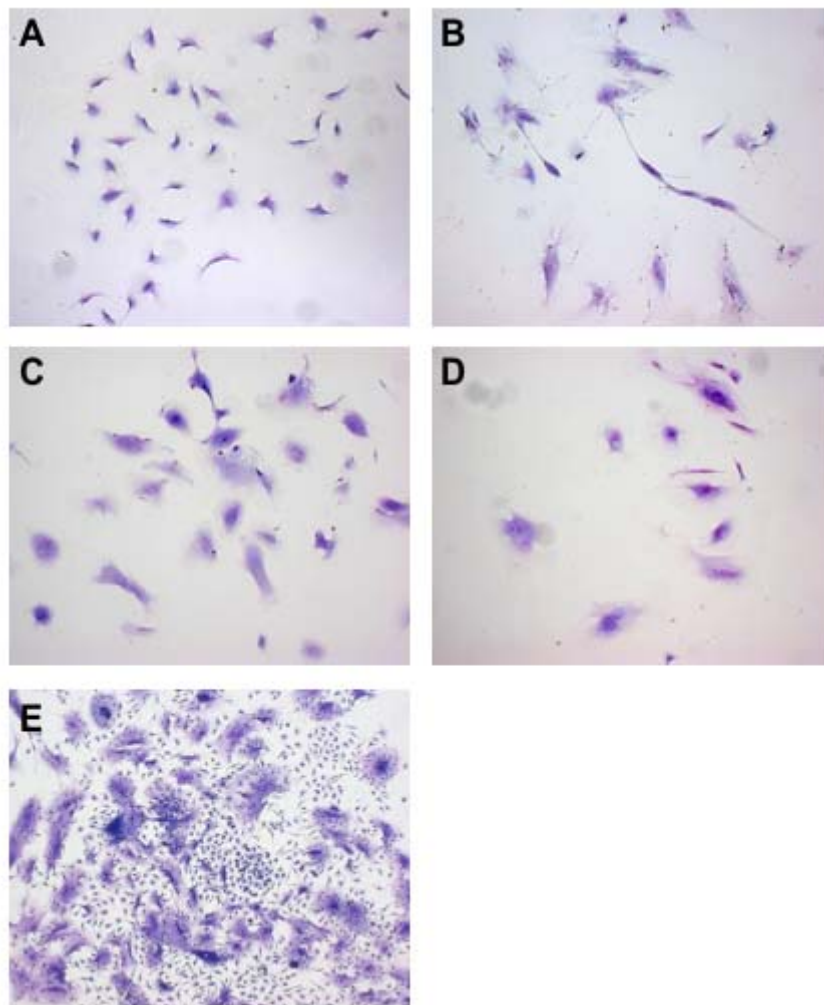


Figure 9



DISCUSSÃO

Os principais pontos derivados dos resultados obtidos neste trabalho são discutidos no corpo do manuscrito. Uma questão que permanece a ser respondida é concernente a que fatores controlam a expansão das mMSCs *in vitro*. O estabelecimento de uma cultura de longa duração parece ser dependente da densidade celular no início do cultivo (figura 1 do manuscrito), logo, do número de mMSCs presentes naquele momento. Um vestígio daquilo que pode ser uma das respostas para a questão surge quando tomamos conhecimento de que a expansão de um tipo celular semelhante, a mMAPC, é dependente de LIF (*leukemia inhibitory factor*), enquanto suas contrapartidas humanas e de rato não são (Jiang et al., 2002a). Se analisarmos o perfil de fatores secretados por MSCs humanas (Haynesworth et al., 1996) e por linhagens celulares murinas com características de MSCs (Dormandy et al., 2001), veremos que LIF é um destes, acompanhado por G-CSF (*granulocyte-colony-stimulating factor*), SCF (*stem cell factor*), M-CSF (*monocyte-colony-stimulating factor*), e interleucinas 6 e 11. Se o padrão de fatores secretados MSCs de camundongo for o mesmo de suas contrapartidas humanas, o LIF produzido pelas mesmas poderia estar exercendo uma função auto-estimulatória. Postulemos as seguintes condições:

- i) LIF estimula a proliferação da mMSC;
- ii) LIF tem ação local, ou seja, exerce seu efeito nas proximidades das células que o secretam, e pode agir sobre outras células que não as MSCs;
- iii) numa cultura primária de medula óssea de camundongo, o tipo celular responsável pela maior parte da produção de LIF secretado é a MSC;
- iv) existe uma quantidade mínima de LIF disponível no meio necessária para que a MSCs presentes na cultura ingressem num ciclo proliferativo;
- v) uma maior quantidade de MSCs produz uma maior quantidade de LIF, e vice versa.

O resultado seria uma cultura primária confluyente com um bom número de mMSCs. Quando repicada a uma taxa de 1:3, o número de mMSCs presentes na cultura de primeira passagem seria suficiente para manter o nível de LIF acima do limiar de estimulação da proliferação das mesmas, o que manteria sua expansão. As taxas de expansão iniciais seriam lentas, e aumentariam exponencialmente ao longo do tempo, até atingir um máximo. Células em estágios terminal de diferenciação (por exemplo, contaminantes hematopoiéticos como macrófagos) teriam uma taxa de proliferação menor, e tenderiam a desaparecer ao longo deste período. Neste modelo, o ponto crítico para o estabelecimento da LTC seria o número de mMSCs inicial. Um número muito baixo poderia não proliferar por não haver uma quantidade mínima de LIF para o exercício de seu efeito biológico, ou poderia proliferar a uma taxa tão baixa que não haveria proliferação perceptível. Por outro lado, se iniciarmos

uma cultura com uma concentração celular maior, uma maior quantidade de LIF estaria presente e desencadearia a proliferação das mMSCs a uma taxa observável. As LTCs estabelecidas neste trabalho exibiram uma curva de crescimento que se ajusta a este modelo (figura 4 do manuscrito). É conveniente lembrar que este modelo de proliferação dependente de LIF autócrino é apenas uma das inúmeras interações celulares mediadas por fatores solúveis em uma cultura primária e, portanto, não pode ser considerado uma resposta teórica definitiva para a questão levantada inicialmente. Estudos *a posteriori* utilizando as mMSCs resultantes deste trabalho serão úteis para verificar a aplicabilidade deste modelo.

RESUMO E CONCLUSÕES

Existe um interesse crescente pelo controle das condições de cultivo necessárias para a expansão de células-tronco de indivíduos adultos devido ao grande potencial para o desenvolvimento de pesquisa básica e de aplicações terapêuticas apresentado pelas mesmas. Atualmente, a literatura apresenta poucos trabalhos que detalhem a biologia da célula-tronco mesenquimal (MSC) de camundongo, revelando a necessidade de estudos voltados para este tema. Quatro culturas de longa duração foram produzidas com células da medula óssea de camundongos normais e IDUA *knock-out* através de técnicas de cultivo relativamente simples. Estas culturas puderam ser mantidas por até 40 passagens, e demonstraram ser morfolologicamente homogêneas. Células dessas culturas puderam ser induzidas a diferenciarem-se ao longo de vias de diferenciação adipogênica e osteogênica, e revelaram ser capazes de suportar o crescimento e a proliferação de células-tronco hematopoiéticas. Por apresentarem tais características funcionais, essas populações celulares foram operacionalmente definidas como MSCs. Quando o repertório de marcadores de superfície dessas células foi observado por meio de citometria de fluxo, verificou-se que elas eram positivas para Sca-1, CD29, CD44 e CD49e, e eram negativas para CD11b, CD13, CD18, CD19, CD31, CD45, CD49d e Gr-1. Este perfil de moléculas de superfície assemelha-se àquele descrito para a MSC humana, e indica ausência de contaminantes hematopoiéticos. Uma verificação preliminar da frequência da MSC na medula óssea de camundongo foi realizada, trazendo a estimativa de que uma MSC está presente numa faixa de 11.000 – 27.000 células. Finalmente, os dados revelaram que não há diferenças imediatamente perceptíveis entre camundongos normais e do modelo murino de MPS I no tocante à MSC, o que indica que os trabalhos futuros visando à correção da deficiência de α -L-iduronidase neste modelo utilizando a MSC são viáveis. O estabelecimento da metodologia para o cultivo e expansão da MSC murina através de técnicas simples vem preencher uma lacuna existente no campo dos modelos experimentais animais, trazendo novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de terapia celular/genética em modelos experimentais murinos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

There is growing interest in the control of the culture conditions necessary for the expansion of adult stem cells because of their great potential for the development of basic research and therapeutic applications. To date, the literature presents few works that detail the biology of the mesenchymal stem cell (MSC) from mouse, revealing the need for studies on this theme. Four long-term cultures were generated using bone marrow cells from normal and IDUA knock-out mice through relatively simple culture techniques. These cultures could be kept for up to 40 passages, and were morphologically homogeneous. Cells from these cultures could be induced to differentiate along adipogenic and osteogenic pathways, and revealed capability to support the growth and differentiation of hematopoietic stem cells. These cell populations were operationally defined as MSCs for presenting such functional characteristics. When their repertoire of surface markers was observed through flow cytometry, they were positive for Sca-1, CD29, CD44 and CD49e, and negative for CD11b, CD13, CD18, CD19, CD31, CD45, CD49d and Gr-1. This surface molecule profile is similar to that reported for human MSC, and indicates absence of hematopoietic contaminants. A preliminary assessment of MSC frequency in murine bone marrow was performed, providing an estimate that one MSC is present in a range of 11,000 – 27,000 cells. Finally, the data reveal that there are no immediately perceptible differences concerning the MSC between normal mice and animals from the murine model of MPS I. This indicates that future works aiming the correction of α -L-iduronidase deficiency using MSCs in that model are practicable. The establishment of the methodology for the culture and expansion of murine MSC through simple techniques fills a gap in the field of experimental animal models, and brings new perspectives for the development of cellular/genetic therapy in murine experimental models.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso ZZC, Forneck ED, Nardi NB. Establishment of an adherent cell layer from human umbilical cord blood. *Genet Mol Biol.* 2000;23:519-522.
- Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999;283:534-537.
- Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, et al. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica.* 1999;84:1110-1149.
- Breems DA, Blokland EAW, Siebel KE, Mayen AEM, Engels LJA, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34⁺ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood.* 1998;91:111-117.
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994;56:283-294.
- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259-264.
- Clarke LA, Russell CS, Pownall S, et al. Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine α -L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet.* 1997;64:503-511.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-884.
- Dormandy SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang X-M, Basch RS. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10:125-140.
- Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4080-4085.
- Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. *Science.* 2000;287:1433-1438.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 α . *J Cell Physiol.* 1996;166:585-592.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5:309-313.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* 2001;97:1227-1231.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al.(a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-49.

- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol*. 2002;30:896-904.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, et al. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med*. 2001;344:182-188.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10711–10716.
- Long, MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27:677–690.
- Lieberman JR, et al. Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res*. 1998;16:330-339.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998;4:415-428.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697–705.
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997;276:66-71.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKecher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290:1779-1782.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88:287-298.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000;113:1161-1166.
- Nardi NB, Alfonso ZC. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:601-609.
- Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, NY: McGraw-Hill; 1995:2465–2494.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells*. 2001;19:193-204.
- Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Peck WA, ed. *Bone and mineral research*. Vol. 3. New York, NY: Elsevier; 1985:1-25.

- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4857-4861.
- Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:1142–1147.
- Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl*. 2002;38:7-12.
- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72:570-585.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-74.
- Russell C, Henderson G, Jevon G, et al. Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 1998;53:349-361.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625.
- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-g, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem cells*. 2002;20:530-541.
- Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis*. 2000;26:234–246.
- Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ, Neufeld EF. Enzyme replacement therapy in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12937-12941.
- Slack JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000;287:1431-1433.
- Turner CT, Hopwood JJ, Brooks DA. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I: altered distribution and targeting of α -L-Iduronidase in immunized rats. *Mol Genet Metab*. 2000;69:277-285.
- van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science*. 2000;287:1439-1441.
- Verfaillie CM. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood*. 1992;79:2821-2826.

- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18:1417-1426.
- Watt FM, Hogan BLM. Out of eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000;287:1427-1430.
- Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287:1442-1446.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
- Zheng Y, Zhou J, Rozengurt N, et al. Treatment of the mouse model of MPS I by transplantation of bone marrow and of genetically modified bone marrow. In: *Strategies for therapy of MPS and related diseases: Proceedings of the 16th Annual MPS Conference*. Los Angeles, CA: The National MPS Society, Inc.; 2001:54.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-228.
- Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477–488.