

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EFEITOS DA INJEÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

ISOLADAS DE MEDULA ÓSSEA NO HIPOCAMPO DE RATAS

WISTAR

PATRÍCIA BENCKE GRUDZINSKI

Orientadora: Prof. Dra. Christianne Gazzana Salbego

Co-Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Horn

Porto Alegre, 2009

DEDICO

Aos meus pais, meu irmão e aos meus amigos que
me apoiaram ao longo desta caminhada...

Agradecimentos

À minha orientadora, Christianne pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança;

À Ana, minha orientadora, amiga e exemplo, pela paciência, por todos ensinamentos, pela ajuda, pela confiança e por plantar em mim a curiosidade e a felicidade da vida científica;

Aos amigos do laboratório 23: Aline, Thaline, Daniéli, Fabrício, em especial ao Rudimar e à Juliana por estarem sempre prontos a me ajudar quando precisei, e em especial também à Elisa que me ajudou muito nos últimos experimentos;

Às minhas amigas Michele, Camila, Vanessa, Andreza que estiveram sempre me apoiando e me segurando nos tropeços;

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado, apoiando e incentivando; meu exemplo de persistência, mãe e mulher;

Ao meu pai, meu exemplo acima de tudo, pelo apoio, pela compreensão e pela ajuda financeira;

Ao meu irmão, pelos momentos de descontração e pelo apoio;

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica;

E à UFRGS por ser uma universidade pública e de qualidade.

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Lista de Figuras	3
Lista de Tabelas	4
Lista de Abreviaturas	5
1. Introdução	6
1.1. Doenças neurodegenerativas	6
1.2. As células tronco	7
1.3. Transdiferenciação das células tronco	8
1.4. Terapia celular para doenças neurodegenerativas	10
1.5. Neuroinflamação	12
1.6. Neurogênese	16
2. Objetivos	18
2.1. Objetivos gerais	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Isolamento e manutenção das MSC	19
3.2. Injeção estereotáxica das MSC em ratas	20
3.3. Técnica de <i>Western Blotting</i>	20
3.4. Análise Estatística	21
4. Resultados	22
4.1. Análise da degeneração neural	22

4.2. Análise da ativação microglial	25
4.3. Análise da ativação astrocitária	26
4.4. Análise da neurogênese	28
5. Discussão	30
6. Conclusões	35
7. Perspectivas	36
8. Referências Bibliográficas	37

RESUMO

A terapia celular utilizando células tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea surge como alternativa para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Apesar dos resultados positivos com o uso dessas células, seus efeitos e mecanismos de interação com o tecido nervoso ainda são desconhecidos. Resultados obtidos pelo nosso grupo sugerem que o meio condicionado pelas MSC induz morte celular e neuroinflamação em culturas organotípicas de hipocampo de ratos. Considerando um possível efeito adverso dessas células, o objetivo do presente estudo foi investigar se a injeção estereotáxica intra-hipocampal de MSC isoladas de medula óssea de ratos causa neurodegeneração, neuroinflamação e neurogênese nessa estrutura. Para isso ratas Wistar de 30 dias receberam, através de cirurgia estereotáxica 100.000 células em 3 μ L de HBSS no hipocampo direito (ipsilateral). Ratas controles receberam somente HBSS. Após 3 ou 7 dias de recuperação, os hipocampus foram retirados homogeneizados em tampão de lise e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida de 10 ou 12%. Lectina IB4 e anticorpos para β -tubulina 3, Neu N, GFAP e doublecortin foram usados para estudar os efeitos da administração de MSC. Nossos dados sugerem uma diminuição de 20% no imunoconteúdo de β -tubulina 3 no hipocampo ipsilateral 3 dias após a cirurgia, retornando a níveis de controle depois de 7 dias. Não foram encontradas diferenças no imunoconteúdo de Neu N em 3 dias de recuperação. O imunoconteúdo de GFAP aumentou tanto no hipocampo ipsilateral quanto no contralateral, retornando a níveis de controle após 7 dias de recuperação. Dados preliminares avaliaram a ligação de lectina IB4, uma glicoproteína que liga especificamente a resíduos de galactose presente só em células microgliais, onde nós observamos uma tendência ao aumento dessa ligação nos hipocampus ipsilaterais que receberam as MSC após 3 dias de recuperação. Não observamos diferença no imunoconteúdo de doublecortin em nenhum dos dias testados. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a injeção de MSC derivadas de medula óssea no hipocampo pode induzir retração neuronal, astrogliose e ativação microglial, possivelmente levando a neuroinflamação. Além disso, não vimos evidência de que a neurogênese é afetada. Em conjunto, nossos resultados sugerem que as MSC podem apresentar efeitos adversos quando administradas no sistema nervoso.

ABSTRACT

Cell therapy using bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) seems to be a new alternative for the treatment of neurodegenerative diseases. In spite of several good results with the use of these cells their side effects and mechanism of interaction with cells of the nervous tissue are still unknown. Previous data obtained in our group suggested that the conditioned medium from MSC induce cell death and neuroinflammation in organotypic hippocampal slice cultures. Considering possible side effects of these cells, the aim of the present study was to investigate if the stereotaxic intra-hippocampal injection of bone marrow isolated rat MSC causes neurodegeneration, neuroinflammation and neurogenesis in this structure. For this, 30 day- female Wistar rats received through stereotaxic surgery 100.000 cells in 3 μ L of HBSS in the right hippocampus (ipsilateral) Control rats received only HBSS. After 3 or 7 days of recovery, the hippocampus was isolated, homogenized in lysis buffer and the samples were submitted to a 10 or 12% SDS-PAGE electrophoresis. Lectin IB4 and antibodies for β -tubulin 3, Neu N, GFAP and doublecortin were used to study the effects of the administration of MSC. Our data suggest a 25% decrease in β -tubulin 3 immunoccontent 3 days after the surgery in the ipsilateral hippocampus, returning to control levels after 7 days. No differences were found in Neu N immunoccontent after 3 days of recovery. GFAP immunoccontent increased in both ipsilateral and contralateral hippocampus, returning to control levels after 7 days of recovery. Preliminary data evaluating the binding of lectin IB4, a glycoprotein that binds specifically to galactosyl residues present only in microglial cells, we observed a tendency in binding increase in the ipsilateral hippocampus that received MSC after 3 days of recovery. No differences were observed in the immunoccontent of doublecortin in any of the tested days. The results obtained in this work suggest that bone marrow MSC injection in hippocampus could induce neuronal retraction, astrogliosis and microglial activation, possibly leading to neuroinflammation. Also, we did not see any evidence that neurogenesis is affected. Together, these results suggest that MSC may have side effects when administered in the nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tecidos originados a partir das células tronco mesenquimais.....	9
Figura 2: A terapia celular e seus possíveis benefícios após isquemia.....	11
Figura 3: Participação da ativação glial na morte neuronal.....	14
Figura 4: Imunoconteúdo de β -tubulina 3 3 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas <i>Wistar</i>	22
Figura 5: Imunoconteúdo de β -tubulina 3 7 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas <i>Wistar</i>	23
Figura 6: Imunoconteúdo de Neu N 3 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas <i>Wistar</i>	24
Figura 7: Marcação com Lectina IB4 3 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas <i>Wistar</i>	25
Figura 8: Imunoconteúdo de GFAP 3 dias após a administração de MSC em hipocampos de ratas <i>Wistar</i>	26
Figura 9: Imunoconteúdo de GFAP 7 dias após a administração das MSC em hipocampos de ratas <i>Wistar</i>	27
Figura 10: Imunoconteúdo de doublecortin 3 dias após a administração de MSC em hipocampos de ratas <i>Wistar</i>	28
Figura 11: Imunoconteúdo de doublecortin 7 dias após a administração de MSC em hipocampos de ratas <i>Wistar</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados na técnica de Western Blotting.....	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido alfa amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo (***B**rain **D**erived **N**eurothrophic **F**actor*)

CA: corno de Ammon (***C**ornus **A**mmonis*)

DMSO: dimetil sulfóxido

EGF: fator de crescimento epidermal (***E**pidermal **G**rowth **F**actor*)

FGF: fator de crescimento de fibroblastos (***F**ibroblast **G**rowth **F**actor*)

GABA: ácido γ -aminobutírico

GDNF: fator neurotrófico derivado da glia (***G**lial **D**erived **N**eurotrophic **F**actor*)

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (***G**lial **F**ibrillary **A**cid **P**rotein*)

HGF: fator de crescimento de hepatócitos (***H**epatocyte **G**rowth **F**actor*)

IL-6: interleucina 6

IL-1 β : interleucina 1 beta

iPSs: células pluripotentes induzidas

MHC: complexo de histocompatibilidade principal (***M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex*)

NO: óxido nítrico (***N**itric **O**xide*)

MSC: células tronco mesenquimias (***M**esenchymal **S**tem **C**ells*)

NGF: fator de crescimento de nervos (***N**erve **G**rowth **F**actor*)

NMDA: **N-Metil-D-Aspartato**

SCF: fator de célula tronco (***S**tem **C**ell **F**actor*)

SNC: **sistema nervoso central**

VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular (***V**ascular **E**ndotelial **G**rowth **F**actor*)

TNF- α : fator de necrose tumorar alfa (***T**umor **N**ecrosis **F**actor **A**lpha*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas afetam diretamente as características que fazem a vida dos seres humanos tão especial, como a memória, a fala, a personalidade e os movimentos especializados. Dentre as doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), podemos destacar, dentre outras, as desordens cerebrovasculares, a epilepsia, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla. Em conjunto, essas doenças afetam um grande segmento da população e, na maioria dos casos, levam à incapacidade física e/ou mental (Price, 1999). Para cada uma dessas doenças, na maioria das vezes, apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis.

Cada uma das doenças neurodegenerativas tem suas próprias características, afetando diferentes populações de neurônios em diferentes locais do SNC. Um ponto em comum nessas doenças parece ser a presença do componente inflamatório, que na maioria das vezes contribui para acelerar a degeneração (Floden et al., 2005; Mosley et al., 2006; Sriran e O'Callaghan, 2007; Wang et al., 2007a).

Pela dificuldade de tratamento ainda hoje enfrentada, novas estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas e, nesse contexto, a terapia celular surge como uma esperança no tratamento das doenças que acometem o SNC (Kan et al., 2007, Dharmasaroja, 2009).

1.2. As células tronco

As células tronco podem ser definidas como células com capacidade de auto renovação e capazes de originar outras células (da Silva Meirelles et al., 2006). Dentre as células tronco mais estudadas e candidatas a uma futura utilização clínica estão: as *células tronco embrionárias*, que carregam consigo problemas éticos e religiosos e sabe-se que podem gerar teratomas quando administradas *in vivo* (Blum e Benvenisty, 2008); as *células pluripotentes induzidas* (iPSs) que, embora promissoras, ainda necessitam vetores virais para sua geração e nessas condições têm sua utilidade na clínica bastante questionada (Nishikava et al., 2008); e as *células tronco adultas*, sendo representadas pelas células tronco neurais, hematopoiéticas, mesenquimais, dentre outras (Mimeault e Batra, 2006) e que no momento apresentam-se as mais promissoras.

Dentre as células tronco adultas encontramos as células tronco mesenquimais (MSC), que estão ganhando atenção devido ao seu possível uso para terapias celulares. São definidas como células multipotentes e capazes de originar tecidos de origem mesodérmica como o cartilaginoso, o ósseo, o adiposo e o muscular (Baksh et al., 2004). As principais vantagens da utilização dessas células sobre as células embrionárias são a fácil obtenção e manutenção, a possibilidade de transplante autólogo (sem a rejeição imunológica decorrente de transplantes), a baixa imunogenicidade que apresentam e a inexistência de conflitos éticos (Uccelli et al., 2006). Elas podem ser facilmente obtidas de várias fontes como a medula óssea, o tecido adiposo e o tecido do cordão umbilical. Acredita-se que estejam presentes em todos os órgãos e tecidos do organismo (da Silva Meirelles et al., 2006) e estejam situadas no corpo como pericitos, com a função de estabilizar os

vasos sanguíneos e contribuir para a homeostase dos tecidos (da Silva Meirelles et al., 2008). O método de obtenção dessas células é bastante simples e baseia-se na adesão ao plástico, podendo ser facilmente mantidas e expandidas em cultura (da Silva Meirelles, 2003; Baksh et al., 2004; Jori et al., 2005).

1.3. Transdiferenciação das células tronco

O termo transdiferenciação é comumente utilizado para descrever a habilidade das células tronco adultas em originarem células de tecidos onde elas não residem ou células de outros folhetos embrionários (Krabbe et al., 2005). É o caso, por exemplo, da geração de neurônios e células gliais a partir de MSC, já descrito por vários autores (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Abouelfetouh et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Bossolasco et al., 2005; Jori et al., 2005; Rivera et al., 2006; Lei et al., 2007).

Os protocolos utilizados para a diferenciação *in vitro* das MSC em células da linhagem neural incluem a utilização de compostos como β -mercaptoetanol (Lei et al., 2007), DMSO (Suzuki et al., 2004), ácido retinóico (Abouelfetouh et al., 2004) e fatores de crescimento como FGF e EGF (Bossolasco et al., 2005). A formação de neuroesferas já foi evidenciada, sendo essa capaz de originar tanto neurônios quanto astrócitos e oligodendrócitos, visualizados utilizando-se imunistoquímica para marcadores específicos (Suzuki et al., 2004).

Há muita discussão em torno da real transdiferenciação das MSC em neurônios e células gliais (Krabbe et al., 2005). Muitos autores acreditam que as MSC não são capazes de diferenciar em neurônios (Castro et al., 2002) e que os marcadores neurais observados, principalmente após a utilização de substâncias

agressivas como β -mercaptoetanol e DMSO, sejam apenas o resultado de um grande estresse celular e, portanto, artefato da técnica (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004; Lu e Tymanski, 2005). A figura 1 mostra alguns dos tipos celulares já gerados a partir das MSC, onde a interrogação em vermelho questiona se realmente a transdiferenciação das MSC em neurônios e células gliais existe.

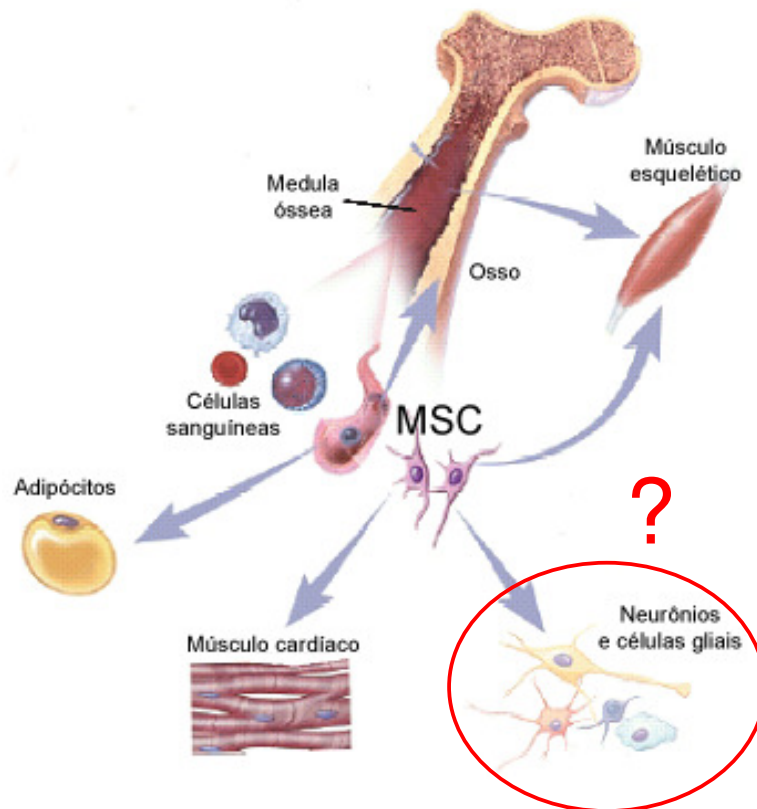


Figura 1: Tecidos originados a partir das células tronco mesenquimais. Por sua origem mesodérmica sabe-se que são capazes de gerar tecido adiposo, cartilaginoso, ósseo e muscular. A transdiferenciação em células neuronais e gliais é muito questionada e acredita-se ser apenas um artefato dos protocolos utilizados. Adaptada do livro “*Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*”, publicado e fornecido pelo National Institute of Health, EUA.

1.4. Terapia celular para doenças neurodegenerativas

Vários estudos investigam o uso de células tronco como uma alternativa para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Foi verificado o efeito benéfico dessa terapia em estudos pré-clínicos para doenças como Alzheimer (Wu et al., 2007), Parkinson (Wang et al., 2007), isquemia cerebral (Chen et al., 2001; Chopp e Li, 2002; Zhao et al., 2002; Borlongan et al., 2004; Mendez-Otero et al., 2007; Guzman et al., 2008; Dharmasaroja, 2009), lesão de medula espinhal (Lee et al., 2003), dentre outras.

A melhora observada nos estudos pré-clínicos e clínicos baseia-se em testes neurológicos e comportamentais, sendo o mecanismo de ação das células ainda desconhecido. Acredita-se que o percentual de células tronco capazes de diferenciar em neurônios seja muito pequeno ou até inexistente, sendo a melhora observada nos estudos pré-clínicos e clínicos atribuída aos fatores tróficos que essas células secretam, capazes de estimular mecanismos endógenos de reparo (Chopp e Li, 2002; Zhao et al., 2002; Kan et al., 2007; Guzman et al., 2008).

As MSC são capazes de secretar fatores como GDNF (fator neurotrófico derivado de linhagem glial), BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo), NGF (fator de crescimento de nervos), VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) e HGF (fator de crescimento de hepatócitos), além de outros (Chen et al., 2002; Pan et al., 2007). A gama de fatores secretados classifica as MSC como “fábricas tróficas”, uma esperança para o tratamento de várias patologias.

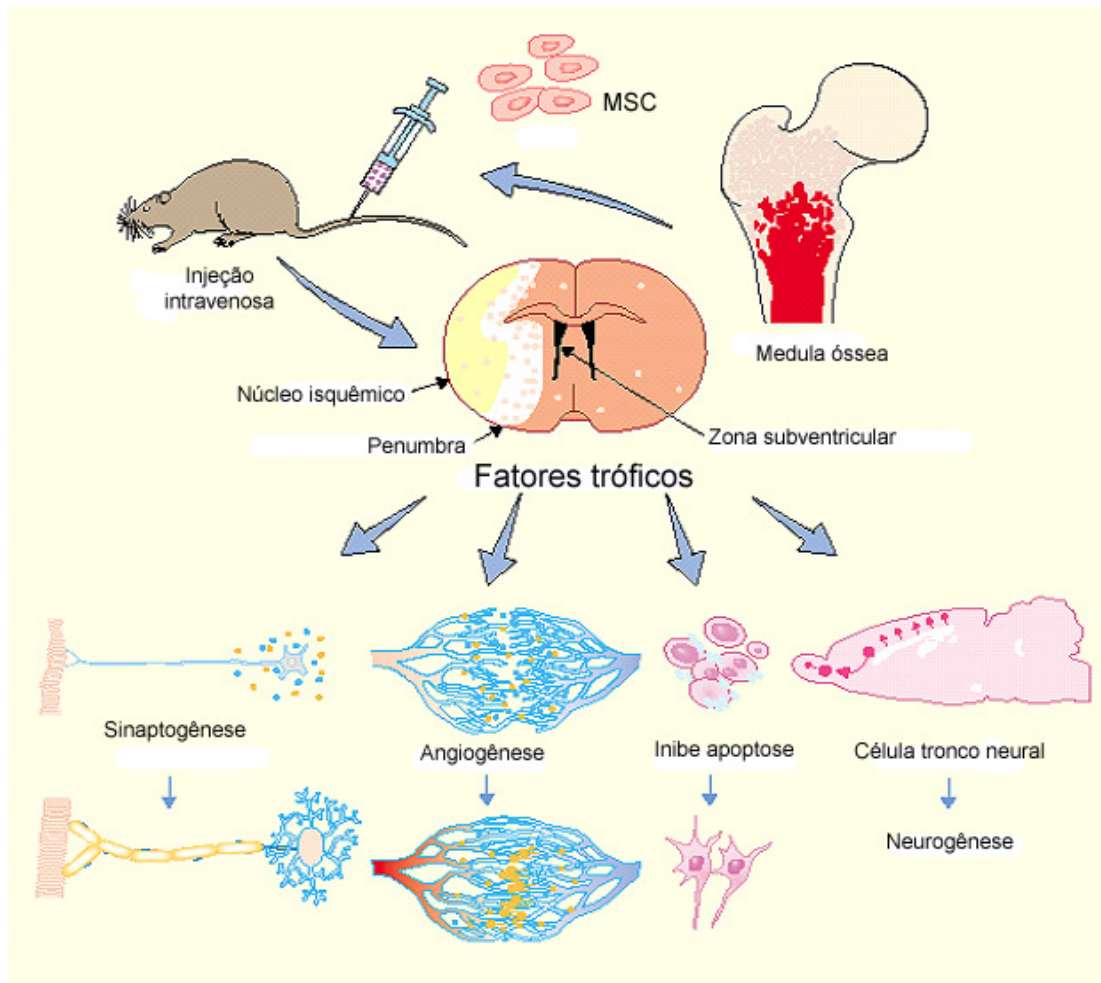


Figura 2: A terapia celular e seus possíveis benefícios após isquemia . Acredita-se que as MSC possam migrar até o local da lesão e secretar fatores tróficos responsáveis pelo aumento da sinaptogênese, aumento da angiogênese e aumento da neurogênese no tecido danificado. Adaptada de Chopp e Li, 2002.

Porém, alguns trabalhos descritos na literatura já demonstraram efeitos adversos do uso das MSC em modelos animais. Dentre eles temos os estudos realizados por Djouad e colaboradores, onde os autores mostram que a administração tanto subcutânea quanto intravenosa de MSC em camundongos favoreceu o desenvolvimento de tumor de melanoma, sendo esse efeito atribuído à capacidade imunossupressora sistêmica dessas células (Djouad et al., 2003). Além

disso, Karnoub e colaboradores mostraram (2007) que MSC humanas aumentam o potencial metastático de células de tumor de mama, provavelmente por seu efeito parácrino nessas células (Karnoub et al., 2007). Ainda, Fazel e colaboradores (2008) mostraram que, apesar de melhorarem a função cardíaca num modelo de infarto do miocárdio, MSCs geneticamente modificadas para aumentarem a expressão de SCF (fator de célula tronco) induziram a formação de fibrosarcomas e de metástases em 4 dos 20 animais injetados (Fazel et al., 2008).

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório mostraram que fatores secretados por MSCs foram tóxicos seletivamente às células das regiões CA1, CA2 e CA3 de culturas organotípicas de hipocampo de ratos, não havendo toxicidade no giro denteado ou em culturas de córtex. Além disso, esses fatores agravaram a morte celular após privação de oxigênio e glicose, um modelo de lesão *in vitro* para simulação de uma isquemia cerebral global. Demonstramos também que o mecanismo de morte celular disparado pelas MSC no hipocampo envolve excitotoxicidade, via receptores NMDA, AMPA e canais de cálcio dependentes de voltagem (Horn et al., 2009).

1.5. Neuroinflamação

Já foi demonstrado por vários autores que a inflamação contribui para a patogênese de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla. Além disso, ela participa na degeneração neuronal observada após uma isquemia ou um trauma cerebral (Lucas et al, 2006; Brown, 2007), somando-se aos efeitos deletérios já presentes nessas patologias.

A inflamação pode ser benéfica em algumas situações, onde as citocinas e quimiocinas secretadas possuem propriedades neuroprotetoras, mas também pode ser muito prejudicial em outras, onde essas mesmas moléculas induzem a morte das células. Os efeitos que as moléculas inflamatórias terão sobre o tecido nervoso dependerão da intensidade do estímulo, das suas características e dos diferentes níveis e estados de ativação dos receptores dessas moléculas em cada um dos tipos celulares afetados (Sriram e O'Callaghan, 2007).

É importante salientar que a resposta imunológica dentro do encéfalo é limitada e peculiar, um privilégio garantido pela permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica. Sabe-se que essa é uma verdade parcial, uma vez que em determinadas situações pode-se observar a infiltração de outras células, principalmente linfócitos (Engelhardt e Ransohoff, 2005). Na imensa maioria dos casos, porém, apenas a microglia e os astrócitos são ativados, sendo esses dois tipos celulares, em especial o primeiro, os responsáveis pela resposta imunológica no SNC (Minghetti e Levi, 1998; Liberto et al., 2004; Rock et al., 2004). A figura 3 exemplifica como a ativação da microglia e dos astrócitos pode atuar na morte neuronal em resposta a um estímulo que a dispare (adaptada de Block et al., 2007).

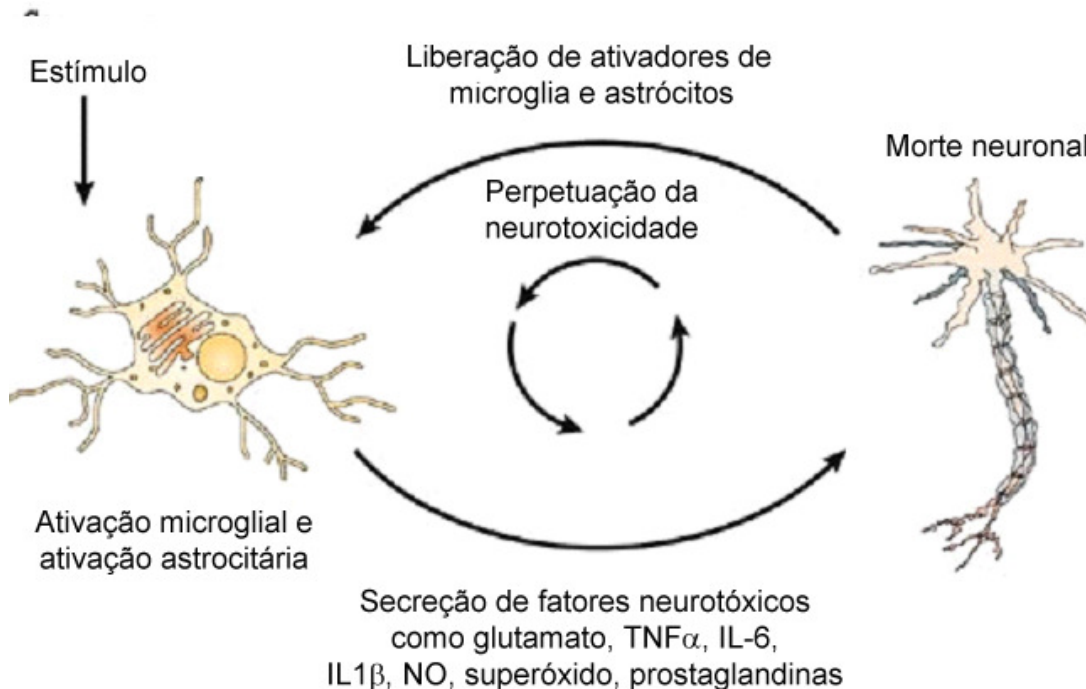


Figura 3: Participação da ativação glial na morte neuronal. Adaptada de Block et al., 2007.

As células microgliais são de origem mesodérmica e são consideradas os macrófagos que residem no SNC. Estão localizadas no parênquima tecidual, próximas aos vasos, em todas as regiões do SNC, correspondendo a 10-20% das células gliais. Devido a sua plasticidade e reatividade a um amplo espectro de estímulos, parecem possuir um papel importante na defesa do SNC, na neuroproteção e no reparo do tecido pós-lesões, uma vez que podem migrar para os locais de dano tecidual (Heppner et al, 1998; Minghetti e Levi, 1998; Rock et al, 2004).

O potencial protetor *versus* destrutivo dessas células é ditado pelo tipo de estímulo, sua intensidade e sua duração. Os fatores secretados podem ser tóxicos ou protetores dependendo da sua concentração e da disponibilidade de receptores para ligarem.

Essas células podem ser facilmente reconhecidas no tecido por sua reatividade com a lectina isolada de *Griffonia simplicifolia* Isolectina IB₄, também conhecida como GSA, que marca resíduos de galactose presentes apenas na membrana dessas células e que é amplamente utilizada na literatura para identificação da microglia (Streit e Kreutzberg, 1987; Heppner et al., 1998; Hailer et al., 2005; Buffo et al., 2008).

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC. De origem neural, estão associados à manutenção da homeostase no SNC adulto. Entre as suas principais funções estão a participação na estrutura da barreira hemato-encefálica, a produção de fatores tróficos, o metabolismo de neurotransmissores e a garantia de suporte energético para os neurônios (He e Sun, 2007; Seth e Koul, 2008). Expressam numerosos receptores, o que os capacita a responder a praticamente todos os compostos neuroativos, como neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento, citocinas e toxinas (Liberto et al., 2004).

Em situações de isquemia cerebral, traumas ou patologias diversas os astrócitos são ativados e ocorre um fenômeno chamado de astrogliose reativa. Esse processo é caracterizado por hipertrofia, proliferação celular, extensão dos processos celulares, aumento na produção das proteínas GFAP, vimentina e nestina (Liberto et al., 2004; Sofroniew, 2005; Buffo et al., 2008) e secreção de citocinas como interleucina 6 (IL-6) (Gao et al., 2008).

A gliose reativa resulta na formação da cicatriz glial, que se acredita ser responsável pela inibição do crescimento dos neuritos, dificultando a regeneração no SNC após lesões. Além disso, essa cicatriz inibe a comunicação entre os processos neuronais já existentes (Silver e Miller, 2004).

As MSCs mostraram-se capazes de reduzir a resposta inflamatória (Uccelli et al., 2006; Chamberlain et al., 2007), atuando principalmente na modulação da função dos linfócitos T (Bartholomew et al. 2002), inibindo a proliferação de linfócitos B (Corcione et al., 2006) e dificultando a maturação e funcionamento das células dendríticas (Jiang et al., 2005). Além disso, sabe-se que são pouco imunogênicas, uma vez que expressam baixos níveis de MHC classe I e não possuem MHC classe II, não expressando também as moléculas de superfície CD40, CD80 e CD86, o que permite seu transplante em tecidos alogênicos com um risco menor de rejeição (Uccelli et al., 2006).

Entretanto resultados prévios do nosso grupo mostraram claramente que os fatores secretados pelas MSC induzem neuroinflamação em culturas organotípicas de hipocampo. Esses fatores ativam a microglia e os astrócitos, induzem um aumento na liberação de IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e induzem a geração de espécies reativas (Horn et al., dados não publicados).

1.6. Neurogênese

Durante muitos anos, a vulnerabilidade do SNC a qualquer tipo de lesão foi atribuída à falta de fontes que pudessem repor as células mortas. Muitos pesquisadores mostraram ao longo dos anos que células tronco neurais, bem como células progenitoras neurais, persistem no organismo de mamíferos adultos, surgindo assim uma nova esperança no tratamento de doenças que afetam o SNC (Ohiri et al., 2006). Atualmente já se sabe que a neurogênese continua ocorrendo em algumas regiões do cérebro adulto de várias espécies, inclusive dos seres humanos (Goldman, 2004).

A existência de neurogênese no cérebro adulto gerou muitas perspectivas na clínica. Infelizmente, as evidências médicas sugerem que o baixo nível de neurogênese que ocorre em adultos não é funcionalmente relevante para a recuperação do tecido lesionado (Götz, 2003). Sabe-se que a neurogênese é uma resposta natural do cérebro que sofre uma lesão, numa tentativa de regeneração.

A melhora funcional observada em animais em estudos pré clínicos utilizando o modelo de isquemia cerebral sugere que a administração de MSC estimule a neurogênese endógena, e por isso os animais tenham maior recuperação após a lesão (Chopp e Li, 2002). O aumento da neurogênese seria então um dos mecanismos positivos pelos quais as MSC exerceriam seu efeito benéfico ao sistema nervoso.

2. OBJETIVOS

O conjunto de resultados mostrando que fatores secretados por MSC causam excitotoxicidade e neuroinflamação em culturas organotípicas de hipocampo já obtidos por nosso grupo justifica o presente trabalho, onde o objetivo foi investigar, agora utilizando o modelo de administração *in vivo*, se as MSC são capazes de causar alterações significativas quando transplantadas no hipocampo de ratos.

2.1. Objetivos gerais

Investigar se a administração intra-hipocampal de células tronco mesenquimais isoladas de medula óssea de ratos altera parâmetros de neurodegeneração, neuroinflamação e neurogênese nessa estrutura.

2.2. Objetivos específicos

Verificar, com a utilização de marcadores específicos para cada tipo celular, se a injeção de células tronco mesenquimais no hipocampo:

- Induz perda neuronal, avaliando-se o conteúdo de β -tubulina 3 e de Neu N;
- Induz ativação microglial, avaliando-se a ligação da lectina IB4;
- Induz ativação astrocitária, avaliando-se o conteúdo da GFAP;
- Induz neurogênese, avaliando-se o conteúdo de doublecortin.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento e manutenção das MSC:

As células foram obtidas de medula óssea de ratos *Wistar* machos de 30 dias e a técnica realizada conforme descrita em trabalhos prévios do grupo (Da Silva Meireles e Nardi, 2003; Horn et al., 2009). Após os animais serem anestesiados, os mesmos foram mortos por deslocamento cervical e tiveram seus fêmures retirados em condições estéreis. As células foram retiradas do interior do osso com o auxílio de uma seringa contendo meio de cultivo e colocadas em um tubo falcon. Após a centrifugação das células, foi feita a contagem de células viáveis utilizando o azul de tripan. Essas células foram ressuspensas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) numa concentração final de 5×10^6 células viáveis por mL.

Para uma cultura inicial, as células foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas em incubadora a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, condições essas que permitiram que as células não aderentes fossem removidas pelas trocas de meio realizadas a cada 3-4 dias. Quando confluentes, as células foram dissociadas utilizando-se tripsina/EDTA e redistribuídas em novos frascos de cultura ou congeladas. Cada dissociação que as MSC sofreram foi considerada como uma passagem. No dia da injeção nos animais as células foram contadas utilizando-se câmara de Neubauer e 100.000 células foram ressuspensas em 3 µL de meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO).

As MSC transplantadas nos animais foram utilizadas entre a 8ª e a 15ª passagens, tempo de cultivo esse necessário para garantia da ausência de macrófagos na cultura. O tempo de cultura necessário para que se atingisse essas

passagens foi em torno de 3 a 4 meses. Cada vez que um frasco de células foi descongelado antes da injeção nos animais, essas células permaneceram em cultura por pelo menos 7 dias para estabilização.

3.2. Injeção estereotáxica das MSCs em ratas:

Foram utilizadas ratas *Wistar* adultas (em torno de 30 dias e pesando em torno de 90-100 gramas) que, sob anestesia (cetamina e xilasina), receberam a injeção estereotáxica de 3 μ L de meio HBSS (para os controles) ou das MSC isoladas de medula óssea em coordenadas específicas para o hipocampo (médio lateral: 2.0; dorso-ventral: 2.7 e antero-posterior: 3.5). A quantidade de células transplantadas foi de 100.000 MSC em 3 μ L de HBSS que foram injetadas no hipocampo direito. No terceiro ou no sétimo dia de recuperação (Coyne et al. 2006), as ratas foram sacrificadas e os hipocampos ipsilateral e contralateral à injeção foram retirados e congelados para posterior análise por *western blotting*.

3.3. Técnica de Western Blotting

Os hipocampos foram lisados em tampão Tris contendo SDS 4% e as proteínas dosadas pelo método de Lowry. As amostras foram separadas em corrida eletroforética em géis de poliacrilamida de 8% e 10%. Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e incubadas com os seguintes anticorpos:

Anticorpo	Marcador
Anti-Doublecortin 1:1000 (Cell Signalling)	Marcador de progenitor neuronal
Anti- β Tubulina 3 1:1000 (Cell Signalling)	Marcador de neurônio maduro
Anti-GFAP 1:2000 (Sigma)	Marcador de astrócito
Anti-Neu N 1:1000 (Sigma)	Marcador de núcleo neuronal
**Lectina IB4 0,125 μ g/mL (Sigma)	Marcadora de microglia

Tabela 1: Anticorpos utilizados na técnica de Western Blotting. **Não é um anticorpo, é uma lectina já conjugada à peroxidase que reconhece resíduos de galactose específicos presentes na membrana plasmática das células microgliais.

Posteriormente as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit (para os anticorpos primários de anti-doublecortin, anti-GFAP e anti- β -tubulina 3) e anti-mouse (anti-Neu N) conjugado com peroxidase. A quimioluminescência do kit de ECL (GE Healthcare) foi detectada com filme radiográfico e analisada com o programa Optiquant (Packard Instruments). Os dados foram expressos como porcentagem em relação aos controles ipsilateral e contralateral respectivamente.

3.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados pelo teste de ANOVA seguida de Tukey utilizando-se o programa Prisma Graphpad. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de Degeneração Neuronal

Os resultados da quantificação da marcação com o anticorpo anti- β -tubulina 3, proteína presente especificamente no citoesqueleto de neurônios maduros, mostraram que houve uma diminuição significativa no conteúdo dessa proteína no hipocampo ipsilateral quando as MSC foram injetadas e sacrificadas três dias após a cirurgia ($n=7$, $p<0,001$). Observamos também que no hipocampo contralateral não houve diferença após injeção das MSC quando comparado com o controle.

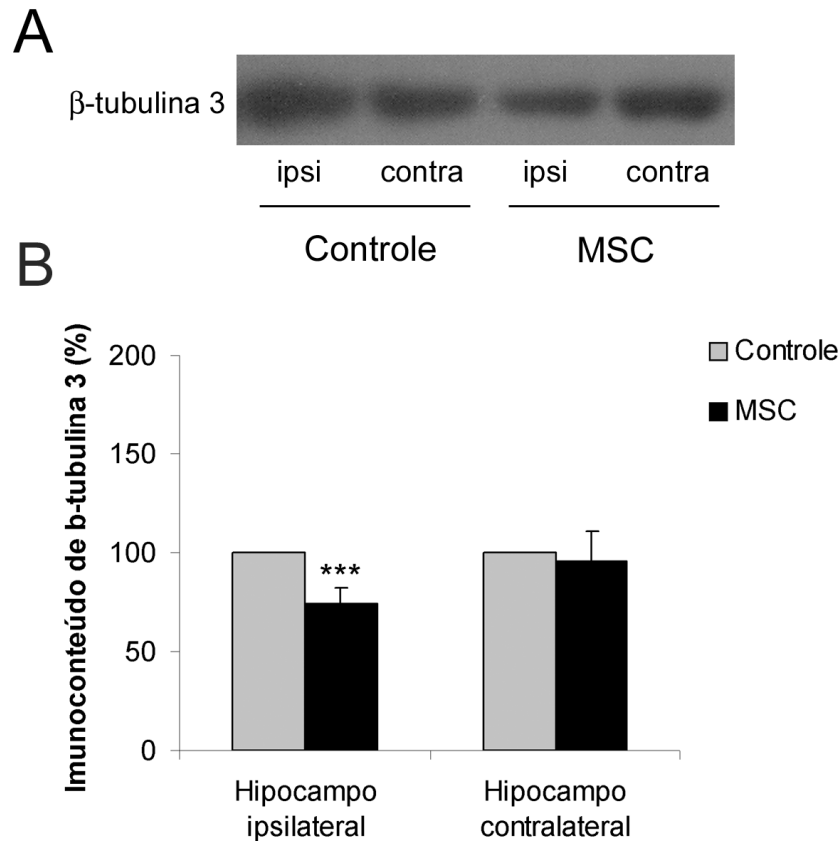


Figura 4: Imunoconteúdo de β -tubulina 3 3 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunoconteúdo de β -tubulina 3 nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunoconteúdo de β -tubulina 3

apresentado como percentual em relação aos controles (n=7, média±DP, ANOVA seguida de Tukey, p<0,001).

Sete dias após a injeção das MSC observamos que o conteúdo de β -tubulina 3 não apresenta diferença significativa no hipocampo ipsilateral e no hipocampo contralateral quando comparada aos controles. Esse resultado sugere que em 7 dias o conteúdo dessa proteína já voltou aos níveis encontrados nos animais que não receberam a injeção das células.

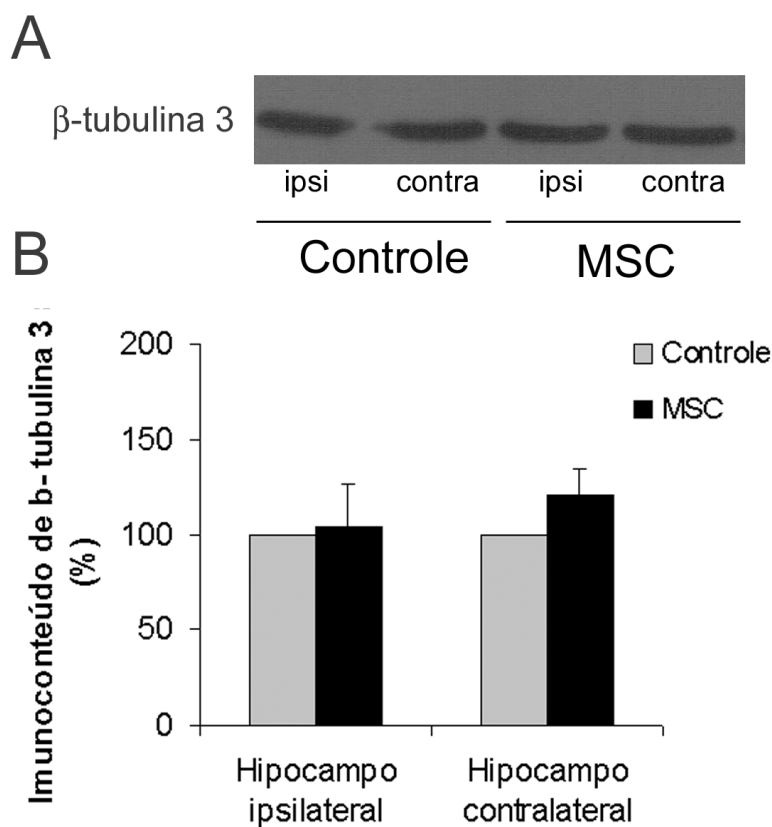


Figura 5: Imunoconteúdo de β -tubulina 3 7 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunoconteúdo de β -tubulina 3 nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunoconteúdo de β -tubulina 3 apresentado como percentual em relação aos controles (n=5, ANOVA, p>0,05).

A proteína Neu N, assim como a proteína β -tubulina 3, é marcadora de neurônios maduros. Porém, em contraste com a β -tubulina, que está presente nos processos neuronais, Neu N é encontrada apenas no soma dos neurônios. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que três dias após a injeção das MSC no hipocampo não há diferença significativa no conteúdo dessa proteína nos hemisférios ipsi e contralateral das ratas, sugerindo que possivelmente o número de neurônios continue o mesmo.

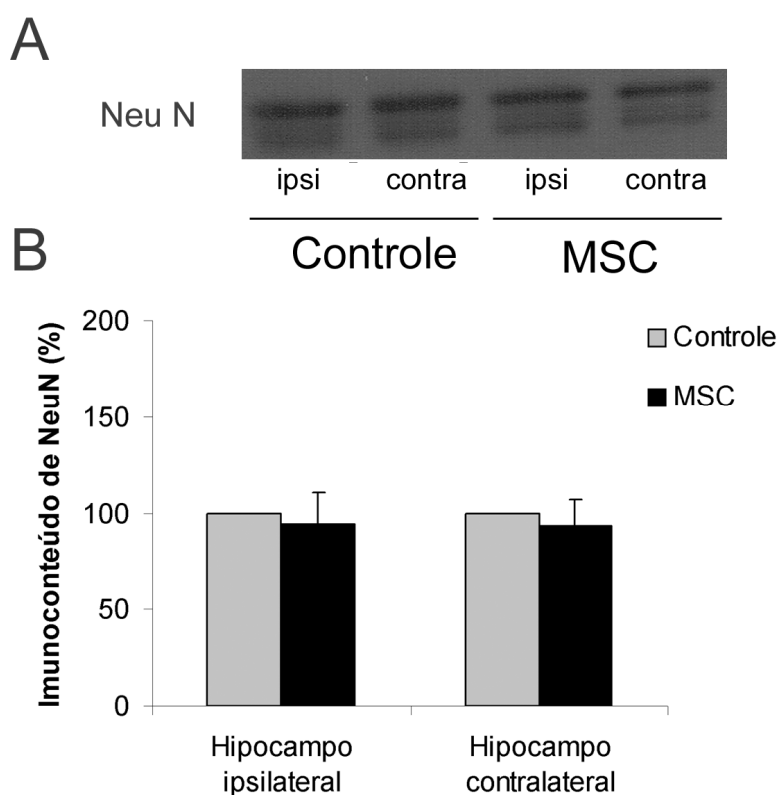


Figura 6: Imunoconteúdo de Neu N 3 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunoconteúdo de Neu N nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunoconteúdo de Neu N apresentado como percentual em relação aos controles (n=5, ANOVA, p>0,05).

4.2- Análise da ativação microglial

Embora não tenhamos observado diferença significativa entre os grupos, observamos uma tendência ao aumento na marcação com lectina IB4 no hipocampo ipsilateral quando as MSC foram injetadas. Por problemas técnicos o número amostral não pôde ser aumentado. Essa lectina marca resíduos de galactose presentes apenas na membrana das células do sistema imunológico, sendo portanto, no tecido nervoso, um bom marcador de células microgлияis. Observamos que no hipocampo contralateral não há diferença entre o animal que recebeu e o animal que não recebeu a injeção das células (n=4).

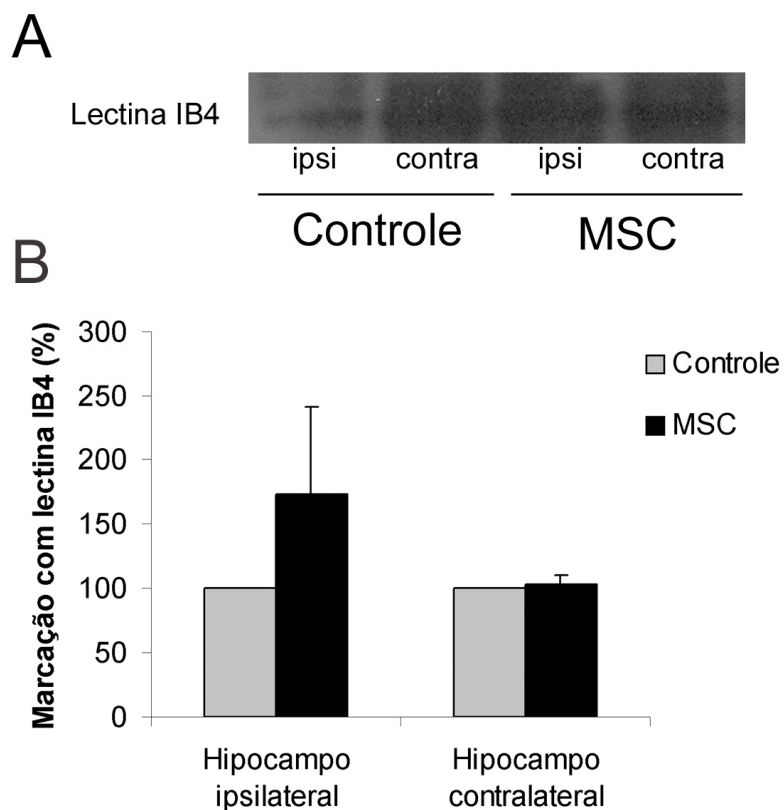


Figura 7: Marcação com Lectina IB4 3 dias após a administração de MSC no hipocampo de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa da marcação de lectina IB4 nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação da marcação de lectina IB4 apresentada como

percentual em relação aos controles (n=4, ANOVA, $p>0,05$).

4.3- Análise da ativação astrocitária

Os resultados da quantificação da densitometria da marcação com o anticorpo anti-GFAP, um filamento intermediário presente especificamente no citoesqueleto de astrócitos, mostraram que houve um aumento em relação ao controle quando as MSC estavam presentes, tanto no hipocampo ipsilateral quanto no hipocampo contralateral (n=6).

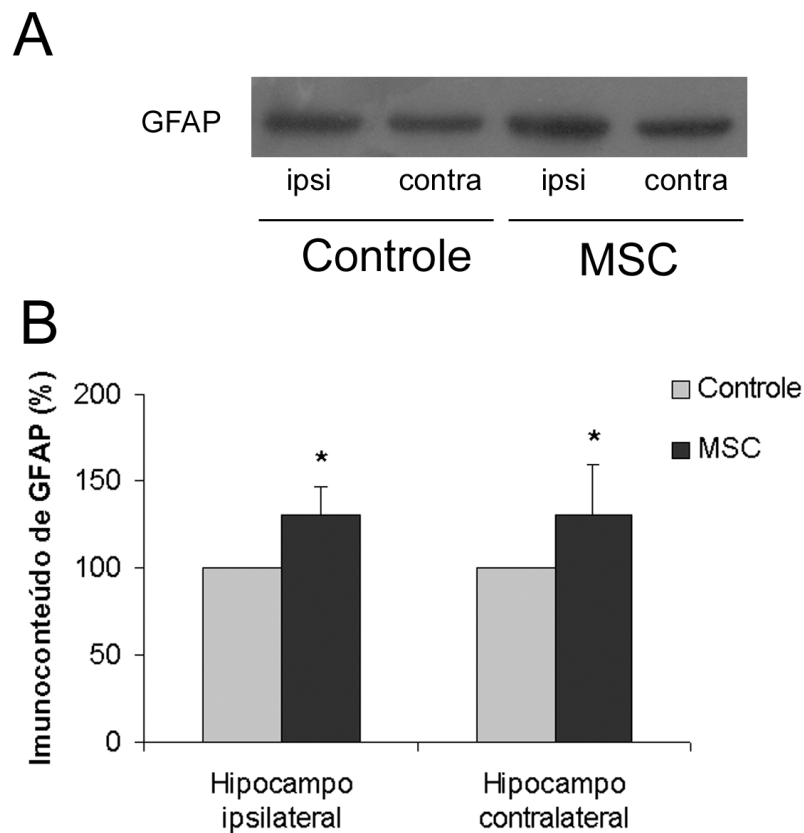


Figura 8: Imunociteúdo de GFAP 3 dias após a administração de MSC em hipocampus de ratos *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunociteúdo de GFAP nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunociteúdo de GFAP apresentado como percentual em relação aos controles (n=6, média±DP, ANOVA seguida de Tukey, $p<0,05$).

Entretanto, sete dias após a injeção das células não observamos mais diferença significativa em relação aos controles em nenhum dos hemisférios, sugerindo que os níveis de GFAP já tenham voltado ao normal.

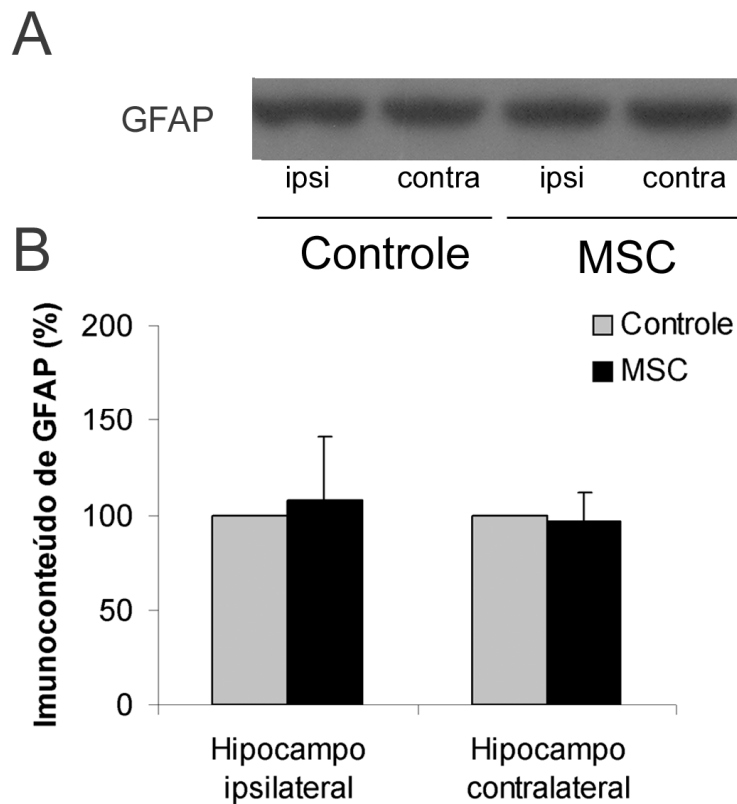


Figura 9: Imunoconteúdo de GFAP 7 dias após a administração das MSC em hipocampus de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunoconteúdo de GFAP nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunoconteúdo de GFAP apresentado como percentual em relação aos controles (n=6, ANOVA, $p>0,05$).

4.4. Análise da neurogênese

A quantificação densitométrica do imunocontéudo da proteína Doublecortin, marcadora de neurônio imaturo, ainda em processo de diferenciação, mostra que não houve alteração nessa proteína após administração das MSC tanto no hipocampo ipsilateral quanto no hipocampo contralateral em três e sete dias após a injeção das MSC.

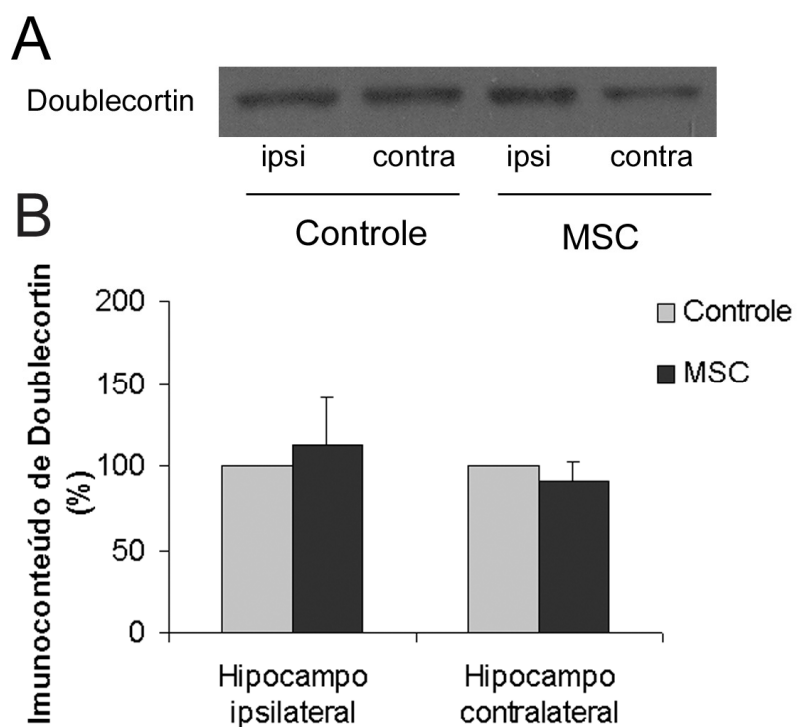


Figura 10: Imunocontéudo de doublecortin 3 dias após a administração de MSC em hipocampus de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunocontéudo de doublecortin nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunocontéudo de doublecortin apresentada como percentual em relação aos controles (n=6, média±DP, ANOVA, $p>0,05$).

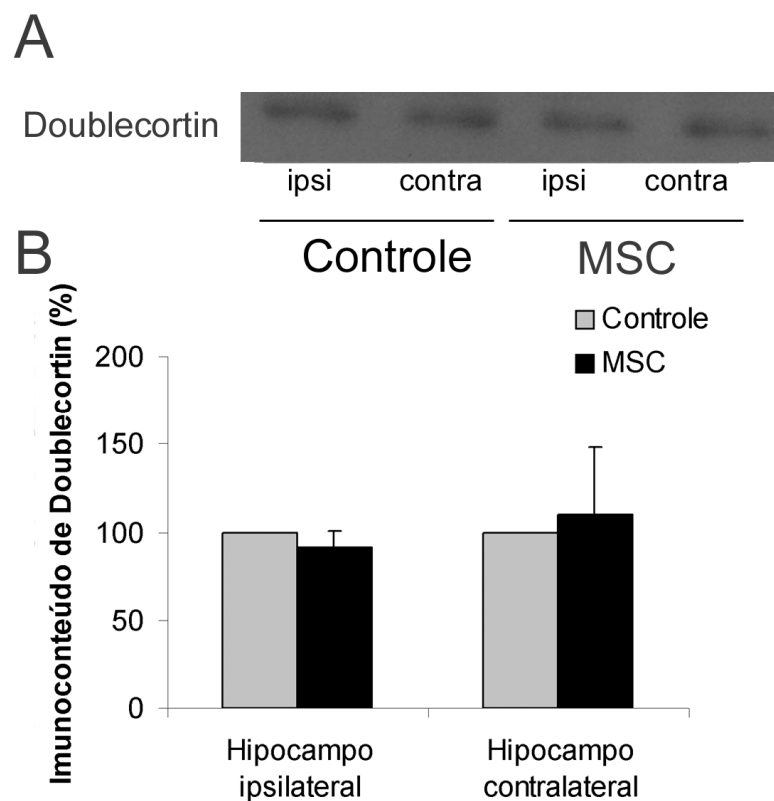


Figura 11: Imunoconteúdo de doublecortin 7 dias após a administração de MSC em hipocampos de ratas *Wistar*. (A) Imagem representativa do imunoconteúdo de doublecortin nos grupos controle e MSC. (B) Quantificação do imunoconteúdo de doublecortin apresentado como percentual em relação aos controles (n=3, ANOVA, $p>0,05$).

5. DISCUSSÃO

As MSC secretam vários fatores de crescimento já descritos na literatura como neuroprotetores e tidos como benéficos, dentre eles BDNF, NGF, VEGF, HGF e GDNF (Chopp e Li, 2002). Entretanto, pouco se sabe até o momento sobre fatores secretados que possam ser prejudiciais às células do SNC. Resultados preliminares do nosso grupo mostraram que o meio condicionado pelas MSC de medula óssea induz morte neuronal excitotóxica no modelo de cultura organotípica de hipocampo, sendo essa morte bloqueada por antagonistas NMDA, antagonistas AMPA e agonistas GABA (Horn et al., 2009). Além disso, vimos que esse mesmo meio induz neuroinflamação, e que essa pode ser reduzida utilizando-se antioxidantes como ácido ascórbico e trolox e antiinflamatórios como a indometacina e a dexametasona (Horn et al., manuscrito submetido). Considerando as MSC como “fábricas” de fatores tróficos, capazes de alterar seu padrão de secreção desses fatores de acordo com o nicho em que se encontram, temos a plena convicção de que conhecer os fatores secretados e conhecer como a presença do tecido nervoso pode alterar o seu padrão de secreção torna-se fundamental para uma possível utilização dessas células em terapias.

A proteína β -tubulina 3 faz parte do citoesqueleto das células neuronais maduras e vem sendo amplamente utilizada na literatura como marcadora de neurônios (Gong et al. 2008; Leonard et al. 2009). Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que houve uma diminuição significativa do imunoconteúdo dessa proteína no hipocampo ipsilateral quando as MSC foram injetadas nessa estrutura, sugerindo alterações importantes na quantidade dessa proteína neuronal. Em um período de recuperação de sete dias, a marcação da proteína β -tubulina 3 não apresenta diferenças significativas em relação aos controles, sugerindo que sua

quantidade aumenta novamente nos hipocampos dos animais que receberam as MSCs, retornando aos níveis encontrados nos animais que não receberam as células.

A proteína Neu N é encontrada no núcleo das células neuronais e é também amplamente utilizada na literatura como uma proteína marcadora de neurônios (Mullen et al. 1992; Ünal- Çevik et al. 2004). Três dias após a injeção das MSC no hipocampo não foi observada nenhuma alteração na quantidade dessa proteína nos hipocampos ipsi e contralateral, sugerindo que o número de neurônios permaneceu constante. Uma avaliação mais tardia da quantidade de Neu N no hipocampo ipsilateral (7 dias e 15 dias) será necessária para a confirmação que a morte neuronal não acontece tardiamente.

Muitas doenças neurodegenerativas, assim como danos no SNC, causam atrofia de axônios e dendritos. Segundo Luo e O'Leary, esse fenômeno pode ser dividido em dois eventos: (a) um em menor escala onde há eliminação de conexões sinápticas e um corte local na árvore axonal ou dendrítica, geralmente causada por retração; (b) e outro onde há a eliminação de um pedaço significativo do axônio primário, que aparenta ocorrer pela degeneração da célula. Essas atrofias parecem contribuir significativamente para os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes e podem ser a primeira causa de morte neuronal (Luo et al. 2005).

A retração da árvore dendrítica e /ou axonal pode estar associada com uma perda funcional do hipocampo, área cerebral responsável pelo processamento da memória. Estudos mostram que danos a essa estrutura prejudicam a memória espacial e de aprendizado em ratos (Conrad 2006; McLaughlin et al. 2009). Porém, a retração dendrítica dos neurônios do hipocampo pode ser revertida. Estudos realizados com ratos comprovam que 10 dias depois do término do estímulo, a

retração neuronal retorna aos níveis dos controles. Por esse motivo muitos têm se referido a retração dendrítica como um “remodelamento” (Conrad 2006). Esse processo de retração dendrítica explica o resultado obtido neste trabalho, onde observamos que os níveis de β -tubulina 3 estão diminuídos 3 dias após a injeção das MSC no hipocampo, mas voltam a níveis do controle sete dias após a cirurgia. Esses dados em conjunto com os dados que sugerem que não existe redução do número neuronal (Neu N permaneceu constante) nos permitem sugerir que as MSC quando injetadas no hipocampo causam uma reestruturação nos processos neuronais. Certamente esses dados são insuficientes para afirmarmos se esse é ou não um efeito adverso dessas células no SNC.

Muitos estudos presentes na literatura sugerem que as MSC possuem propriedades imunossupressoras, atuando principalmente em linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (Bartholomew et al. 2002; Djouad et al., 2003; Corcione et al., 2006). Nossos resultados, porém, sugerem que a injeção estereotáxica das MSC em hipocampos de ratas possa induzir neuroinflamação, o que é evidenciado pela tendência ao aumento da marcação com Lectina IB4 nos hipocampos que receberam as células. Essa marcação sugere que a microglia está sendo ativada pela presença das MSC. A reatividade das células microgliais a essa lectina é amplamente utilizada na literatura para identificação da microglia (Streit e Kreutzberg, 1987; Heppner et al., 1998; Hailer et al., 2005; Buffo et al., 2008).

Juntamente com a microglia, os astrócitos são as células responsáveis pela inflamação no SNC. Em condições patológicas ou de lesões há o fenômeno que chamamos de astrogliose reativa, onde se observa um aumento na quantidade da proteína de citoesqueleto GFAP (Liberto et al., 2004; Sofroniew, 2005; Buffo et al., 2008). Nossos resultados mostram que há um aumento de GFAP tanto no

hipocampo ipsilateral quanto no contralateral dos animais que receberam as MSC, sugerindo uma reação global, e não só local, dos astrócitos aos fatores secretados e/ou a presença dessas células. Os astrócitos secretam muitos fatores de crescimento e citocinas que, dependendo da concentração, podem melhorar ou piorar lesões (Liberto et al., 2004), ficando difícil inferir algo sobre a reação astrocítica causada pelas MSC ser benéfica ou não ao animal que sofreria uma lesão ou possuiria uma doença neurodegenerativa. Como certas condições como isquemia cerebral e trauma já induzem gliose reativa (Lucas et al, 2006; Brown, 2007), essa reação somada à reação causada apenas pela presença das MSC poderia ser tanta que induziria a piora do quadro.

A formação da cicatriz glial em decorrência da gliose reativa é evidenciada em vários modelos de lesões. Essa cicatriz poderia também participar induzindo a retração dos processos neuronais e impedindo a comunicação entre os neurônios (Silver e Miller, 2004).

Porém, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que sete dias após a injeção das MSC a proteína GFAP parece retornar aos níveis encontrados nos animais controle, sugerindo que a reação astrocitária seria mais evidenciada nos primeiros dias após a cirurgia, normalizando-se em um tempo maior de recuperação.

Muitos estudos pré-clínicos com administração de células tronco no SNC sugerem benefícios das MSC baseando-se apenas em melhoras comportamentais (Chen et al., 2001; Chopp e Li, 2002; Kan et al., 2007). Um dos mecanismos sugeridos para essa melhora seria de que os fatores tróficos liberados pelas MSC induziriam a neurogênese e isso melhoraria a lesão (Chopp e Li, 2002). Em nossos resultados não observamos diferenças no imunoconteúdo de “doublecortin”, o que sugere que não há aumento de neurogênese nos hipocampos das ratas que

receberam a injeção das MSC. Outros marcadores de progenitores neuronais ainda serão utilizados para confirmação desse resultado. Além disso, não sabemos se, na presença de uma lesão, a diferenciação das células tronco neurais não será induzida e potencializada pelos fatores secretados pelas MSC.

Os resultados obtidos até o momento nesse trabalho sugerem cautela na administração dessas células. Ainda não sabemos ao certo quais os mecanismos moleculares de ação das MSC nas células do sistema nervoso e se realmente podem ser administradas sem efeitos adversos, principalmente sem causar a morte de populações específicas de neurônios mais susceptíveis aos fatores que elas secretam. Acreditamos sim que as MSC possam ser utilizadas como terapia celular, porém muito estudo ainda é necessário até que os fatores benéficos e prejudiciais secretados por essas células sejam identificados.

A necessidade de uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças incuráveis justifica a euforia vivida e a esperança da utilização das células tronco, mas acreditamos que muita cautela e pesquisa serão necessárias para a obtenção de uma terapia segura e eficaz.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho nos permitem concluir que:

1. Há uma diminuição do imunoconteúdo da proteína β -tubulina 3 no hipocampo ipsilateral de ratas que receberam as MSC em um tempo de recuperação de três dias, porém em sete dias de recuperação os níveis dessa proteína voltam ao níveis dos animais controle;
2. Não há alterações significativas no imunoconteúdo da proteína Neu N entre as ratas controle e as ratas que receberam as MSC após três dias de recuperação;
3. Há uma tendência ao aumento da marcação da Lectina IB₄ no hipocampo ipsilateral das ratas que receberam a injeção com MSC três dias após a cirurgia;
4. Quando as MSC estavam presentes nos hipocampos das ratas houve um aumento da marcação da proteína GFAP tanto no hipocampo ipsilateral quanto no contralateral em três dias de recuperação. Porém em sete dias após a cirurgia não há diferenças em relação aos controles nos hipocampos que receberam as MSC;
5. Tanto em três quanto em sete dias de recuperação não há diferenças significativas no imunoconteúdo de doublecortin entre os grupos controles e injetados com as MSC.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Aumentar o tamanho amostral para confirmação dos resultados de Lectina IB4 em três e sete dias de recuperação;

- ✓ Utilizar o corante violeta de cresila em cortes histológicos do hipocampo para avaliação de alterações neuronais principalmente comparando neurônios piramidais da regiões CA1 e CA3 com neurônios granulares do giro denteado nos tempos de recuperação de 3 e 7 dias;

- ✓ Avaliar se os animais que receberam as MSC apresentam algum déficit neurológico, utilizando para isso testes comportamentais que avaliem a função hipocampal como o labirinto aquático de Morris (*Water maze*) entre outros;

- ✓ Avaliar, na presença de uma lesão no hipocampo, se o comportamento das MSC e seu efeito sobre o tecido nervoso seriam equivalentes com os resultados desse estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, Kohmura EK (2004). Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. *Brain Res.* 1029:114-119.
- Baksh D, Song L, Tuan RS (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8:301-316.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffmann R (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol.* 30:42-48.
- Blum B, Benvenisty N (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res.* 100:133-158.
- Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadmann M, Cheng C, Carroll J, Hess DC (2004). Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res.* 1010:108-116.
- Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Lamberthenghi Deliliers G, Silani V, Soligo D, Polli E (2005). Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol.* 193:312-325.

- Brown GC (2007). Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans.* 35:1119-1121.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3581-3586.
- Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD (2002). Failure of bone marrow stromal cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 297:1299.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells* 25:2739-2749.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005-1011.
- Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M (2002). Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathol.* 22:275-279.
- Chopp M, Li Y (2002). Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 1:92-100.
- Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, et al. (2006). Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 24:2483-2492.

- Conrad CD (2006). What Is the Functional Significance of Chronic Stress-Induced CA3 Dendritic Retraction Within the Hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev.* 5(1):41-60
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzati F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367-372.
- Da Silva Meirelles L, Nardi NB (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haemathol.* 123:702-711.
- Da Silva Meirelles L, Chagastelles P, Nardi NB (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119:2204-2213.
- Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008). In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:2287-2299.
- Dharmasaroja P (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* 16:12-20.
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals. *Blood* 102:3837-3844.
- Engelhardt B, Ransohoff RM (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26:485-495.

- Fazel SS, Angoulvant D, Butany J, Weisel RD, Li RK (2008). Mesenchymal stem cells engineered to overexpress stem cell factor improve cardiac function but have malignant potential. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 136:1388-1389.
- Floden AM, Shanshan L, Combs CK (2005). β -amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor α and NMDA receptors. *J Neurosci.* 25:2566-2575.
- Gao Q, Li Y, Shen L, Zhang J, Zheng X, Qu R, Liu Z, Chopp M (2008). Bone marrow stromal cells reduce ischemia-induced astrocytic activation *in vitro*. *Neuroscience* 152:646-655.
- Goldman SA (2004). Direct mobilization of endogenous neural stem cells: the intersection of stem cell biology and gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6:466-472.
- Gong J, Sagiv O, Cai H, Tsang SH, Del Priore LV (2008). Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res.* 2008 Jun;86(6):957-65. Epub 2008 Mar 28.
- Götz M (2003). Glial cells generate neurons - master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist.* 9:379-397.
- Guzman R, Raymond C, Gera A, Angeles A, Andres RH, Steinberg GK (2008). Intravascular cell replacement therapy for stroke. *Neurosurg Focus* 24:1-10.
- Hailer NP, Vogt C, Korf H-W, Dehghani F (2005). Interleukin-1 β exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial

- activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 21:2347-2360.
- He F, Sun YE (2007). Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 39:661-665.
- Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998). Activated microglia migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 110:3284-3290.
- Horn AP, Frozza RL, Grudzinski PB, Gerhardt D, Hoppe JB, Bruno AN, Chagastelles P, Nardi NB, Lenz G, Salbego CG (2009). Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Res.* 63:35-41.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120-4126.
- Jori FP, Napolitano MA, Melone MAB, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Peluso G, Giordano A, Galderisi U (2005). Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem.* 94:645-655.
- Kan I, Melamd E, Offen D (2007). Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 180:219-242.

- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007). Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557-563.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301.
- Krabbe, C, Zimmer, J, Meyer M (2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. *APMIS* 113:831-844.
- Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, Mingxue Z (2007). Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Cell Biol Int.* 31:916-923.
- Leonard BW, Mastroeni D, Grover A, Liu Q, Yang K, Gao M, Wu J, Pootrakul D, van den Berge SA, Hol EM, Rogers J (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol.* 2009 Jul 20;515(3):269-94.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 89:1092-1100.
- Lu P, Blesch A, Tuszynsky MH (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res.* 77:174-191.
- Lu P, Tuszynski MH (2005). Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons? *Exp Neurol.* 193:273-278.

- Luo L, O'Leary DDM (2005). Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28:127-156
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *J Pharmacol.* 147:S232-S240.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes *in vitro*. *Stem Cells* 24:1246-1253.
- McLaughlin KJ, Wilson JO, Harman J, Wright RL, Wieczorek L, Gomez J, Korol DL, Conrad CD (2009). Chronic 17 β -Estradiol or Cholesterol Prevents Stress-Induced Hippocampal CA3 Dendritic Retraction in Ovariectomized Female Rats: Possible Correspondence Between CA1 Spine Properties and Spatial Acquisition. *Hippocampus*.
- Mendez-Otero R, de Freitas GR, André C, de Mendonça MLF, Friedrich M, Oliveira-Filho J (2007). Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Reg Med.* 2:417-423.
- Mimeault M e Batra SK (2006). Cocise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and câncer therapies. *Stem Cells* 24:2319-2345.
- Minghetti L, Levi G (1998). Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol.* 54:99-125.

- Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE (2006). Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin Neurosci Res.* 6:261-281.
- Müllen, RJ, Buck C, Smith A (1992). Neu N, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.
- Nishikava S, Goldstein RA, Nierras CR (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:725-729.
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay 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 phenotypes. *J Neurosci Res.* 77:192-204.
- Ohiri Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamaamoto N, Nakamura K, Nakafuku M (2006) Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured spinal cord. *J Neurosci.* 26:11948-11960.
- Pan H-C, Cheng F-C, Chen C-J, Lai S-Z, Lee CW, Yang D-Y, Chang M-H, Ho P-S (2007). Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci.* 14:1089-1098.
- Price D (1999). New order from neurological disorders. *Nature* 399:A3-A5.

- Rivera FJ, Sierralta WD, Minguel JJ, Aigner L (2006). Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett.* 406:49-54.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 17:942-964.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol.* 164:247-256.
- Seth P, Koul N (2008). Astrocytes, the star avatar: redefined. *J Biosci* 33:405-421.
- Silver J, Miller JH (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5:146-156.
- Sofroniew MV (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11:400-407.
- Sriram K, O'Callaghan JP (2007). Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2:140-153.
- Streit WJ, Kreutzberg GW (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol.* 16:249-260.
- Suzuki H, Tagushi T, Tanaka H, Kataoka H, Li Z, Muramatsu K, Gondo T, Kawai S (2004). Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent

for differentiation into neurons, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 322:918-922.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 36:2566-2573.

Ünal- Çevik I, Kilingç M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 1015:169-174.

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

Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007a). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 184:53-68.

Wang Y, Chen S, Yang D, Le W-D (2007b). Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2:243-250.

Wu Q-Y, Li J, Feng Z-T, Wang T-H (2007). Bone marrow stromal cells of transgenic mice can improve the cognitive ability of an Alzheimer disease rat model. *Neurosci. Letters* 417: 281-285

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