

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE INSTITUTO DO CÉREBRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

JÉSSICA ALVES DE MEDEIROS ARAÚJO

REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM NEURÔNIOS UTILIZANDO GENES PRÓ-NEURAIS

> NATAL MARÇO DE 2015

"REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM NEURÔNIOS UTILIZANDO GENES PRÓ-NEURAIS"

JÉSSICA ALVES DE MEDEIROS ARAÚJO

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de mestre em neurociências.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS ROMUALDO COSTA

NATAL MARÇO DE 2015

Apoio ao Usuário Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Instituto do Cérebro

A658r Araújo, Jéssica Alves de Medeiros.		
	Reprogramação de células-tronco me neurônios utilizando genes pró-neurais / Medeiros Araújo Natal, 2015. 75f: il.	senquimais em Jéssica Alves de
	Dissertação (Mestrado em Ciências, A concentração: Neurociências). Universida Grande do Norte. Orientador: Prof. Dr. Ma	Área de ade Federal do Rio arcos R. Costa.
 Neurociências - Dissertação. 2. Células-tronco. 3 Células-tronco mesenquimais. 4. Cordão umbilical hum 5. Medula óssea. 6. Diferenciação neuronal. 7. Reprogramação genética. I. Título 		lulas-tronco. 3. umbilical humano. nal. 7.
RN/UF/	BSET/ICE	CDU 612.8

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo amor e apoio de sempre. Em especial, a meus pais, Jorge e Silvânia, e minhas irmãs, Jacquelinne e Karla, por terem sido fundamentais para minha formação acadêmica e pessoal. A minha tia, Auxiliadora, por ser um anjo em minha vida, alguém em que eu sempre pude buscar suporte e compreensão. A vocês eu dedico não só este trabalho, mas todas as minhas realizações.

A meus amigos por todas as alegrias compartilhadas, pelo apoio para enfrentar as dificuldades e pela compreensão nos momentos que me fiz ausente.

Ao professor Marcos Romualdo Costa, pela orientação científica, oportunidade concedida, confiança em mim depositada, por todas as discussões e conhecimentos compartilhados, e por sua amizade, que tornaram a execução deste trabalho muito mais agradável.

À professora Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros por todas as colaborações neste trabalho e pela amigável recepção em seu laboratório. A todos do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), em especial a Deborah Afonso Cornélio por sua paciência e dedicação ao me ensinar e por estar sempre disposta a ajudar no que fosse possível.

Ao professor Richardson Leão pela colaboração neste trabalho, sugestões e enriquecedoras discussões durante o desenvolvimento deste trabalho. E ao Markus Michael Hilscher pelas contribuições na análise dos dados de registro eletrofisiológico.

Aos professores Sandro José de Souza, Katarina Svahn Leão, Stevens Kastrup Rehen e Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros por aceitarem participar da banca examinadora e por suas contribuições neste trabalho.

A todos do Instituto do Cérebro que fazem meus dias mais agradáveis. Em especial, aos colegas do laboratório de Neurobiologia celular e molecular, e aos amigos mais próximos, Bryan, Vivi, Ju, Dudu e Dani.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado, meu eterno agradecimento.

RESUMO

A possibilidade de repor células perdidas em doenças neurodegenerativas através de transplantes com células-troncos das mais diversas fontes vem sendo amplamente estudada. As células-tronco adultas (CTA) podem ser facilmente isoladas e sua utilização na pesquisa não envolve questões éticas e religiosas. Além disso, estas células são menos propícias à transformação tumoral do que células-tronco embrionárias, outra importante fonte de células para terapias celulares. No entanto, as CTA são, em estados fisiológicos, restritas a geração de células dos seus tecidos de origem, o que poderia limitar a sua utilização. Porém, nos últimos anos, uma série de técnicas vem sendo descritas com o objetivo de reverter tais limitações. Neste trabalho, nós investigamos a capacidade das células-tronco mesenquimais adultas, isoladas de camundongos ou do cordão umbilical humano, serem induzidas a adquirir um fenótipo neuronal de forma direta, sem passar por um estágio de célula progenitora ou pluripotente, através da reprogramação genética com genes pró-neurais. Nossos resultados indicam que tanto células-tronco mesenquimais adultas murinas quanto humanas podem ser reprogramadas em neurônios após a expressão combinada de Sox2 e Ascl1 ou Sox2 e Neurog2. As células reprogramadas exibem morfologias compatíveis com o fenótipo neuronal, expressam proteínas típicas de neurônios maduros, apresentam a capacidade de gerar potenciais de ação repetitivos e formam conexões sinápticas com outros neurônios presentes no cultivo. Portanto, nosso trabalho apresenta a primeira evidência de reprogramação direta de células-tronco mesenquimais humanas em neurônios funcionais.

Palavras chaves: células-tronco, células-tronco mesenquimais, cordão umbilical humano, medula óssea, diferenciação neuronal, reprogramação genética

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Técnicas de reprogramação nuclear	10	
Figura 2	Representação esquemática das três possíveis maneiras de		
	obtenção de neurônios a partir das CTM	15	
Figura 3	Representação esquemática da estrutura de um dímero da família		
	bHLH complexado ao DNA	21	
Figura 4	Representação esquemática temporal dos métodos experimentais		
	utilizados (dias)	24	
Figura 5	Mapa esquemático do plasmídeo pCAG-Neurog2-IRES-DsRed,		
	mostrando algumas de suas características	28	
Figura 6	Formação de adipócitos nas mCTM 30 dias após o tratamento com		
	indutores de diferenciação adipogênica	32	
Figura 7	Formação de osteócitos nas mCTM 30 dias após o tratamento com		
	indutores de diferenciação osteogênica	33	
Figura 8	Expressão das proteínas repórteres nas mCTM 2 dias após a		
	nucleofecção	34	
Figura 9	Eficiência média da nucleofecção nas mCTM 10 dias após a		
	transfecção	34	
Figura 10	Na ausência do co-cultivo, a expressão de Sox2 ou Sox2 mais		
	Ascl1 nas mCTM não altera morfologia nem expressão de β-III		
	tubulina	35	
Figura 11	Na presença de co-cultivo com células hipocampais, a expressão		
	de Sox2 ou Sox2 e Ascl1 nas mCTM induz aquisição de morfologia		
	neuronal e expressão de β-III tubulina	36	
Figura 12	Expressão das proteínas repórteres nas hCTM do cordão umbilical		
	após um dia da transfecção química	38	
Figura 13	Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações		
	morfológicas, na presença de co-cultivo com hipocampo	39	
Figura 14	Expressão combinada de Sox2 com Ascl1 ou Neurog2 nas hCTM,		
	na ausência de co-cultivo, não altera morfologia das células e		
	expressão de Map2	40	

Figura 15	Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações	
	morfológicas e expressão de marcadores neuronais maduros, na	
	presença de co-cultivo com células hipocampais	41
Figura 16	Eficiência média da reprogramação das hCTM em neurônios, na	
	presença de co-cultivo com células hipocampais	42
Figura 17	Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações	
	morfológicas, na presença de co-cultivo com astrócitos	43
Figura 18	Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações	
	morfológicas, na presença de co-cultivo com astrócitos	44
Figura 19	Expressão de vGAT e vGLUT1 nas hCTM reprogramadas	46
Figura 20	hCTM do cordão umbilical reprogramadas com genes pró-neurais	
	se conectam com neurônios hipocampais	47
Figura 21	hCTM transfectadas com plasmídeos controles não se conectam	
	com neurônios hipocampais	48
Figura 22	hCTM reprogramadas com Ascl1 e Sox2 se conectam com	
	neurônios hipocampais	49
Figura 23	hCTM reprogramadas com Sox2 e Neurog2 se conectam com	
	neurônios hipocampais	50
Figura 24	Influxo de cálcio das hCTM reprogramadas com genes pró-neurais	
	se assemelha ao observado em neurônios hipocampais in	
	vitro	51
Figura 25	Propriedades eletrofisiológicas de uma hCTM reprogramada em	
	neurônio mediante expressão de Sox2 e Ascl1	52
Figura 26	Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em	
	neurônio mediante expressão de Sox2 e Ascl1	53
Figura 27	Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em	
	neurônio mediante expressão de Sox2 e Neurog2	54
Figura 28	Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em	
	neurônio mediante expressão de Sox2 e Neurog2	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	 Resumo dos trabalhos com reprogramação direta de fibroblast 		
	em neurônios	18	
Tabela 2	Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em		
	neurônio mediante expressão de genes pró-neurais	56	
Tabela 3	Resumo dos trabalhos com reprogramação direta de células		
	humanas em diferentes subtipos neuronais	63	

SUMÁRIO

I.		INTRODUÇÃO	9
	1.	Células-tronco e reprogramação celular	9
	2.	Células-tronco mesenquimais	13
	3.	Cordão umbilical humano como fonte de CTM	14
	4.	Diferenciação neuronal1	14
	4.1	Obtenção de neurônio a partir de célula-tronco pluripotente 1	5
	4.2 intern	Obtenção de neurônio indiretamente, passando por estág nediário	<i>iio</i> 16
	4.3	Reprogramação direta em neurônio	17
	5.	Genes mestres	20
II.		OBJETIVOS	22
	1.	Gerais	22
	2.	Específicos	22
	III. METODOLOGIA		23
	1.	Coleta e isolamento das CTM do cordão umbilical	23
	2.	Manutenção do cultivo das CTM do cordão umbilical2	<u>2</u> 4
	3.	Coleta e isolamento das CTM murinas da medula óssea	25
	4.	Caracterização das CTM murinas da medula óssea 2	25
	5.	Reprogramação neuronal2	26
	6.	Registro eletrofisiológico intracelular2	28
	7.	Imageamento de cálcio2	<u>29</u>
	8.	Fixação e imunocitoquímica2	<u>29</u>
	9.	Análise estatística e representação gráfica	30
I١	/.	RESULTADOS	31
	1. mese	Diferenciação das células da medula óssea de camundongos em tecido nquimais	os 31
	2. em ne	Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CTM murina eurônios	as 32
	3. huma	Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CT anas em neurônios	M 36
	4.	Conectividade entre os neurônios induzidos e hipocampais	15
	5.	Propriedades eletrofisiológicas dos neurônios induzidos	51

V.	DISCUSSÃO		
1. mes	Diferenciação das células da medula óssea de camundongos enquimais	em tecidos 57	
2. em r	Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CT neurônios	⁻ M murinas 58	
3. hum	Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação anas em neurônios	das CTM 59	
4.	Conectividade entre os neurônios induzidos e hipocampais	61	
5.	Propriedades eletrofisiológicas dos neurônios induzidos		
6.	Comparação dos trabalhos de reprogramação direta em neu	rônios com	
o no	SSO		
VI.	CONCLUSÃO		
REFEI	REFERÊNCIAS		

I. INTRODUÇÃO

1. Células-tronco e reprogramação celular

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas capazes de proliferar e gerar células progenitoras que podem se diferenciar em um ou mais tipos de células de determinado tecido (Yu e Thomson, 2008). Elas podem ser classificadas de acordo com seu local de origem ou seu potencial de diferenciação. As CT encontradas nas primeiras fases de divisão celular após a formação do Zigoto são chamadas de totipotentes, pois apresentam a capacidade de originar quaisquer células do embrião, placenta e anexos embrionários. Após a separação dos polos vegetal e animal, as células-tronco embrionárias (CTE) são encontradas na massa celular interna do blastocisto e são capazes de gerar todas as células do embrião, mas não possuem mais a capacidade de formar os anexos embrionários. Progressivamente, ainda no período embrionário, células-tronco multipotentes são geradas nos diferentes tecidos em desenvolvimento. Estas CT multipotentes estão, geralmente, restritas à geração de células de um determinado tecido, como por exemplo, as célulastronco neurais, gerando neurônios e células gliais.

Após o nascimento e na vida adulta, algumas CT multipotentes podem persistir em nichos específicos, sendo denominadas células-tronco adultas (CTA). Estas CTA apresentam potencial de diferenciação em tipos celulares da sua linhagem de origem, tais como as células-tronco mesenquimais gerando osteócitos, condrócitos e adipócitos. Essa restrição no potencial das CTA reflete, em grande parte, o nível de especialização que ocorreu durante o desenvolvimento (Morrison e Spradling, 2008; Morrison et al., 1997), mas também pode ser um efeito do nicho no qual estas células se encontram no organismo adulto.

Em geral, CTA apresentam menor potencial para gerar diferentes tipos celulares do que as CTE. Por outro lado, as CTA apresentam uma série de vantagens, tais como a maior facilidade de isolamento, ausência de questões éticas ou religiosas envolvendo sua utilização na pesquisa, grande capacidade de propagação em cultura, e baixa imunogenicidade, podendo ser, teoricamente, empregadas em transplantes alogênicos (Ding et al., 2011; Keating, 2012). Além disso, uma série de técnicas vem sendo descritas nos últimos anos com o

objetivo de reverter às limitações de potenciais de diferenciação das CTA e até mesmo o destino das células somáticas adultas.

Atualmente, três diferentes técnicas de reprogramação nuclear – transferência nuclear, fusão celular e expressão de fatores transcricionais (esquematizado na figura 1) – tem demonstrado que células diferenciadas podem ter seu destino reespecificado, retornando a um estado de célula-tronco embrionária, com capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários ou mesmo um ser vivo completo (Vierbuchen e Wernig, 2012; Yamanaka e Blau, 2010). Isto é possível inclusive a partir de células com alto grau de especialização como neurônios (Kim et al., 2011a).



Figura 1: Técnicas de reprogramação nuclear. A, Transferência nuclear. Nesta técnica, o núcleo de uma célula somática (2n) é transplantado para um oócito enucleado, que é capaz de gerar um blastocisto. **B,** Fusão celular. Nesta técnica, duas células diferentes se unem e formam uma única célula, híbrido (quando a célula fusionada sofre divisão) ou heterocário (quando não ocorre divisão celular). **C,** Expressão de fatores transcricionais. Esta técnica pode ser usada para induzir a formação de uma célula-tronco embrionária. As setas pontilhadas indicam processos mais lentos (envolvendo múltiplas divisões celulares) do que as setas sólidas (sem divisão celular). Adaptado de Yamanaka e Blau (2010).

As primeiras evidências que atestaram a possibilidade de reprogramação celular foram publicadas na década de 50, por Briggs, King e Gurdon utilizando a técnica de transferência nuclear em células de anfíbios (Briggs e King, 1952;

Gurdon et al., 1958). Gurdon e colaboradores transferiram o núcleo de uma célula embrionária de *Xenopus* para um oócito anucleado, e este foi capaz de gerar novos girinos (Gurdon et al., 1958). Mais tarde, outros trabalhos demonstraram que a transferência nuclear de células adultas também era capaz de gerar larvas de *Xenopus*, porém com eficiência reduzida se comparada à transferência nuclear de células embrionárias (Gurdon, 2006; Pasque et al., 2011). Estes trabalhos demonstraram que o estado diferenciado das células não é resultado de mudanças irreversíveis no genoma, adquiridas ao longo do desenvolvimento, e indicaram que o oócito contém "fatores de reprogramação" que causam modificações epigenéticas no núcleo de células diferenciadas que permitem a aquisição de um estágio de pluripotência.

Posteriormente, o trabalho de Blau e colaboradores mostrou através de fusão celular que a reprogramação celular não se limitava aos oócitos. Neste trabalho, miotubos multinucleados, após fusão celular e formação de heterocários (célula multinucleada que contem núcleos geneticamente diferentes), induziram a expressão de genes específicos de células musculares em outros tipos celulares (Blau et al., 1983).

A terceira técnica capaz de alterar o fenótipo celular a ser descrita foi a reprogramação através da expressão forçada de genes mestres. O primeiro trabalho a identificar um fator transcricional mestre capaz de regular genes específicos de um tecido foi publicado em 1987. Eles mostraram que a expressão forçada de MyoD em fibroblastos de camundongos era suficiente para convertê-los em mioblastos (Davis et al., 1987). Além deste trabalho, em 1995 foi demonstrado que a expressão ectópica de um fator transcricional *eyeless* (conhecido como Pax6 em mamíferos), um gene mestre do desenvolvimento do olho, induzia a formação de olhos em diversas partes do corpo da *Drosophila* (Halder et al., 1995). Esses dados evidenciaram que um fator transcricional pode ser suficiente para iniciar e controlar a diferenciação em um tipo celular específico.

Alguns anos mais tarde, alguns trabalhos propuseram que células-tronco adultas, mesenquimais e neurais, poderiam contribuir para a formação de camundongos quimeras e apresentavam capacidade de gerar células de todas as linhagens germinativas quando injetadas em blastocistos em fases iniciais (Clarke et al., 2000; Jiang et al., 2002). Porém, estes resultados foram contestados por outros trabalhos, que demonstraram que as células-tronco adultas transplantadas fusionavam com as células do receptor e formavam células multinucleadas, comprovando que as células-tronco adultas não apresentavam potencial para gerar células de outras linhagens, como neurônios, hepatócitos e cardiomiócitos (Alvarez-Dolado et al., 2003; Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002).

Estimulados por esses trabalhos de transferência nuclear, fusão celular e reprogramação através da expressão de um fator transcricional, Yamanaka e colaboradores investigaram os genes responsáveis por induzir a reprogramação de fibroblastos em células pluripotentes. Neste trabalho eles identificaram genes expressos especificamente em células-tronco embrionárias e verificaram que a expressão combinada de 24 destes genes em fibroblastos de camundongos induzia a aquisição de propriedades de pluripotência nestas células. Após sistemática eliminação, apenas quatro desses fatores (Oct4, Sox2, Klf4 e c-myc) foram suficientes para induzir a reprogramação dos fibroblastos em células pluripotentes, chamadas de *"induced pluripotent stem cell* (iPS)". Estas iPSs expressam proteínas específicas de células-tronco embrionárias e apresentam capacidade de gerar células de todas as linhagens germinativas (Takahashi e Yamanaka, 2006). Em resumo, este trabalho demonstrou que células-tronco pluripotentes podem ser geradas diretamente, a partir de fibroblastos, através da expressão de genes definidos.

Desde então, outras evidências tem demonstrado que as CTA são mais propícias à reprogramação do que outras células somáticas, com a necessidade de um número menor de fatores, provavelmente como resultado de seu estado "mais indiferenciado" e maior plasticidade (Giorgetti et al., 2009; Kim et al., 2009).

O trabalho de Giorgetti e colaboradores demonstrou a formação de iPS a partir das células do sangue do cordão umbilical utilizando apenas dois dos quatro fatores de transcrição utilizados por Yamanaka (Takahashi e Yamanaka, 2006), OCT4 e SOX2. As células reprogramadas apresentaram morfologia característica de CTE, expressão dos marcadores de pluripotência, capacidade de formação de corpos embrionários e diferenciação nos derivados das três linhagens germinativas, inclusive neurônios (Giorgetti et al., 2009).

Atualmente, diversos tipos celulares foram convertidos em iPS com frequências de reprogramação e combinações de fatores transcricionais

variados, indicando que a reprogramação nuclear depende do "contexto" celular, ou seja, do estado de enovelamento da cromatina, seu padrão de acetilação e metilação, assim como do padrão inicial de expressão gênica da célula. Diante disso, a identificação dos genes necessários para induzir a reprogramação celular nos mais diversos tecidos, bem como a escolha da célula a ser reprogramada tem incitado um número crescente de pesquisas nesta área.

Neste sentido, no presente trabalho nós avaliamos a possibilidade de reprogramação genética de células-tronco mesenquimais adultas em neurônios.

2. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) foram inicialmente isoladas da medula óssea por Friedenstein e colaboradores em 1968. Esta população de células aderentes foi descrita como "colony forming unit-fibroblast" (CFU-F), com morfologia fibroblastóide, alta capacidade proliferativa e potencial para se diferenciar *in vitro* em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso, dependendo do estímulo e condições de cultivo (Afanasyev et al., 2010). Caplan, em 1991, propôs a denominação de "células-tronco mesenquimais" para estas células, por apresentarem a capacidade de gerar todas as células da linhagem mesodérmica (Caplan, 1991; Keating, 2012).

Nas décadas seguintes, o potencial terapêutico das CTM gerou um crescente interesse na comunidade científica (Ding et al., 2011; Keating, 2012). No entanto, os pesquisadores utilizavam diferentes métodos de isolamento, expansão e caracterização destas células, o que dificultava a comparação entre os resultados desses estudos. Este panorama levou a criação de uma nova terminologia e critérios de caracterização por parte da Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici et al., 2006; Horwitz, 2005). Os critérios mínimos que devem ser preenchidos, atualmente, para que uma célula seja considerada CTM incluem: i) a aderência ao plástico de cultura; ii) a expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90; iii) a ausência de expressão dos marcadores hematopoiéticos – CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR – ao longo do cultivo; e iv) a capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob determinadas condições *in vitro* (Dominici et al., 2006).

Além da medula óssea, as CTM podem ser isoladas a partir de uma variedade de tecidos, incluindo placenta, pele, poupa dentária, líquido amniótico, células perivasculares e geleia de Wharton do cordão umbilical (Ding et al., 2011). As CTM provenientes de diferentes tecidos não apenas exibem diferenças na expressão de alguns antígenos de superfície, mas variam também quanto a sua capacidade de diferenciação (Harichandan e Bühring, 2011). Tem sido sugerido que CTM isoladas de tecido extraembrionários (como partes da placenta e do cordão umbilical) apresentam maior capacidade proliferativa e potencial de diferenciação do que as CTM adultas – medula óssea e tecido adiposo (Hass et al., 2011; Petsa et al., 2009). Outra vantagem importante das CTM de tecidos extraembrionários é a facilidade de extração dessas células através de procedimentos não invasivos, sem riscos para a mãe e o bebê.

3. Cordão umbilical humano como fonte de CTM

As CTM podem ser isoladas de diferentes partes do cordão umbilical. O cordão umbilical é um tecido extraembrionário constituído por duas artérias e uma veia, envolvidas por um tecido conjuntivo, conhecido como geleia de Wharton. Esta consiste em um tecido conetivo mucoso, rico em glicosaminoglicanos, com a função de prevenir a compressão e torção dos vasos (Can e Karahuseyinoglu, 2007). Em especial, as CTM podem ser extraídas do cordão umbilical a partir do sangue, da geleia do Wharton, ao redor dos vasos e da camada subendotelial da veia (Romanov et al.; Troyer and Weiss, 2008).

Como as CTM do cordão umbilical são originadas de tecido mesodérmico, a sua capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica tem sido extensivamente estudada (Karahuseyinoglu, 2007; Schneider et al., 2010; Wang et al., 2004). Além da diferenciação nas linhagens mesenquimais clássicas, o potencial dessas células em originar hepatócitos, cardiomiócitos, músculo esquelético e até mesmo tecido neural vem sendo investigado (Fan et al., 2011).

4. Diferenciação neuronal

O processo de diferenciação neuronal a partir de CT (e, em alguns casos, a partir de células somáticas) pode ser induzido por três diferentes caminhos: (1) a reprogramação em células-tronco pluripotentes induzidas (iPS – *"induced pluripotent stem cell*") seguida da indução neuronal; (2) a passagem por um

estágio intermediário de células progenitoras neurais; e (3) a diferenciação direta em neurônios. Estes diferentes caminhos são ilustrados para as CTM na figura 2 e discutidos individualmente.



Figura 2: Representação esquemática das três possíveis maneiras de obtenção de neurônios a partir das CTM. (1) As CTM são induzidas a um estágio de pluripotência (iPS) antes de formarem neurônios; (2) As CTM são induzidas a um estágio de progenitor neuronal antes de diferenciarem em neurônios; e (3) CTM são reprogramadas diretamente em neurônios, sem passar por estágios intermediários.

4.1 Obtenção de neurônio a partir de célula-tronco pluripotente:

A primeira demonstração de diferenciação das células-tronco embrionárias (CTE) em neurônios funcionais foi publicada independentemente por três grupos (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995) e desde então tem sido significativamente melhorada por uma série de estratégias (Bibel et al., 2007; Rohwedel et al., 1999). Cada um dos três principais tipos de células do sistema nervoso central – neurônios, astrócitos e oligodendrócitos – pode ser gerado e populações relativamente puras podem ser isoladas a partir das CT pluripotentes, quando cultivadas em condições adequadas (Aubert et al., 2002; Noisa et al., 2012).

Os protocolos para a diferenciação de subtipos específicos de neurônios têm incluído a combinação sequencial de moléculas reconhecidas por desempenhar um papel no estabelecimento destas linhagens durante o desenvolvimento do embrião (Hansen et al., 2011; Lee et al., 2000; Peljto e Wichterle, 2011; Shi et al., 2012).

A possibilidade de gerar diferentes tipos de neurônios a partir das CTE tem estimulado o interesse dos pesquisadores na terapia celular de doenças neurodegenerativas e na modelagem de doenças *in vitro* (Colman e Dreesen, 2009; Sterneckert et al., 2014).

Assim como para CTE, o potencial de diferenciação neuronal das iPS tem sido extensivamente estudado. O trabalho de SHI *et al.*, 2012 demonstrou resultados semelhantes de diferenciação em neurônios corticais a partir de CTE e iPS combinando o tratamento com ácido retinoico e inibição da sinalização por SMAD para promover a indução neural. Neste trabalho foi demonstrado a formação de neurônios com propriedades eletrofisiológicas maduras e sinapses glutamatérgicas. Além disso, a diferenciação em subtipos neuronais, caracterizados pela expressão de proteínas expressas por neurônios de diferentes camadas corticais, ocorreu de forma sequencial, semelhante ao desenvolvimento das camadas do córtex *in vivo* (Shi et al., 2012).

4.2 Obtenção de neurônio indiretamente, passando por estágio intermediário:

O trabalho de Giorgetti e colaboradores (2012) mostrou a conversão de células do sangue do cordão umbilical humano em células da linhagem neuronal através da expressão ectópica de SOX2 e c-Myc. Após a reprogramação, as células apresentaram elevada taxa proliferativa, expressão dos marcadores de progenitores neurais Nestin e SOX2, e ausência de marcadores neuronais pósmitóticos – como NeuN, VGlut1, GABA e Synapsin1 – o que indica que a diferenciação neuronal ocorreu por meio de um estágio intermediário, provavelmente através de uma população de células progenitoras. Estas células, na presença de meio de diferenciação neuronal, após 4-6 semanas, adquiriram morfologia de neurônios maduros e expressaram vários marcadores neuronais. Além disso, mostraram a capacidade de gerar potenciais de ação, após a maturação *in vitro*, bem como *in vivo* após o transplante no hipocampo de camundongos (Giorgetti et al., 2012).

Apesar da relevância deste estudo, o uso de c-Myc na reprogramação dessas células dificulta futuras aplicações clínicas, pois este fator de transcrição é um proto-oncogene, envolvido nos processos de regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose, o que implica um grande risco de formação de tumor (Wernig et al., 2008). Como evidência disso, já foi mostrado que a omissão do retrovírus c-Myc na reprogramação de fibroblastos em iPS reduziu significativamente o risco de tumorigênese nos camundongos quimeras (Nakagawa et al., 2008).

4.3 Reprogramação direta em neurônio:

Vários trabalhos relataram a expressão de alguns marcadores neurais como βIII-tubulina, neurofilamento-M, "Glial fibrillary acidic protein" (GFAP), NEUROD1, OLIG2 e WNT1 – e alterações morfológicas das CTM como sendo consistentes com a indução de um fenótipo neural, quando expostas aos mais diversos tratamentos e condições de cultivo, como tratamento com "butylated hydroxyanisole" e "dimethylsulphoxide" (DMSO) (Mitchell, 2003; Woodbury et al., 2000), ácido retinoico e fatores neurotróficos (Buzanska et al., 2002; Jang et al., 2004; Sanchez-ramos et al., 2001), "dibutyryl-cAMP" (db-cAMP) e "3-isobutyl-1methylxanthine" (IBMX) (Fallahi-Sichani et al., 2007; Greschat et al., 2008; Kögler et al., 2004; Tio et al., 2010; Wang et al., 2007). Porém, outros estudos reavaliaram o efeito dessa mesma abordagem química nas CTM e mostraram que as alterações morfológicas relatadas, como aquisição de um fenótipo neuronal, foram resultado de uma retração citoplasmática causada por despolimerização dos filamentos de actina e perda da adesão celular e, portanto, não representava crescimentos de neuritos. Além disso, essas alterações morfológicas podem ser reproduzidas em fibroblastos com o mesmo tratamento, bem como podem ser mimetizadas por agentes estressores, como detergentes por exemplo. Além das análises morfológicas em tempo real, a análise de marcadores revelou que as CTM da medula óssea constitutivamente expressam marcadores relacionados com outras linhagens, incluindo várias pertencentes à linhagem neural, e estes não foram modulados após aplicação dos protocolos de "indução neural" (Bertani et al., 2005; Krabbe et al., 2005; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004).

Por outro lado, a reprogramação genética de células somáticas de forma direta apresenta resultados mais contundentes como, por exemplo, a conversão de fibroblastos de camundongos em neurônios funcionais por fatores transcricionais definidos (Vierbuchen et al., 2010; Wernig et al., 2008). Inicialmente, 19 genes especificamente expressos em tecidos neurais ou

implicados no desenvolvimento neural foram rastreados, dos quais apenas três fatores (ASCL1, BRN2 e MYT1L) foram suficientes para converter fibroblastos em neurônios funcionais.

Desde então, novos fatores transcricionais ou diferentes combinações dos mesmos, pequenas moléculas, reguladores epigenéticos e microRNAs tem sido descritos por converterem fibroblastos em diferentes subtipos de neurônios funcionais, em células camundongos e humanos – resumido na tabela 1, atualizada de Xu e colaboradores (2015).

	Fenótipo adquirido	Fatores de reprogramação	Referência
	Neurônio	Repressão de PTB	(Xue et al., 2013)
WA2	Neurônio (dopaminérgico)	Ascl1, Pitx3, Lmx1a, Nurr1, Foxa2, EN1	(Kim et al., 2011b)
· Sara	Neurônio (dopaminérgico)	Lmx1a, Foxa2, Ascl1, Brn2 ou Lmx1b, Otx2, Nurr1, Ascl1, Brn2	(Sheng et al., 2012)
	Neurônio (glutamatérgico)	Ascl1, Brn2, Myt1I	(Vierbuchen et al., 2010)
\bigcap	Neurônio	ASCL1, NGN2, CHIR99021, SB431542	(Ladewig et al., 2012)
	Neurônio (glutamatérgico)	NGN2, Forskolin, Dorsomorphin	(Liu et al., 2013)
	Neurônio (dopaminérgico)	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A, FOXA2	(Pfisterer et al., 2011)
	Neurônio (dopaminérgico)	MASH1, NGN2, SOX2, NURR1, PITX3	(Liu et al., 2012)
	Neurônio (glutamatérgico)	ASCL1, BRN2, MYT1L, NEUROD1	(Pang et al., 2011)
	Neurônio (glutamatérgico)	BRN2, MYT1L, miR-124	(Ambasudhan et al., 2011)
\sum	Neurônio (glutamatérgico, GABAérgico)	ASCL1, MYT1L, NEUROD2, miR-9/9*, miR-124	(Yoo et al., 2011)
	Neurônio (dopaminérgico)	Ascl1, Lmx1a, Nurrl	(Caiazzo et al., 2011)
	Neurônio	Ascl1	(Chanda et al., 2014)
	Neurônio (motor)	Brn2, Ascl1, Myt1l, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2	(Son et al., 2011)
	Neurônio (sensorial)	Brn2 e Ngn2 ou Ngn1	(Blanchard et al., 2015)

Tabela 2: Resumo dos trabalhos com reprogramação direta de fibroblastos em neurônios. Na parte superior (verde) estão os trabalhos que utilizaram células de camundongos, na parte medial (azul) trabalhos com células de humanos e na parte inferior (cinza) resultados obtidos com células de ambos. Tabela atualizada de Xu e colaboradores (2015).

Outra forma de reprogramação direta em neurônios tem sido relatada a partir de astrócitos corticais de roedores pós-natais, estes são altamente suscetíveis à reprogramação neuronal através da expressão forçada de determinado fator de transcrição, tais como *Neurogenin2 (Neurog2), Distal-less homeobox 2 (Dlx2)*, ou *Mammalian Achaete-scute homolog 1 (Mash1, também conhecido como Ascl1)* (Berninger et al., 2007; Blum et al., 2011; Heinrich et al., 2010). A expressão de *Neurog2* induz um fenótipo glutamatérgico, enquanto que a expressão de *Ascl1* e *Dlx2* induz um fenótipo GABAérgico, assemelhando-se

aos papéis desses fatores transcricionais durante o desenvolvimento (Guillemot, 2005). Os astrócitos reprogramados em neurônios de subtipos específicos adquirirem propriedades elétricas compatíveis com um fenótipo neuronal maduro, tais como a capacidade de gerar potenciais de ação e de formar contatos sinápticos (Berninger et al., 2007; Heinrich et al., 2010). Astrócitos corticais pós-natais também podem ser reprogramados em neurônios dopaminérgicos, através da expressão combinada de *Ascl1, LIM homeobox TF 1 (Lmx1)* e *nuclear receptor related 1 protein (Nurr1*) (Addis et al., 2011).

Além destas células, o trabalho de Karow e colaboradores (2012) demonstrou que pericitos isolados do córtex cerebral adulto humano podem ser reprogramados em células neuronais através da expressão dos fatores de transcrição *Sox2* e *Ascl1*, mediada por retrovírus. As células reprogramadas adquiriram a capacidade de gerar potencial de ação e foram alvos sinápticos para outros neurônios, indicando sua capacidade de integrar em redes neurais. No entanto, as células transfectadas com *Neurog2* utilizando vetores retrovirais, não sofreram diferenciação em neurônios (Karow et al., 2012). Esses resultados indicam que a ação sinérgica de Sox2 e Ascl1, mas não de Sox2 e Neurog2, é necessária para a reprogramação neuronal de células de origem mesodérmica.

Existe certa discussão sobre a origem e identidade dos pericitos, alguns estudos defendem que pericitos são, provavelmente, células-tronco mesenquimais ou progenitoras, capazes de dar origem a adipócitos, cartilagem, ossos e músculos (Armulik et al., 2011). Considerando que os pericitos apresentam uma origem embrionária mais próxima às CTM e, portanto, características semelhantes quanto ao "estado genético" dessas células talvez seja possível a reprogramação das CTM em neurônios utilizando *Sox2* e *Ascl1*, como foi descrito para os pericitos (Karow et al., 2012).

Tendo em vista este cenário, no presente trabalho nós investigamos a capacidade das CTM serem induzidas a adquirir um fenótipo neuronal de forma direta, sem passar por um estágio de célula progenitora ou pluripotente, através da reprogramação genética com genes pró-neurais. Especificamente, nós analisamos se a expressão de diferentes combinações de fatores transcricionais, *Sox2* combinada a *Neurog2* ou *Ascl1*, é suficiente para reprogramar células tronco mesenquimais em neurônios funcionais.

5. Genes mestres

Genes regulatórios mestres são expressos nos primórdios do desenvolvimento de uma linhagem ou tipo celular, participam especificação dos mesmos e são capazes de reespecificar o fenótipo de uma célula destinada a formar uma linhagem específica (Chan e Kyba, 2013). Eles atuam controlando a expressão de outros genes, reprimindo ou ativando-os, e são necessários e suficientes para a formação de determinada linhagem ou tipo celular. E, por isso, estes genes têm sido utilizados na reprogramação, com o intuito de converter um tipo celular ou linhagem em outra (Xu et al., 2015).

Neste trabalho, nós abordaremos genes mestres implicados no desenvolvimento de células neurais: os genes pró-neurais Neurogenin2, Ascl1, e Sox2.

Os genes pró-neurais codificam fatores transcricionais da família *basic helix–loop–helix* (bHLH), um motivo estrutural caracterizado por duas hélices separadas por uma volta (figura 3). Essas proteínas ligam em regiões específicas no DNA, região conhecida como E-box, e ativam a transcrição de genes alvos (Bertrand et al., 2002). No sistema nervoso central e periférico esses fatores transcricionais atuam promovendo a proliferação de progenitores neurais e a diferenciação em determinado tipo celular, glias e neurônios (Bertrand et al., 2002; Kageyama et al., 2005; Ross et al., 2003). Mais recentemente foi demonstrado que diferentes combinações e padrões de expressão dos genes da família bHLH em progenitores neurais de camundongos podem especificar a diversidade de fenótipos celulares no sistema nervoso: neurônio, glia e oligodendrócito (Imayoshi et al., 2013).

Neurogenin2 e Ascl1 (também conhecido como Mash1 – *Mammalian achaete-scute homolog 1*) são membros dessa família, eles são responsáveis por promoverem a determinação do destino neuronal e reprimirem a expressão de genes gliais (Nieto et al., 2001; Tomita et al., 2000). Estes fatores transcricionais podem apresentar funções distintas quanto à especificação neuronal. Por exemplo, Neurogenin2 é expresso no telencéfalo dorsal e está envolvido com a formação de neurônios glutamatérgicos, enquanto Ascl1 é expresso no telencéfalo ventral e está envolvido com a geração de neurônios gabaérgicos (Fode et al., 2000; Parras et al., 2002).

20



Figura 3: Representação esquemática da estrutura de um dímero da família bHLH complexado ao DNA. O domínio básico se liga ao DNA, onde vários resíduos desta região fazem contato direto com sequências E-box. (Bertrand et al., 2002).

Sox2 é um fator de transcrição pertence à família Sox, também conhecida como SRY (*sex determining region Y*), que apresentam um domínio de ligação altamente conservado, chamado HMG (*High-mobility group*). Sox2 é um gene mestre que juntamente com outros fatores transcricionais, como Oct3/4, controla um conjunto de genes que orquestra a embriogênese em mamíferos (Avilion et al., 2003; Nichols et al., 1998).

Esse fator é expresso durante o desenvolvimento do sistema nervoso de camundongos, inicialmente, nas células do tubo neural e, posteriormente, em progenitores neurais e é responsável por manter estas células com características de progenitor (Graham et al., 2003). Em humanos, mutações no gene que codifica o Sox2 parecem estar associadas com desordens no olho, como glaucoma e catarata (Mihelec et al., 2008; Wang et al., 2008).

Considerando o papel central dos fatores de transcrição Sox2, Neurog2 e Ascl1 no processo de especificação neuronal durante o desenvolvimento, nossa hipótese é de que a expressão destes fatores, de forma individual ou conjunta, poderia ser suficiente para induzir o fenótipo neuronal nas CTM. Além disso, é possível que a combinação de genes utilizada contribua para especificação do fenótipo neuronal gerado, considerando, por exemplo, a função de Neurogenin2 e Ascl1 durante o desenvolvimento do córtex seria possível induzir a formação de neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos, respectivamente.

II. OBJETIVOS

1. Gerais

Induzir células-tronco mesenquimais de duas fontes, isoladas da medula óssea de roedores e da geleia de Wharton do cordão umbilical de humanos, a adquirirem uma identidade neuronal, através da reprogramação genética utilizando fatores de transcrição pró-neurais.

2. Específicos

- Isolar e caracterizar as células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos;
- Identificar quais são os fatores necessários para induzir a reprogramação das CTM em neurônios funcionais;
- Avaliar alterações morfológicas e de marcadores característicos de células neuronais nas CTM após induzir expressão de *Neurog2*, Sox2 e *Ascl1*;
- Verificar atividade eletrofisiológica dos neurônios induzidos através de registro eletrofisiológico intracelular (*patch clamp*) e imageamento de cálcio.

III. METODOLOGIA

Os métodos experimentais utilizados neste projeto estão descritos abaixo. Em resumo, eles consistem na coleta, isolamento e manutenção das célulastronco mesenquimais, seguido da reprogramação neuronal através da transfecção destas células com plasmídeos de DNA, contendo o gene codificador para fatores de transcrição pró-neurais, e por fim, métodos imunocitoquímicos e funcionais (imageamento de cálcio e registro eletrofisiológico intracelular) utilizados para análise das células reprogramadas (figura 4).



Figura 4: Representação esquemática temporal dos métodos experimentais utilizados (em dias).

1. Coleta e isolamento das CTM do cordão umbilical

O material utilizado no presente trabalho foi obtido de doações com o consentimento livre e esclarecido de mães parturientes na Maternidade Januário Cicco, pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN. Após o parto, os cordões foram retirados de acordo com a metodologia proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As amostras foram coletadas em um frasco estéril contendo uma solução tampão – *Phosphate buffered saline* (PBS) acrescido de 3% de solução de antibióticos e antimicótico (10000 U/mL de penicilina sódica, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B, GIBCO) – e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG) na UFRN.

As células foram isoladas da geleia de Wharton do cordão umbilical e criopreservadas para manutenção das linhagens celulares primárias (Cornélio, 2012; Duarte et al., 2012). Com o intuito de analisar se as células obtidas do

cordão umbilical são realmente CTM (seguindo determinações de Dominici et al., 2006), a expressão de proteínas marcadoras de superfície foi analisada utilizando citometria de fluxo (FACS) e verificada a capacidade de diferenciação *in vitro* das CTM em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Cornélio, 2012; Duarte et al., 2012). Estas etapas foram realizadas no LBMG e posteriormente, as células criopreservadas foram cedidas para execução do presente trabalho no Instituto do Cérebro, na UFRN.

2. Manutenção do cultivo das CTM do cordão umbilical

Para recuperação, as células foram descongeladas rapidamente, para isso os tubos foram levados diretamente do nitrogênio líquido para o banhomaria a 37°C. Depois de descongeladas, elas foram transferidas para um tubo de centrífuga de 15 mL com alfa-MEM + 20% soro fetal bovino (SFB) + 1% antibióticos, centrifugadas e lavadas para retirar o DMSO. Uma alíquota da suspensão celular foi diluída com azul de tripan (Gibco), para análise da viabilidade celular, as células foram contadas na Câmara de Neubauer através de um microscópio invertido e distribuídas em garrafas T25 (TPP) na densidade de 6000 células/cm².

Após as 48 horas de cultivo inicial, todo o meio de cultura e as células que não aderiram ao frasco foram removidos, e adicionados 3 mL de meio alfa-MEM com 10% SFB (Hyclone) e 1% de antibióticos. A troca do meio foi realizada a cada 72 horas ou quando o meio apresentava-se amarelado, indicativo de mudança de pH. O crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio invertido (CKX 41, OLYMPUS) e quando a cultura atingia cerca de 60% de confluência realizava-se a passagem das células para novas garrafas. Para tal procedimento, utilizava-se 1 mL de solução de 0,25% de tripsina/EDTA (INVITROGEN) em cada T25 por 3 minutos a 37°C. A ação enzimática foi interrompida com SBF, as células em suspenção foram então transferidas para tubos de 15 mL (TPP). A suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o sedimento celular homogeneizado em alfa-MEM com 10% SBF (Hyclone) e 1% de antibióticos. As células foram distribuídas em novos frascos na densidade de 4000 células/cm². O número da passagem celular foi marcado a cada tratamento com Tripsina (P1, P2, P3, P4 e assim por diante). Nos

experimentos de reprogramação neuronal nós utilizamos células a partir da sexta passagem celular até a décima segunda.

3. Coleta e isolamento das CTM murinas da medula óssea

Todos os procedimentos experimentais com camundongos utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFRN sob protocolo nº 008/2014. A medula óssea foi retirada de camundongos com 6 semanas de idade. Após o sacrifício dos animais, o fêmur e a tíbia foram removidos, e dissecado todo o tecido conjuntivo em torno dos ossos. As amostras foram coletadas em um frasco estéril contendo Hank's Balanced Salt Solution (HBSS - Gibco) e 1% de antibióticos. As epífises foram cortadas, coletadas em tubo cônico com alfa-MEM (Gibco) enriquecido com 10% SBF (Gibco) e 1% de antibióticos, estas foram maceradas e o conteúdo filtrado (BD Falcon[™] cell strainers - BD Biosciences). Utilizando uma seringa de 5 mL com alfa-MEM + 10% SFB + 1% antibióticos, inseria-se a agulha em uma das extremidades do osso e todo o conteúdo foi coletado em tubo cônico. A suspensão de células foi centrifugada a 400g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 10 mL de alfa-MEM + 10% SFB. As células foram distribuídas em garrafas T25 (TPP) na densidade de 5x105 células/T25.

4. Caracterização das CTM murinas da medula óssea

Com o propósito de averiguar se as células obtidas da medula óssea são CTM foi analisada a capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos e adipócitos.

4.1 Protocolo de diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogência foi induzida nas CTM após 30 dias de tratamento com B-glicerofosfato (10 mM), Dexametasona (1 x 10-8 M) e ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/ml) em alfa-MEM suplementado com 10% SFB e antibióticos (Meirelles e Nardi, 2003; Phinney et al., 1999). Para observar a formação de depósitos de cálcio nas CTM após este tratamento as células foram fixadas com PFA 4% durante 20 minutos e coradas com Alizarin vermelho S durante 5 minutos à temperatura ambiente. Alizarin vermelho S é um corante

que forma complexos com o cálcio e é utilizado como indicador da diferenciação osteogênica.

4.2 Protocolo de diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogência foi induzida nas CTM após o tratamento com Dexametasona (1x10⁻⁸M), insulina de pâncreas bovino (2,5 µg/ml), indometacina (100 µM) e rosiglitazona (5 µM) em alfa-MEM com 10% SFB e antibióticos (Meirelles e Nardi, 2003; Phinney et al., 1999). Para confirmar a formação de adipócitos a partir das células isoladas da medula óssea, as CTM foram fixadas com PFA 4% durante 60 minutos e coradas com Óleo vermelho O durante 1 hora à temperatura ambiente, 30 dias após tratamento. Óleo vermelho O é um corante altamente solúvel em lipídeos e, por isso, é utilizado para verificar a indução em tecido adiposo.

5. Reprogramação neuronal

5.1 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste estudo já foram descritos previamente (Costa et al., 2009; Heinrich et al., 2010). Basicamente, eles apresentam um promotor ubíquo CAG e o gene do fator transcricional *Neurog2*, *Sox2* ou *Ascl1*, seguido de uma região IRES (do inglês "*Internal Ribosomal Entry Site*") e o gene da proteína fluorescente vermelha (Dsred) ou proteína fluorescente verde (GFP). Os plasmídeos utilizados como controle apresentam um promotor ubíquo CAG e o gene da proteína fluorescente vermelha (Dsred) ou proteína fluorescente verde (GFP). Os plasmídeos utilizados como controle apresentam um promotor ubíquo CAG e o gene da proteína fluorescente vermelha (Dsred) ou proteína fluorescente verde (GFP). Afim de simplificar a nomenclatura desses plasmídeos, nós adotamos a seguinte denominação: Sox2-GFP, Ascl1-Dsred, Neurog2-Dsred, Controle-Dsred e Controle-GFP. O mapa do plasmídeo contendo Neurog2-DsRed é mostrado na figura 4, para exemplificar a estrutura gênica dos constructos.

Os plasmídeos foram amplificados em Escherichia coli através de transfecção química e purificados utilizando kits livres de endotoxinas Maxiprep (Invitrogen). A concentração e pureza dos vetores amplificados foram mensuradas no espectrofotômetro. Soluções a 1µg/µL foram preparadas em tampão TE e armazenadas a -20°C.



Figura 5: Mapa esquemático do plasmídeo *Neurog2*-DsRed, mostrando algumas de suas características.

5.2 Reprogramação genética

Na transfecção elétrica utilizamos o 4D-Nucleofector (Lonza), seguindo o protocolo recomendado para CTM, "*P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit*" (Lonza). Após a nucleofecção as células foram plaqueadas com alfa-MEM + 10% SFB na densidade de 1x10⁵ células/cm² em lamínulas de vidro previamente tratadas com Poli-D-lisina (SIGMA) e laminina.

Na transfecção química utilizamos *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Para este procedimento as células foram plaqueadas na densidade de 30.000 células/poço na placa de 24 poços (Corning) previamente tratada com Poli-D-lisina (SIGMA) e lamina (SIGMA). Após 24-72h de cultivo, quando as células apresentam 60-70% de confluência foi feita a transfecção química. Para cada reação 1 μ L de cada plasmídeo (1 μ g/ μ L) e 2 μ L do reagente de *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) foram diluídos separadamente em 50 μ L de Opti-MEM (GIBCO), estas soluções incubaram por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida estas soluções foram misturadas e deixadas em repouso durante 20 minutos a temperatura ambiente. Os complexos foram então adicionados às células (100 μ L em cada poço), contendo 500 μ L de Opti-MEM em cada poço, a cultura foi incubada por 10-12 horas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Passado o período de incubação, a solução de transfecção foi retirada e

500 μL de meio de cultura adicionado em cada poço (alfa-MEM + 10% SBF + 1% antibióticos).

Após 24-72 horas da transfecção as células foram cultivadas com astrócitos corticais ou neurônios hipocampais e foi acrescido o meio de diferenciação neuronal DMEM/F12 + 2% B27 (50% do volume total). As células permaneceram em cultivo entre 15-25 dias, e foram monitoradas através do microscópio invertido (Axio Observer, ZEISS).

5.3 Cultura primária de hipocampo ou astrócitos

Com o objetivo de promover a sobrevivência e a maturação neuronal, as células transfectadas foram co-cultivadas com células hipocampais ou astrócitos corticais.

Astrócitos corticais foram isolados a partir de camundongos recémnascidos (entre os dias pós-natais 2 e 5). O córtex foi dissecado e cortado em pequenos pedaços que foram plaqueados em garrafas 25cm² e mantidos a 37°C e 5% CO₂ por uma semana em meio de manutenção de astrócitos: DMEM/F12 acrescido de 2% B27, 10% SFB, 5% soro de cavalo, 1% de antibióticos, EGF e FGF (10ng/µL). Após atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas e distribuídas na densidade de 5x10⁴ células/poço sobre as CTM.

Hipocampos de camundongos recém-nascidos (entre os dias pós-natais 0 e 4) foram dissecados e dissociados em 1mL de solução de 0,25% de tripsina/EDTA, durante 15 minutos a 37°C. A ação enzimática foi interrompida com SFB, a suspensão celular centrifugada, o sobrenadante descartado e o sedimento celular homogeneizado em DMEM/F12 com 2% B27. As células foram distribuídas sobre as CTM na densidade de $5x10^4$ células/cm².

6. Registro eletrofisiológico intracelular

Para registro eletrofisiológico intracelular as lamínulas foram mantidas a 37°C sobre perfusão de fluido cérebro espinhal artificial com tampão de pH (ACSF/HEPES) contendo (em mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl2, 2 CaCl2, 10 HEPES, 10 glicose e 6 sacarose, pH 7.35. As pipetas de vidro foram preenchidas com uma solução interna contendo (em mM) 17.5 KCl, 122.5 K-gluconato, 9 NaCl, 1 MgCl2, 3 Mg-ATP, 0.3 GTP-Tris, 1 HEPES e 0.2 EGTA. Os dados foram adquiridos usando um amplificador de patch clamp (Axopatch 200B, Molecular

Devices, USA) e analisados usando Matlab (Mathworks, USA) (Leão et al., 2010).

7. Imageamento de cálcio

Para imageamento intracelular de cálcio, o indicador de cálcio *Oregon green BAPTA-1 AM* (Invitrogen) foi diluído em Ácido Plurônico F-127 (Invitrogen) na concentração de 2,5mM. Imediatamente antes do imageamento, esta solução foi diluída na concentração de 10µM em uma solução salina a 0,9%. As células foram incubadas nesta solução durante 1 hora, em seguida as células foram lavadas com salina 0,9% e mantidas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% de CO₂ durante 1 hora. Durante o imageamento de cálcio, as células foram mantidas a 37°C sobre perfusão de uma solução salina 0,9% no microscópio de fluorescência (Zeiss). As imagens foram adquiridas com objetiva de imersão de 20X, utilizando o Micro-Manager juntamente com o processador de imagens ImageJ. Mudanças na intensidade da fluorescência foram mensuradas utilizando o ImageJ e definidas como $\Delta F/F=(F_1-F_0)/F_0$, sendo F₀ a média dos dez valores iniciais de cada campo analisado.

8. Fixação e imunocitoquímica

Ao final de cada experimento foi realizada imunocitoquímica com o intuito de amplificar o sinal fluorescente das células transfectadas e caracterizar as células diferenciadas de acordo com a expressão de marcadores neuronais. As células foram fixadas com 4% paraformaldeído em solução tampão (PB), por 10 minutos, seguido de três lavagens com PBS 10 mM. Para imunocitoquímica as células foram incubadas por 12h com os anticorpos primários em solução de PBS 10 mM + 0,5% Triton-X100 + 10% soro normal de cabra (NGS) a 4°C em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram o anti-βIIItubulina (SIGMA) e anti-major microtubule associated protein (anti-Map2; Sigma) para identificar neurônios, anti-Vesicular GABA Amino Acid Transporter (antivGAT) e anti-vesicular glutamate transporter 1 (anti-vGLUT 1) para identificar o subtipo neuronal gerado, e anti-GFP (anti-Green Fluorescent Protein, Aves Labs, Inc.) e anti-RFP (anti-Red fluorescent protein, Rockland) para marcação das células transfectadas. Após três lavagens de 10 minutos em PBS 10mM, o material foi incubado com os anticorpos secundários por 2 horas a temperatura ambiente protegido da luz, os anticorpos secundários utilizados foram anti*mouse* IgG, anti-*rabbit* IgG, anti-*guinea pig* e anti-*Chicken* IgG (Invitrogen), conjugados a diferentes fluoróforos. Findo este período, foram feitas mais três lavagens com PBS e os núcleos das células corados com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenil-indol) 0,02 mg/ml em PBS por 5 minutos (o DAPI forma complexos fluorescentes com o DNA, através da sua ligação a regiões ricas em AT, que são excitados com comprimento de onda de 350 nm). Os espécimes foram montados em Aqua Poly/Mount (Polysciences) e analisados por microscopia de fluorescência (Axio Observer, ZEISS) e confocal (LSM 710, ZEISS).

9. Análise estatística e representação gráfica

Todos as análises estatísticas utilizadas neste trabalho foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5, com exceção dos dados do registro eletrofisiológico que foram analisados através do Matlab. Os dados representados em gráficos de barra mostram a média mais o erro padrão. Testes estatísticos utilizados são indicados ao longo da seção de resultados. Para este estudo, adotamos como intervalo de confiança 95%.

IV. RESULTADOS

1. Diferenciação das células da medula óssea de camundongos em tecidos mesenquimais

CTM são capazes de originar tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (Soleimani e Nadri, 2009; Zhu et al., 2010). Com a finalidade de verificar a natureza das células isoladas da medula óssea de camundongos e utilizadas em nossos experimentos de reprogramação celular, nós utilizamos diferentes protocolos de indução para avaliar a capacidade das células diferenciarem em tecidos adiposo e ósseo.

Para avaliar o potencial de diferenciação das células isoladas da medula óssea de camundongos em adipócitos, nós expusemos as CTM murinas a 30 dias de tratamento com dexametasona, insulina, indometacina e rosiglitazona, e ao final deste período, as células foram coradas com óleo vermelho O (figura 6). O tratamento com indutores adipogênicos ocasionou a formação de acúmulos de gordura nas células isoladas da medula óssea a partir de diferentes doadores (n=3 experimentos independentes), indicando que as células cultivadas tinham potencial osteogênico (figura 6).



Figura 6: Formação de adipócitos nas mCTM 30 dias após o tratamento com indutores de diferenciação adipogênica. Coloração com óleo vermelho O nas mCTM 30 dias pós-tratamento (dpt) com dexametasona, insulina, indometacina e rosiglitazona. A, Condição controle B, Células tratadas com protocolo de diferenciação adipogênica. Note a formação de vacúolos de gordura nesta condição (coloração vermelha) e ausência dos mesmos na condição controle.

De maneira similar, quando expostas a condições de cultivo com indutores osteogênicos as CTM murinas formaram uma matriz extracelular rica em cálcio, como evidenciado pela coloração com Alizarina vermelho (figura 7), indicando a diferenciação em células ósseas.



Figura 7: Formação de osteócitos nas mCTM 30 dias após o tratamento com indutores de diferenciação osteogênica. Coloração com Alizarina vermelho S nas mCTM 30 dias póstratamento (dpt) com β-glicerofosfato, dexametasona e ácido ascórbico. A, Condição controle B, Células tratadas com protocolo de diferenciação osteogênica. Note a formação de acúmulos de cálcio nesta condição (coloração vermelha) e ausência dos mesmos na condição controle.

Por fim, as CTM isoladas da medula óssea de camundongos puderam ser mantidas em estado proliferativo através de sucessivas passagens. Em conjunto, estes resultados indicam que as células isoladas da medula óssea de camundongos apresentam capacidade de auto renovação e multipotência, podendo se diferenciar em células de distintos tecidos mesenquimais, como tecido ósseo e adiposo, sob determinadas condições *in vitro*.

Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CTM murinas em neurônios

Para investigar se a expressão de genes pró-neurais é capaz de reprogramar células-tronco mesenquimais em neurônios, nós realizamos a transfecção elétrica nas células isoladas da medula óssea de camundongos com os plasmídeos contendo Sox2-GFP e Ascl1-DsRed, ou apenas controles (GFP e DsRed). Após dois dias de cultivo (figura 8A e B), observamos a expressão das proteínas repórteres, que se manteve por até 3 semanas (figuras 8 e 9). Virtualmente, todas as células transfectadas receberam os dois plasmídeos, indicando que o método de nucleofecção é adequado para os experimentos de reprogramação das CTM murinas mediante a expressão sinérgica de genes pró-neurais, como por exemplo, Sox2 e Ascl1.



Figura 8: Expressão das proteínas repórteres nas mCTM 2 dias após a nucleofecção. GFP (verde), Dsred (vermelho). **A**, Células transfretadas com Sox2-GFP e Controle-Dsred. **B**, Células transfretadas com Sox2-GFP e Ascl1-Dsred. Observe que a maioria das células apresentam ambas as fluorescências (amarelo).

A análise do número de células transfectadas 10 dias após a nucleofecção revelou uma eficiência média de 26% para ambas as condições (figura 9): Sox2-GFP mais Controle-Dsred (26,6% células GFP e Dsred positivas, desvio padrão=5,71, um experimento independente feito em triplicata, n=164 células transfectadas) e Sox2-GFP mais Ascl1-Dsred (26,6% células GFP e Dsred positivas, desvio padrão=10,45, um experimento independente feito em triplicata, n=332 células transfectadas).



Figura 9: Eficiência média da nucleofecção nas mCTM 10 dias após a transfecção. O gráfico mostra a proporção de células transfectadas com Sox2-GFP e Controle-Dsred (barra branca), e Sox2-GFP e Ascl1-Dsred (barra preta), na terceira passagem, n=1 experimento em triplicata. Média + erro padrão, teste T para medidas não pareadas.

Para avaliarmos alterações morfológicas e a expressão de marcadores neuronais nas células transfectadas, as culturas foram processadas por imunocitoquímica 20 dias após a transfecção utilizando anticorpos para as proteínas GFP, RFP e β-III tubulina.

Na ausência do co-cultivo com hipocampo não foram encontradas células transfectadas com Sox2-GFP e Controle-Dsred (figura 10A), tampouco com Sox2-GFP e Ascl1-Dsred (figura 10B), apresentando morfologias indicativas de aquisição de um fenótipo neuronal, também não foi observada expressão do marcador neuronal β-III tubulina nestas células (figura 10A''' e 10B''').



Figura 10: Na ausência do co-cultivo, a expressão de Sox2 ou Sox2 mais Ascl1 nas mCTM não altera morfologia nem induz expressão de β -III tubulina. Imunofluorescência das mCTM após 20 dias da Nucleofecção (na terceira passagem) na ausência de co-cultivo. Dsred (vermelho), GFP (verde), β -III tubulina (branco) e DAPI (azul). A, células transfectadas com Sox2-GFP e Controle-Dsred; e B, células transfectadas com Sox2-GFP e Ascl1-Dsred.

Por outro lado, quando co-cultivadas com células hipocampais, 44% das células que receberam os plasmídeos Sox2-GFP e Ascl1-Dsred apresentaram mudanças na sua morfologia (figura 11C, n=227 células; 1 experimento em triplicata), caracterizadas pela redução do corpo celular e extensão de vários processos (figura 11B). Além disso, estas células passaram a expressar o marcador neuronal β -III tubulina após 20 dias da transfecção (figura 11B'''). Apenas 7% das células transfectadas com Sox2-GFP e Controle-Dsred exibiram esse tipo de alteração morfológica e expressaram β -III tubulina (figura 11C, n=215 células; 1 experimento em triplicada), enquanto nenhuma célula transfectada apenas com Controle-GFP e Controle-Dsred apresentou estas alterações.


Figura 11: Na presença de co-cultivo com células hipocampais, a expressão de Sox2 ou Sox2 mais Ascl1 nas mCTM induz aquisição de morfologia neuronal e expressão de β -III tubulina. Imunofluorescência das mCTM 20 dias após a nucleofecção e co-cultivadas com células hipocampais. GFP (verde), Dsred (vermelho), β -III tubulina (branco) e DAPI (azul). A, células transfectadas com Sox2-GFP e Controle-Dsred, a seta indica célula transfectada com morfologia ovóide (GFP+/Dsred+/ β -III tubulina-). B, células transfectadas com Sox2-GFP e Ascl1-Dsred (GFP+/Dsred+/ β -III tubulina+), a seta indica célula com morfologia neuronal. C, Proporção de células transfectadas que que adquiriram morfologia neuronal e expressão de β -III tubulina ("reprogramadas"). Células transfectadas com Sox2 e Ascl1 (barra preta), e Sox2 e Dsred (barra branca), n=1 experimento em triplicata. Média + erro padrão, teste T para medidas não pareadas.

A ausência de células reprogramadas após a expressão de Sox2 e Ascl1 sem co-cultivo com hipocampo pode indicar que o co-cultivo com células do hipocampo é necessário para induzir a reprogramação das CTM em neurônios. Outra possibilidade é que a presença das células do hipocampo auxilia na sobrevivência e na maturação dos neurônios induzidos.

Estes dados preliminares sugerem que as CTMs murinas podem ser reprogramadas em neurônios, através da expressão simultânea de Sox2 e Ascl1 na presença de células hipocampais. Contudo, faz-se necessário a realização de novos experimentos a fim de confirmar as alterações observadas e a avaliação eletrofisiológica das células reprogramadas.

3. Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CTM humanas em neurônios

Para analisar se a expressão de genes pró-neurais é capaz de induzir a reprogramação das CTM isoladas a partir do cordão umbilical humano (doravante, denominadas hCTM) em neurônios, nós introduzimos plasmídeos de DNA contendo a sequência codificante dos fatores transcricionais Sox2, Ascl1 ou Neurog2 através de transfecção química com lipofectamina. Um dia após a transfecção nós observamos a expressão das proteínas repórteres em cerca de 7% de todas as células cultivadas (figura 12). Dentre estas células que identificamos a expressão das proteínas repórteres, aproximadamente 95% foram co-transfectadas, ou seja, receberam os dois plasmídeos utilizados em cada condição (Sox2-GFP e Ascl1-Dsred; Sox2-GFP e Neurog2-Dsred; Controle-GFP e Controle-DsRed). Desta forma, o método de transfecção química é útil para avaliarmos a reprogramação celular induzida através da expressão de vários genes exógenos na mesma célula.





Figura 12: Expressão das proteínas repórteres nas hCTM do cordão umbilical após um dia da transfecção química (entre a 6ª e a 11ª passagens). Imagens em contraste de fase, GFP (verde) e Dsred (vermelho). A, Células transfectadas com os plasmídeos controles. B, Células transfectadas com Sox2-GFP e Ascl1-Dsred. C, Células transfectadas com Sox2-GFP e Neurog2-Dsred. D, Proporção de células co-transfectadas com controle (barra branca), Sox2 e Ascl1 (barra cinza) e Sox2 e Neurog2 (barra preta). Média + erro padrão, n=3 experimentos independentes, teste de Kruskal-Wallis.

Para investigarmos se a expressão de genes pró-neurais induzia a aquisição de fenótipo neuronal nós observamos as CTM durante o cultivo celular através de um microscópio de fluorescência invertido. As células transfectadas com Sox2+Ascl1 e Sox2+Neurog2 co-cultivadas com células hipocampais

hipocampais apresentaram diversas alterações morfológicas, caracterizadas por diminuição do corpo celular e extensão de processos longos e finos, consistentes com a aquisição de um fenótipo neuronal (figura 13B e C), enquanto as células transfectadas com plasmídeos contendo apenas os genes que codificam as proteínas repórteres, GFP ou DsRed, não adquiriram este tipo de alteração morfológica (figura 13A).



Figura 13: **Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações morfológicas, na presença de co-cultivo com hipocampo.** hCTM do cordão umbilical após 11 dias da transfecção química na presença de co-cultivo com células hipocampais. Imagens em contraste de fase, Dsred (vermelho) e GFP (verde) A, Exemplo de célula transfectada com plasmídeos codificando as proteínas repórteres GFP e Dsred. **B-C**, Exemplos de hCTM reprogramadas pela expressão de Sox2 e Ascl1 (B) ou Sox2 e Neurog2 (C). As setas amarelas indicam células transfectadas com morfologia neuronal.

Com o intuito de confirmar a reprogramação das CTM em neurônios, nós avaliamos a expressão de proteínas neuronais e alterações morfológicas nas hCTM 15 dias após a transfecção com genes pró-neurais, utilizando métodos imunocitoquímicos. Nós observamos que a expressão combinada de Sox2 com Ascl1 ou com Neurog2 nas hCTM, na ausência do co-cultivo com células hipocampais, não foi suficiente para induzir a formação de células com fenótipos indicativos de uma reprogramação em neurônios (figura 14). De fato, as hCTM co-transfectadas com genes pró-neurais mantinham uma morfologia ovóide e achatada (figura 14B e C), mantendo-se semelhantes à condição controle (figura 14A), e não expressavam a proteína neuronal Map2 (figura 14B''' e C''').



Figura 14: Expressão combinada de Sox2 com Ascl1 ou Neurog2 nas hCTM, na ausência de co-cultivo, não altera morfologia das células e expressão de Map2. Imunofluorescência das hCTM após 15 dias da transfecção com lipofectamina na ausência de co-cultivo. Dsred (vermelho), GFP (verde), Map2 (branco) e DAPI (azul). A, células transfectadas com controle-GFP e controle-Dsred; B, células transfectadas com Sox2-GFP e Ascl1-Dsred. C, células transfectadas com Sox2-GFP e Neurog2-Dsred.

Por outro lado, quando co-cultivadas na presença de células hipocampais após 15 dias da transfecção com fatores pró-neurais as hCTM adquiriram uma morfologia neuronal típica, caracterizada por corpo celular pequeno e extensão de processos longos e finos (figura 15B e C). Além disso, as hCTM passaram a expressar Map2 após 15 dias da transfecção concomitante de Sox2 e Ascl1 (figura 15B''') ou Sox2 e Neurog2 (figura 15C'''). Em contraste, na condição controle, as células permaneceram com morfologia ovóide e alongada (figura 15A, célula GFP e RFP positiva) e não expressaram Map2 (figura 15A'''), mesmo quando co-cultivadas com neurônios hipocampais (figura 15A''', seta branca indica neurônio do hipocampo, identificado pela ausência das proteínas repórteres e expressão de Map2).



Figura 15: Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações morfológicas e expressão de marcadores neuronais maduros, na presença de co-cultivo com hipocampo. Imunofluorescência das hCTM após 15 dias da transfecção química na presença de co-cultivo com células hipocampais. Dsred (vermelho), GFP (verde), Map2 (branco) e DAPI (azul). A, Exemplo de célula transfectada com plasmídeos codificando as proteínas repórteres GFP e Dsred. B-C, Exemplos de hCTM reprogramadas pela expressão de Sox2 e Ascl1 (B) ou Sox2 e Neurog2 (C). As setas amarelas indicam células transfectadas com morfologia neuronal

(GFP+/Dsred+/Map2+) e as setas brancas indicam neurônios hipocampais (GFP-/Dsred-/Map2+).

Cerca de 49% das células transfectadas com Sox2 e Ascl1 reprogramaram (figura 16, barra branca – desvio padrão 23,71; erro padrão 13,69; n=233 células transfectadas; 3 experimentos independentes), considerando aquisição de morfologia neuronal e expressão de Map2. Em média 34% das células reprogramaram 15 dias após a expressão de Sox2 e Neurog2 (figura 16, barra preta – desvio padrão 3,05; erro padrão 1,76; n=256 células transfectadas; 3 experimentos independentes). No entanto, na condição controle nenhuma célula foi encontrada com morfologia neuronal e expressão de Map2 (n=294 células transfectadas; 3 experimentos independentes). Estes dados mostram que a expressão concomitante de Sox2 com Ascl1 ou Neurog2 é suficiente para induzir a reprogramação das hCTM em neurônios, quando cocultivadas na presença de células hipocampais.

A ausência de células reprogramadas na condição controle descarta a possibilidade da reprogramação das hCTM com genes pró-neurais na presença de células do hipocampo ser decorrente de fusão celular. Além disso, a expressão de Map2 e aquisição de morfologia neuronal foram avaliadas através de microscopia confocal em objetivas de alta magnificação (40 ou 63%) e todas as células reprogramadas apresentaram apenas um núcleo, como pode ser observado pela marcação nuclear DAPI (figura 15B e C).



Figura 16: Eficiência média da reprogramação das hCTM em neurônios, na presença de co-cultivo com células hipocampais. Proporção de células transfectadas que reprogramaram com Sox2 e Ascl1 (barra branca) ou Sox2 e Neurog2 (barra preta). Média + erro padrão, n=3 experimentos independentes, teste de Mann Whitney.

No entanto, para excluir definitivamente a possibilidade de fusão celular entre as hCTM e os neurônios provenientes do hipocampo nós co-cultivamos as hCTM transfectadas com genes pró-neurais com astrócitos isolados do córtex de camundongos pós-natais. Ao longo do cultivo, nós observamos que as hCTM adquiriram morfologia neuronal após a expressão concomitante de Sox2 com Ascl1 ou Neurog2 (figura 17B e C), enquanto que na condição controle as células não sofreram alterações morfológicas (figura 17A). Além disso, após 15 dias da transfecção com genes pró-neurais as células apresentaram arborizações complexas e expressão de Map2 (figura 18B e C), enquanto células transfectadas com genes controles não apresentaram tais modificações (figura 18A). Estas observações excluem a possibilidade de fusão celular entre hCTM e neurônios pré-existentes no co-cultivo, confirmando a ideia de que a reprogramação neuronal das hCTM foi induzida pela expressão dos genes pró-neurais, tratando-se de uma reprogramação genética da hCTM.



Figura 17: **Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações morfológicas, na presença de co-cultivo com astrócitos.** hCTM 5 dias após a transfecção química na presença de co-cultivo com astrócitos corticais. Imagens em contraste de fase, Dsred (vermelho) e GFP (verde) A, Exemplo de célula transfectada com plasmídeos controles. **B-C**, Exemplos de hCTM reprogramadas pela expressão de Sox2 e Ascl1 (B) ou Sox2 e Neurog2 (C). As setas amarelas indicam células transfectadas com morfologia neuronal.



Figura 18: Expressão de genes pró-neurais nas hCTM induz alterações morfológicas, na presença de co-cultivo com astrócitos. Imunofluorescência das hCTM 15 dias após a transfecção, na presença de co-cultivo com astrócitos corticais. Dsred (vermelho), GFP (verde), e DAPI (azul). A, Exemplo de célula transfectada com plasmídeos codificando as proteínas repórteres GFP e Dsred. B-C, Exemplos de hCTM reprogramadas pela expressão de Sox2 e Ascl1 (B) ou Sox2 e Neurog2 (C).

Além da expressão do marcador pan-neuronal Map2, nós analisamos a expressão dos transportadores vesiculares do GABA (vGAT) e do glutamato (vGLUT1) nas hCTM reprogramadas com genes pró-neurais co-cultivadas com astrócitos corticais, para identificar o tipo de neurônio que foi gerado. Algumas células reprogramadas com Sox2 e Ascl1 (uma em dez células analisadas) expressaram vGAT 15 dias após a reprogramação neuronal (figura 19A), porem nenhuma célula nesta condição experimental foi encontrada expressando vGLUT1 (figura 19C). As células reprogramadas com Sox2 e Neurog2 não

expressaram nenhum dos transportadores vesiculares analisados, vGLUT1 e vGAT (figura 19B e D). Esses resultados devem ser interpretados reduzido cautelosamente, pois tamanho de uma vesícula 0 (de aproximadamente 50nm) dificulta a visualização da marcação mesmo através de imagens de microscopia confocal e objetivas de alto aumento (a figura 19 foi adquirida no confocal com a objetiva de 63X). Além disso, apesar das células apresentarem morfologia complexa e expressão de um marcador de neurônio maduro, Map2, com 15 dias in vitro é possível que o aparecimento dos transportadores vesiculares ocorra tardiamente. Por isso, seria interessante avaliar a expressão desses marcadores mais tarde nas hCTM reprogramadas.





Figura 19: Expressão de vGAT e vGLUT nas hCTM reprogramadas. Imunofluorescência das hCTM 15 dias após a transfecção, na presença de co-cultivo com astrócitos corticais. Dsred (vermelho), GFP (verde), vGAT ou vGLUT1 (branco) e DAPI (azul). **A**, Expressão de vGAT em célula transfectada com Sox2 e Ascl1. Note a presença da marcação nas vesículas (em branco) na região tracejada, esta região foi amplificada e teve os processos celulares coloridos artificialmente de roxo para facilitar a visualização; **B**, Ausência da expressão de vGAT em célula transfectada com Sox2 e Neurog2. **C-D** Ausência da expressão de vGLUT1 em célula transfectada com Sox2/Ascl1 (C) e Sox2/Neurog2 (D).

4. Conectividade entre os neurônios induzidos e hipocampais

Para verificar a atividade espontânea entre as células reprogramadas e os neurônios hipocampais nós usamos o indicador de cálcio Oregon Green. As células reprogramadas (figura 20C e D) exibiram influxos rápidos de cálcio (duração de cerca de 20ms na subida e 250ms no decaimento) semelhantes aos neurônios hipocampais em cultivo (figura 20A), avaliado através da variação na intensidade de fluorescência dividido pela fluorescência inicial. No entanto as células transfectadas com plasmídeos controles (figura 20B) não demonstraram este tipo de alteração na variação da intensidade de fluorescência. Na figura 20 podemos observar exemplos de cinco células em cada uma das condições experimentais (A, neurônios hipocampais, B, células transfectadas com plasmídeos controle, C, Sox2 e Ascl1; e D, Sox2 e Neurog2).



Figura 20: hCTM do cordão umbilical reprogramadas com genes pró-neurais se conectam com neurônios hipocampais in vitro. Os gráficos mostram a variação na intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência inicial (ΔF/F0) em função do tempo (s) provenientes do imageamento de cálcio com Oregon green 23 dias após a transfecção, na presença de co-cultivo com células hipocampais. A, células negativas para GFP e Dsred com morfologia neuronal, provenientes do hipocampo; **B-D**, hCTM transfectadas com plasmídeos controle (B), Sox2 e Ascl1 (C) e Sox2 e Neurog2 (D).

É importante salientar que algumas células reprogramadas, tanto com Sox2 e Ascl1 (figura 22) quanto Sox2 e Neurog2 (figura 23), apresentaram morfologia tipicamente neuronal, porém não exibiram influxos rápidos de cálcio durante o período analisado (células marcadas com seta azul escura na figura 22E e na figura 23D e E). Além disso, algumas células Dsred negativas com morfologia neuronal, provavelmente neurônios provenientes do hipocampo, também não apresentaram influxos rápidos de cálcio durante o imageamento (figura 21A até D).



Figura 21: hCTM transfectadas com plasmídeos controles não se conectam com neurônios hipocampais *in vitro*. Imageamento de cálcio com Oregon green 23 dias após a transfecção com plasmídeos controles na presença de co-cultivo com células hipocampais. Dsred (vermelho), Oregon green (Branco). As regiões de interesse foram delimitadas e são mostradas nas imagens (lado esquerdo) com suas respectivas cores, correspondentes aos traçados mostrados nos gráficos. Os gráficos mostram a variação na intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência inicial (Δ F/F0) em função do tempo (s).



Figura 22: hCTM reprogramadas com Ascl1 e Sox2 se conectam com neurônios hipocampais *in vitro*. Imageamento de cálcio com Oregon green 23 dias após a transfecção com Sox2 e Ascl1 na presença de co-cultivo com células hipocampais. Dsred (vermelho), Oregon green (Branco). As setas azuis escuras indicam as células reprogramadas (Dsred positivas) e as demais setas indicam as células hipocampais (Dsred negativas). As regiões de interesse foram delimitadas e são mostradas nas imagens (lado esquerdo) com suas respectivas cores, correspondentes aos traçados mostrados nos gráficos. Os gráficos mostram a variação na intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência inicial (Δ F/F0) em função do tempo (s).



Figura 23: hCTM reprogramadas com Sox2 e Neurog2 se conectam com neurônios hipocampais *in vitro*. Imageamento de cálcio com Oregon green 23 dias após a transfecção com Sox2 e Neurog2 na presença de co-cultivo com células hipocampais. Dsred (vermelho), Oregon green (Branco). As setas azuis escuras indicam as células reprogramadas (Dsred positivas) e as demais setas indicam as células hipocampais (Dsred negativas). As regiões de interesse foram delimitadas e são mostradas nas imagens (lado esquerdo) com suas respectivas cores, correspondentes aos traçados mostrados nos gráficos. Os gráficos mostram a variação na intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência inicial (Δ F/F0) em função do tempo (s).

Para compararmos quantitativamente a atividade elétrica nas células reprogramadas e nos neurônios primários isolados do hipocampo, nós medimos a variação máxima na intensidade de fluorescência apenas nas células que apresentaram influxo de cálcio espontâneo durante o período do imageamento (17 s). Comparando-se a variação máxima na intensidade de fluorescência entre as hCTM reprogramadas com genes pró-neurais e os neurônios hipocampais *in vitro*, não observamos diferenças significativas (figura 24). As células reprogramadas com Sox2 e Ascl1 apresentaram uma variação média de 39,66% (figura 24, barra cinza), já as células reprogramadas com Sox2 e Neurog2 apresentaram 33,05% (figura 24, barra azul) e os neurônios hipocampais exibiram variação de 60,83%. Enquanto que na condição controle a maior variação observada foi de 2,89%, com variação média de 1,1% (figura 24, barra preta), que é significativamente diferente das células reprogramadas com genes pró-neurais e dos neurônios hipocampais (teste de Kruskal-Wallis, p<0,0001, n=9 campos em cada condição, figura 24).



Figura 24: Influxo de cálcio nas hCTM reprogramadas com genes pró-neurais se assemelha ao observado em neurônios hipocampais *in vitro*. O gráfico mostra a variação na intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência inicial (Δ F/F0) nas células responsivas durante o imageamento de cálcio com Oregon green (média + erro padrão, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, n=9 campos em cada condição). São mostrados valores médios observados nas células negativas para GFP e Dsred com morfologia neuronal, provenientes do hipocampo (barra branca), células transfectadas com controles (barra preta), Sox2 e Ascl1 (barra cinza) e Sox2 e Neurog2 (barra azul).

Esses dados sugerem que as células reprogramadas apresentam atividade elétrica e são capazes de estabelecer sinapses. Porém, é necessário aferir a funcionalidade dessas células com métodos que avaliem diretamente as propriedades elétricas, como o registro eletrofisiológico intracelular.

5. Propriedades eletrofisiológicas dos neurônios induzidos

Para verificar diretamente se as hCTM foram reprogramadas em neurônios funcionais, nós registramos a atividade elétrica das células após expressão de Sox2+Ascl1 e Sox2+Neurog2 (16 e 21 dias após a transfecção, respectivamente). A figura 25 mostra exemplo de uma célula registrada, reprogramada com Sox2 e Ascl1. Esta célula apresentou um padrão de despolarizações repetitivas em consequência de uma injeção de corrente despolarizante (20pA), condizente com a capacidade de gerar potenciais de ação (figura 25C). Além disso, a célula foi capaz de despolarizar após receber uma corrente hiperpolarização, sugestivos de maturidade neuronal (figura 25C). Nós também registramos os potenciais pós-sinápticos excitatórios desta célula e, como mostrado na figura 25D, observamos que o neurônio reprogramado apresenta atividade sináptica espontânea, indicando que a célula recebe contatos sinápticos excitatórios de outras células presentes no cultivo.





Figura 25: Propriedades eletrofisiológicas de uma hCTM reprogramada em neurônio mediante expressão de Sox2 e Ascl1. A, Imagem de contraste de fase mostrando uma célula reprogramada (asterisco) e pipeta de registro intracelular. B, Expressão da proteína repórter Dsred na célula permite identificação das células transfectadas. C, Disparo de potencial de ação repetitivo em resposta a injeção de corrente despolarizante (20 pA) e após hiperpolarização (-20 pA). D, Potencial espontâneo pós-sináptico do neurônio induzido.

Nós registramos um total de 4 células transfectadas com Sox2 e Ascl1 (figura 26) e 8 células transfectadas com Sox2 e Neurog2 (figura 27 e 28). Todas as células que apresentavam morfologia típica neuronal dispararam quando foi aplicada uma corrente despolarizante (20pA, mostrado nas figuras 26, 27 e 28 com traçado vermelho) em ambas as condições, enquanto que células com morfologia fibroblastóide (célula 3 na figura 26) ou amorfas (terceira célula na figura 27 e 28), provavelmente em processo de morte celular, apresentaram somente propriedades passivas de membrana.



Figura 26: Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em neurônio mediante expressão de Sox2 e Ascl1. Respostas de quatro células transfectadas com Sox2 e Ascl1 a injeção de corrente despolarizante (20 pA) e após hiperpolarização (-20 pA). Observe que as células 1,2 e 4 apresentam morfologias típicas de neurônios e disparam potenciais de ação.



Figura 27: Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em neurônio mediante expressão de Sox2 e Neurog2. Respostas de quatro células transfectadas com Sox2 e Neurog2 a injeção de corrente despolarizante (20 pA) e após hiperpolarização (-20 pA). Observe que apenas a célula 3 que apresenta morfologia atípica, provavelmente em processo de morte celular, não gera potenciais de ação.



Figura 28: Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em neurônio mediante expressão de Sox2 e Neurog2. Respostas de quatro células transfectadas com Sox2 e Neurog2 em resposta a injeção de corrente despolarizante (20 pA) e após hiperpolarização (-20 pA). Observe que apenas a célula 3 não gera potenciais de ação.

O registro eletrofisiológico intracelular revelou que as hCTM reprogramadas apresentaram propriedades eletrofisiológicas de neurônios maduros, após a expressão concomitante de Sox2 e Neurog2 ou Sox2 e Ascl1. Entre as células com morfologia neuronal o potencial de repouso da membrana variou de -59 até -51, com valor médio de -55 (desvio=4,082; n=3 células) nas células reprogramadas com Sox2 e Ascl1, e ficou entre -50 e -74, com valor médio de -60 (desvio=7,968; n=6 células) nas células reprogramadas com Sox2 e Neurog2 (Tabela 2).

	Amplitude (mV)	Half-width (s)	Amplitude após hiperpolarização (mV)	Resistência de entrada (Mohm)	Potencial de repouso (mV)	Capacitância	
	70,1926	0,0020	-12,8178	540	-59	19	
Ascl1 + Sox2	78,7378	0,0021	-9,7659	1350	-58	22	
	-	-	-	1000	-52	31	
	62,9185	0,0026	-20,1422	850	-51	28	
Média ±	70,62 ±	0,002233 ±	-14.24 + 5.333	935 + 336 5	-55 + 4 082	25 ± 5,477	
desvio	7,918	0,0003215	1 1,2 1 2 0,000	000 - 000,0	00 _ 1,002		
Neurog2 + Sox2	88,5000	0,0027	-1,8311	317	-62	29	
	61,6400	0,0032	-2,4415	919	-74	32	
	88,1885	0,0138	-3,6622	419	-50	29	
	68,5220	0,0104	-14,0385	350	-56	31	
	184,3318	0,0015	-14,7911	270	-62	22	
	80,8700	0,0014	-18,9285	697	-61	21	
Média ±	95,34 ± 44,9	0,0055 ± 0,00527	-9,282 ± 7,48	495,3 ± 256,8	-60,95 ± 7,968	27,33 ± 4,676	
uesvio							

Tabela 2: Propriedades eletrofisiológicas das hCTM reprogramadas em neurônio mediante expressão de genes pró-neurais.

Em resumo, nossos dados mostram que as hCTM foram reprogramadas em neurônios funcionais após a expressão concomitante de Sox2 e Neurog2 ou Sox2 e Ascl1, os neurônios induzidos apresentaram propriedades eletrofisiológicas de neurônios maduros e foram capazes de se conectar com neurônios hipocampais *in vitro*.

V. DISCUSSÃO

A reprogramação direta de uma célula especializada em outro tipo celular usando fatores definidos tem se tornado uma estratégia para gerar células funcionais em estudos de terapias celulares. O tempo necessário para conversão funcional de um tipo celular em outro utilizando esta metodologia é menor, pois a reprogramação direta não passa por estágios intermediários de pluripotência ou progenitores. Além disso, a reprogramação direta torna essas células menos propícias a formação tumoral quando transplantadas.

A conversão direta de diferentes tipos celulares em neurônios funcionais tem se tornado uma alternativa para modelamento de doenças neurológicas e uma promessa para medicina regenerativa. Diversas fontes celulares e a combinação de fatores definidos necessários para induzir a reprogramação celular estão sendo identificados nos últimos anos, porem as pesquisas neste campo ainda enfrentam inúmeros desafios. São necessárias estratégias mais eficientes e com maior pureza na geração de um fenótipo celular específico e, fundamentalmente, deve-se garantir a geração de células funcionais.

Neste trabalho, nós demonstramos que a expressão combinada de dois genes pró-neurais é suficiente para reprogramar células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em neurônios funcionais de forma rápida e eficiente. Além disso, dados preliminares sugerem que esta reprogramação neuronal também é possível para células mesenquimais da medula óssea de camundongos.

Diferenciação das células da medula óssea de camundongos em tecidos mesenquimais

As CTM murinas isoladas da medula óssea de camundongos apresentaram alta capacidade proliferativa, estas células foram mantidas através de sucessivas passagens e congeladas para futuros experimentos. Isso permite que as CTM sejam boas candidatas para reprogramação, análises de larga escala e uso em terapias celulares. A capacidade dessas células de diferenciação em tecidos da linhagem mesodérmica tem sido bem documentada na literatura (Dominici et al., 2006; Horwitz, 2005), mediante determinadas condições de cultivo foi possível diferencia-las em tecidos ósseo e adiposo (figura 6 e 7). Esses dados mostram que as células isoladas consistem de uma população pura de células-tronco mesenquimais com capacidade multipotente. É importante avaliar o potencial de diferenciação das CTM isoladas, pois a medula óssea é composta por diversos tipos celulares e, portanto a caracterização da população em estudo permite a comparação com os resultados de outros trabalhos científicos.

Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CTM murinas em neurônios

As CTM são células-tronco multipotentes e tem capacidade de diferenciação nos tecidos de origem mesodérmica: ósseo, cartilaginoso e adiposo (Afanasyev et al., 2010). Estas células não tem capacidade de diferenciação em tecido neural, porem atualmente diversas técnicas de reprogramação celular foram descritas tornando possível a conversão de células somáticas de diversos tecidos adultos em uma célula de linhagem diferente ou mesmo em células-tronco pluripotentes (Marro et al., 2011; Takahashi e Yamanaka, 2006; Vierbuchen et al., 2010; Wernig et al., 2008). A fim de expandir o potencial de diferenciação das CTM nós avaliamos a possibilidade de reprogramação genética dessas células em neurônios através da expressão de genes pró-neurais.

Para induzir a reprogramação das mCTM em neurônios nós forçamos a expressão de Sox2 e Ascl1 (figura 8). Através de transfecção elétrica obtivemos uma eficiência de transfecção média de 26% (figura 9). A expressão combinada de Sox2 e Ascl1 foi suficiente para induzir alterações morfológicas indicativas de aquisição de fenótipo neuronal e a expressão de β-III tubulina nas mCTM na presença de co-cultivo com hipocampo (figura 11B). Porém, não foram encontradas células com morfologia neuronal após expressão de Sox2 e Ascl1 na ausência do co-cultivo com hipocampo (figura 10B). Esses resultados preliminares sugerem que os genes pró-neurais desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que culmina na aquisição do fenótipo neuronal das CTM apenas na presença de células hipocampais. Outra possibilidade é que as células hipocampais favoreçam a sobrevivência dos neurônios induzidos pela expressão de Sox2 e Ascl1 e, por isso, só foram encontradas CTM com morfologia e expressão de marcadores neuronais na presença do co-cultivo.

Entretanto, é primordial a realização de novos experimentos a fim de confirmar as alterações observadas, adicionalmente deve-se comparar o efeito da expressão desses genes separadamente, apenas Sox2 ou Ascl1. Além disso, é fundamental a avaliação eletrofisiológica para averiguar a funcionalidade dos neurônios induzidos.

3. Expressão de genes pró-neurais induz reprogramação das CTM humanas em neurônios

Para reprogramar as CTM humanas em neurônios nós forçamos a expressão de genes pró-neurais através da transfecção química com lipofectamina. Com este método de transfecção obtivemos uma eficiência de co-transfecção em torno de 95%. A escolha de um método com elevada taxa de co-transfecção foi importante para o desenvolvimento deste trabalho, pois pretendíamos induzir a reprogramação celular mediante expressão combinada de diferentes plasmídeos. A eletroporação não foi utilizada para transfecção das CTM humanas uma vez que este método apresentou elevada citotoxicidade para este tipo celular (dados não mostrados).

A fim de identificar os genes necessários para reprogramar as hCTM em neurônios, nós induzimos a expressão de Sox2 combinada com Ascl1 ou com Neurog2 e monitoramos as células através de um microscópio de fluorescência invertido. Nos primeiros dias de expressão desses genes nós começamos a observar alterações morfológicas nas hCTM co-cultivadas com astrócitos corticais (figura 17B e C) ou células hipocampais (figura 13B e C), como diminuição do corpo celular e extensão de processos. Enquanto na condição controle as células permaneceram com sua morfologia clássica alongada e fusiforme, nesta condição experimental as hCTM foram transfectadas com plasmídeos codificando apenas as proteínas fluorescentes repórteres GFP e Dsred (figuras 13A e 17A). Além das alterações morfológicas descritas, os genes pró-neurais induziram a expressão de Map2 nas hCTM após 15 dias da transfecção (figura 15B e C), o Map2 é expresso em neurônios maduros no sistema nervoso (Goedert et al., 1991).

Nossos dados mostram que a expressão combinada de Sox2 com Ascl1 ou Neurog2 é capaz de induzir a reprogramação de CTM humanas em neurônios na presença de astrócitos corticais ou células hipocampais. Uma possível explicação para este resultado é que a expressão desses fatores transcricionais pode dar início à reprogramação das CTM e fatores adicionais são necessários para completar o processo de aquisição do fenótipo neuronal, fatores estes provenientes das células do co-cultivo.

Outra hipótese é que essas células estejam auxiliando na maturação e na sobrevivência dos neurônios induzidos. A ocorrência da reprogramação celular na presença de astrócitos isolados demonstra a importância destes em particular. Notavelmente, é bem estabelecido na literatura que os astrócitos desempenham papel fundamental na formação sináptica e fornecem fatores tróficos críticos para os neurônios durante o desenvolvimento (Clarke e Barres, 2013).

Considerando a aquisição de morfologia neuronal e a expressão do marcador neuronal Map2 (figuras 15 e 18) em torno de 49% das CTM transfectadas com Sox2 e Ascl1 reprogramaram, e 34% reprogramaram após expressão de Sox2 e Neurog2 (figura 16). Porém, nenhuma célula foi encontrada com estas alterações na condição controle.

Além disso, nós investigamos o subtipo de neurônio formado a partir das diferentes combinações de fatores transcricionais utilizados neste trabalho. Nós observamos a expressão de vGAT em alguns neurônios reprogramados (uma em dez células analisadas) com Sox2 e Aslc1 (figura 19A), o que é consistente com os achados que mostram que a expressão de Alsc1 na eminência ganglionar é fundamental para formação de neurônios gabaérgicos durante o desenvolvimento do córtex (Bertrand et al., 2002; Fode et al., 2000; Guillemot et al., 1993; Johnson et al., 1990; Lo et al., 1991). Além do mais, já foi demonstrado que a expressão de Ascl1 desencadeia a reprogramação de astrócitos corticais de camundongos em neurônios gabaérgicos, o que ressalva a importância desse fator de transcrição na indução do fenótipo gabaérgico (Berninger et al., 2007; Heinrich et al., 2010).

Nós não observamos a expressão de vGLUT1 nos neurônios induzidos com Sox2 e Alsc1 (figura 19B), tampouco com Sox2 e Neurog2 (figura 19D). Considerando a função da Neurogegina2 no córtex em desenvolvimento nós esperaríamos induzir a formação de neurônios glutamatérgicos, consistentes com sua expressão no telencélafo dorsal durante o desenvolvimento cortical (Parras et al., 2002).

60

Nós avaliamos a expressão dos transportadores vesiculares do glutamato e do GABA nas hCTM reprogramadas após 15 dias de diferenciação neuronal, porém a expressão destas proteínas esta intimamente relacionada a formação sináptica, o que pode solicitar um tempo de maturação maior. Assim, análises adicionais são necessárias para confirmar a expressão dos transportadores vesiculares ou ausência desta marcação nas células reprogramadas, bem como avaliar a expressão de outros marcadores a fim de elucidar o subtipo de neurônio gerado e sua proporção.

4. Conectividade entre os neurônios induzidos e hipocampais

Nós investigamos se os neurônios induzidos eram capazes de se conectar com os neurônios hipocampais *in vitro* através do imageamento intracelular do cálcio. Cerca de três semanas após a expressão dos genes pró-neurais as CTM reprogramadas exibiram, espontaneamente, flutuações rápidas no transiente de cálcio semelhantes às observadas nos neurônios hipocampais. Enquanto que as CTM na condição controle não apresentaram esse tipo de resposta (figuras 20 e 24). Esses resultados indicam que os neurônios induzidos a partir das CTM reprogramadas com genes pró-neurais apresentam propriedades de neurônios funcionais, sendo capazes de se conectar com outros neurônios.

Além do mais, visivelmente as hCTM reprogramadas apresentaram um decaimento lento após as flutuações rápidas do cálcio quando comparadas com os neurônios hipocampais em cultivo, o que pode ser devido a diferenças na expressão de proteínas ligantes de cálcio, como por exemplo, calbindina, parvalbumina e calretinina.

O uso de indicadores de cálcio com a finalidade de estimar propriedades funcionais dos neurônios tem como principal vantagem a possibilidade de analisar várias células simultaneamente (Rosenberg e Spitzer, 2011). Porém, transientes de cálcio estão presentes em outros tipos de células, como astrócitos (Dani et al., 1992; Hirase et al., 2004; Volterra et al., 2014), e por isso, registro eletrofisiológico intracelular deve ser realizado para aferir a funcionalidade e o padrão de maturação dos neurônios induzidos.

5. Propriedades eletrofisiológicas dos neurônios induzidos

Para avaliar as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios induzidos, nós realizamos registro intracelular em 4 células transfectadas com Sox2 e Ascl1 e 8 células com Sox2 e Neurog2, que foram reconhecidas através da proteína fluorescente Dsred (figura 35B). Todas as células que apresentaram morfologia neuronal dispararam potenciais de ação em resposta a injeção de corrente despolarizante (3/4 com Sox2 e Ascl1 - figura 26, e 6/8 com Sox2 e Neurog2 figura 27 e 28). Além disso, foram observadas correntes pós-sinápticas excitatórias em 3/4 das células reprogramadas com Sox2 e Ascl1, e em 5/8 das células reprogramadas com Sox2 e Neurog2. Entre as células com morfologia neuronal o potencial de repouso da membrana foi em média -55 nas células reprogramadas com Sox2 e Ascl1 e -60 nas células reprogramadas com Sox2 e Neurog2 (Tabela 2), estes potenciais de repouso da membrana são similares aos reportados para outros neurônios induzidos (Caiazzo et al., 2011; Son et al., 2011; Vierbuchen et al., 2010). Os neurônios induzidos apresentaram resistência de entrada em média 935Mohm nas células reprogramadas com Sox2 e Ascl1 e 495Mohm nas células reprogramadas com Sox2 e Neurog2 (Tabela 2), valores elevados de resistência de entrada foram descritos para neurônios reprogramados a partir outras células (Chanda et al., 2014; Karow et al., 2012; Son et al., 2011; Vierbuchen et al., 2010).

Além disso, pelo menos uma célula em cada condição experimental apresentou quedas de voltagens consistentes com presença de influxo de correntes do tipo "*hyperpolarization-activated current I_h*" (célula 1 reprogramada com Sox2 e Ascl1 – figura 26, e célula 2 reprogramada com Sox2 e Neurog2 – figura 28), a presença de correntes I_h é um forte indicativo de que as células adquiriram uma identidade de neurônios maduros (Battefeld et al., 2012; Vasilyev e Barish, 2002).

Comparação dos trabalhos de reprogramação direta em neurônios com o nosso

Diversos estudos têm demonstrado a reprogramação direta de células humanas em neurônios funcionais. Novas metodologias de reprogramação celular estão sendo investigadas para acelerar o processo de maturação neuronal e aumentar a eficiência na geração de populações homogêneas quanto ao subtipo neuronal induzido (Broccoli et al., 2015). A utilização de pequenas moléculas que ativam vias de sinalizações relacionadas com o desenvolvimento das células neurais tem se tornado uma ferramenta eficaz neste sentido (Ladewig et al., 2012; Liu et al., 2013). Além disso, alguns trabalhos incluíram microRNAs (RNA não codificante envolvido com controle da expressão gênica) com altos níveis de expressão no cérebro de vertebrados e modificadores epigenéticos, como o VPA (ácido valpróico, um inibidor de histona deacetilase), no conjunto de fatores utilizados para induzir a reprogramação neuronal e aumentar a eficiência da reprogramação (Victor et al., 2014; Yoo et al., 2011).

Para facilitar a comparação do presente trabalho com os demais trabalhos disponíveis na literatura, nós compilamos os principais resultados dos estudos com reprogramação direta de células humanas em neurônios funcionais (tabela 3).

Célula reprogramada	Fenótipo adquirido	Fatores de reprogramação	Co-cultivo	Expressão de Map2/βIII (tempo em dias)	Sinapses funcionais (tempo em dias)	Pequenas moléculas e fatores neurotróficos	Eficiência da reprogramação	Pureza do subtipo neuronal	Referência
Fibroblasto pós- natal	Neurônio		Sem	23	47-51	cAMP, SB- 431542, noggin, LDN- 193189, CHIR99021	65% (βIII+/total) 147% (βIII+/células iniciais)	20% gabaérgico, 35% vGLUT1, 5% serotoninérgico	(Ladewig et al., 2012)
Sangue do cordão umbilical		ASCLI E NGNZ	Sem	44	44 (n=8 células)		(2 experimentos) 66% (βIII+/total) 105% (βIII+/células iniciais)	ND	
Fibroblasto pós- natal	Neurônio Neurônio	Ctip2, Dlx1, Dlx2,	Cultura primária de glia (rato)	35	42-84	VPA, dbc-AMP,	89%	90% gabaérgicos	(Victor et
Fibroblasto adulto		Mytl1, miR-9/9, miR-124	Transplante no estriado de camundongo (P0- 1)	14-30	112 (após transplante, n= 7 células)	AR, BDNF, NT- 3	82%	86% gabaérgicos	al., 2014)
Fibroblasto fetal	Neurônio glutamatérgico e motor	NGN2	Astrócito ou neurônios corticais	12-21	>50	Forskolin, Dorsomorphin, BDNF, NT-3, GDNF, FGF2	95%	90% glutamatérgico e 0,1% gabaérgico 90% colinérgico	(Liu et al., 2013)
Fibroblasto pós- natal e adulto	Neurônio	NGN2 e SOX11	ND	21	ND		77-93%	86,3% colinérgico	
Fibroblasto pós- natal	Neurônio dopaminérgico	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A, FOXA2	Sem	12-20	28	Sem	7%	10%	(Pfisterer
Fibroblasto embrionário	Neurônio glutamatérgico e gabaérgico	ASCL1, BRN2, MYT1L	Sem	24	30-32	Sem	16%	Mista	et al., 2011)
Fibroblasto fetal	Neurônio dopaminérgico	ASCL1, NGN2, SOX2, NURR1, PITX3	Sem	20	ND	Shh e FGF-8	2%	Dopaminérgico	(Liu et al., 2012)
Fibroblasto fetal e pós-natal	Neurônio glutamatérgico	ASCL1, BRN2, MYT1L, NEUROD1	Neurônios corticais de camundongo	14	28-35	Sem	2-4%	54% glutamatérgico	(Pang et al., 2011)

Resumo dos trabalhos com reprogramação direta de células humanas em diferentes subtipos neuronais

Célula reprogramada	Fenótipo adquirido	Fatores de reprogramação	Co-cultivo	Expressão de Map2/βIII (tempo em dias)	Sinapses funcionais (tempo em dias)	Pequenas moléculas e fatores neurotróficos	Eficiência da reprogramação	Pureza do subtipo neuronal	Referência
Fibroblasto pós- natal	Neurônio glutamatérgico	BRN2, MYT1L, miR-124	0	18	30	Noggin, bFGF, forkolin, BDNF, GDNF	4-8%	44% glutamatérgico 8% gabaérgico	(Ambasud
Fibroblasto adulto	Neurônio		Sem	18	25		6%	ND	2011)
Fibroblasto pós- natal	Neurônio glutamatérgico e gabaérgico	ASCL1, MYT1L, NEUROD2, miR- 9/9*, miR-124	ASCL1, MYT1L, Glia de NEUROD2, miR- camundorad	28	35-56	VPA, bFGF, dbc AMP, BDNF, NT3	80% (10% do número de células iniciais)	ND	(Yoo et al., 2011)
Fibroblasto adulto	Neurônio		ounandongo	42	42		ND (n=1 experimento)		
Fibroblasto fetal	Neurônio dopaminérgico	Ascl1, Lmx1a, Nurrl	Sem	18	24	Sem	10%	6% TH	(Caiazzo et al., 2011)
Fibroblasto fetal	Neurônio	Ascl1	Astrócito e hipocampo de camundongo	22	ND	Sem	ND	Glutamatérgico	(Chanda et al., 2014)
Fibroblasto fetal	Neurônio motor	Brn2, Ascl1, Myt1l, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2, Neurod1	Sem	30	30	Sem	ND	ND	(Son et al., 2011)
Fibroblasto derivado de iPS	Neurônio sensorial	Brn2 e Ngn2 ou Ngn1	Sem	14	>14	BDNF, NGF, GDNF	10%	Glutamatérgico e sensorial	(Blanchard et al., 2015)
Fibroblasto fetal	Neurônio glutamatérgico e gabaérgico	Ascl1, Brn2, Mytl1	Células gliais	15	48-90	BDNF, GDNF, CHIR99021, SB431542, I DN-193189	3%	Glutamatérgico e gabaérgico	(Pereira et
Fibroblasto fetal	Neurônio dopaminérgico	Ascl1, Brn2, Mytl1, Lmx1a, 1b, FoxA2, Otx2	Células gliais	12	ND	dbc-APM, AA, AR	ND	Dopaminérgico	al., 2014)
Fibroblasto adulto	Neurônio	Sox2, Ascl1, Mytl1	Sem	>21	>30	BDNF, CNTF, GDNF, NT3	10-15%	2% glutamatérgico 5% gabaérgico	(Wang et al., 2014)
Pericito	Neurônio	Sox2 e Ascl1	Córtex E14 de camundongo	35-42	39-47	Sem	28%	ND	(Karow et al., 2012)
Fibroblasto adulto	Neurônio	Ascl1, Mytl1, Ngn1, Isl2, Klf7	ND	ND	ND	BDNF, CNTF, GDNF, inibidor de TGFβ	5%	ND	(Wainger et al., 2014)
Célula-tronco mesenquimal humana	Neurônio	Sox2 e Ascl1 ou Sox2 e Ngn2	Astrócito e hipocampo de camundongo	15	16-23	Sem	49% (Sox2 e Ascl1) 34% (Sox2 e Ngn2)	ND	Nosso trabalho

Tabela 3: Resumo dos trabalhos com reprogramação direta de células humanas em neurônios. ND – não foi descrito, BDNF – brain-derived neurotrophic factor, CNTF – ciliary neurotrophic factor, GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, NGF – nerve growth fator, TGF β – transforming growth factor beta 1, NT3 – neurotrofina-3, AA – ácido ascórbico, AR – ácido retinoico, bFGF – Basic fibroblast growth factor, dbc AMP – dibutyryl adenosine 3:5-cyclic monophosphate, Shh – sonic hedgehog, cAMP - adenosina monofosfato cíclico, SB-431542 – inibidor de ALK (activin receptor-like kinase receptors), noggin – antagonista de BMP (bone morphogenic protein), LDN-193189 – inibidor do receptor de BMP (ALK2), CHIR99021 – inibidor de GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3), VPA – ácido valpróico, TH – Tirosina hidroxilase.

No presente trabalho, nós demonstramos a reprogramação direta das CTM isoladas do cordão umbilical de humanos em neurônios funcionais. Estas células passaram a expressar marcadores neuronais após 15 dias da expressão dos genes pró-neurais (cerca de 40%), e adquiriram propriedades eletrofisiológicas de neurônios maduros entre 16 e 23 dias. Comparando nossos

resultados com os demais trabalhos, as células-tronco mesenquimais humanas reprogramadas adquirem maturidade neuronal mais rapidamente do que as demais células estudadas (pericitos e fibroblastos).

Outra importante observação que pode ser inferida a partir desses dados e do nosso trabalho é a presença de co-cultivos durante reprogramação das células humanas em neurônios, seja com células gliais ou neurônios (Chanda et al., 2014; Karow et al., 2012; Liu et al., 2013; Pang et al., 2011; Pereira et al., 2014; Victor et al., 2014; Yoo et al., 2011). Isso evidencia a importância de células neurais na sobrevivência e maturação dos neurônios induzidos. Neste sentido, outra estratégia que tem sido usada nos trabalhos de reprogramação direta em neurônios é a utilização de fatores neurotróficos, como BDNF, GDNF, CTNF, NT-3, NGF, bFGF e FGF-8 (Ambasudhan et al., 2011; Blanchard et al., 2015; Liu et al., 2013, 2012; Pereira et al., 2014; Victor et al., 2014; Wainger et al., 2014; Wang et al., 2014; Yoo et al., 2011). Nós não adicionamos esses fatores nas condições de cultivo das CTM reprogramadas porém eles podem estar sendo produzidos e liberados pelas células neurais do co-cultivo, promovendo assim a sobrevivência dos neurônios induzidos.

A maioria dos estudos publicados com células humanas utilizou fibroblastos isolados de recém-nascidos ou feto, o que pode ser uma limitação visando a utilização dessas células para uso em transplantes autólogos e para o desenvolvimento de modelo de doenças neurológicas. Neste sentido as hCTM apresentam como vantagem maior plasticidade celular, facilidade durante o isolamento sem riscos para o paciente e atualmente estas células estão disponíveis em diversos bancos de células.

Os únicos trabalhos publicados com reprogramação de células do cordão umbilical humano em neurônio foram realizados de forma indireta, passando por estágios intermediários de diferenciação (Giorgetti et al., 2012; Ladewig et al., 2012). O trabalho de Giorgetti e colaboradores (2012) demonstrou a conversão de células do sangue do cordão (célula-tronco hematopoiética CD133+) em progenitores neurais através da expressão ectópica de SOX2 e c-Myc, com esta metodologia foram necessários 7-9 semanas em cultivo para obtenção de neurônios. Apesar do trabalho de Ladewig e colaboradores descrever um método de reprogramação direta em neurônios a partir de fibroblastos ou células do cordão umbilical, mediante expressão de Ascl1 e Neurog2, seus dados

65

arguem contra esta ideia pois são obtidas eficiências de reprogramação maiores do que 100% considerando o número de células iniciais, o que indica proliferação celular durante o cultivo. Além disso, são necessários mais do que 6 semanas para obtenção de neurônios. No nosso trabalho, nós observamos que após a expressão de genes pró-neurais as hCTM do cordão umbilical rapidamente começam a adquirir mudanças morfológicas consistentes com aquisição do fenótipo neuronal e foram necessários apenas 2-3 semanas para obtenção de neurônios funcionais. Esses resultados sugerem que as hCTM foram reprogramadas diretamente em neurônios, sem passar por estágios intermediários. Porém, a fim de confirmar esta hipótese, são necessárias análises diretas acerca da proliferação celular ao longo da reprogramação dessas células, como por exemplo, através da incorporação de um análogo de timina (como o BrdU) nos primeiros dias da reprogramação celular ou da realização de vídeo microscopia de tempo intervalado.

A reprogramação direta em uma população homogênea de determinado subtipo neuronal tem se tornado um dos maiores desafios dessa metodologia. Os fatores necessários para a reprogramação em subtipos neuronais específicos ainda não foram elucidados e, principalmente, estes fatores parecem variar dependendo da célula a ser reprogramada e da espécie em questão (Broccoli et al., 2015). Neste sentido, experimentos estão sendo conduzidos atualmente em nosso laboratório para avaliar os fenótipos dos neurônios gerado a partir da reprogramação das hCTM com diferentes combinações de genes pró-neurais, Sox2 e Ascl1 ou Sox2 e Neurog2.

VI. CONCLUSÃO

No presente estudo, nós descrevemos a primeira evidência de reprogramação direta de CTM do cordão umbilical humano em neurônios funcionais. Nós demonstramos um método de reprogramação rápido e eficiente para geração de neurônios humanos funcionais *in vitro*.

Nós demonstramos que (1) as células isoladas da medula óssea de camundongos apresentam alta capacidade de renovação e são capazes de gerar células de tecidos mesodérmicos e, portanto são células-tronco mesenquimais; (2) a combinação de genes pró-neurais, Sox2 com Ascl1 ou Neurog2, e a presença de células neurais é capaz de induzir a reprogramação das CTM humanas e de camundongos em neurônios; (3) após a expressão desses fatores de transcrição as CTM expressam marcadores neuronais, como βIII-tubulina e Map2; e por fim, (4) que os neurônios induzidos a partir das hCTM apresentam propriedades eletrofisiológicas de neurônios maduros.

REFERÊNCIAS

Addis, R.C., Hsu, F.-C., Wright, R.L., Dichter, M. a, Coulter, D. a, e Gearhart, J.D. (2011). Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector. PLoS One *6*, e28719–e28719.

Afanasyev, B. V, Elstner, E.E., e Zander, A.R. (2010). A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *1*, 35–38.

Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., e Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature *425*, 968–973.

Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S.A., e Ding, S. (2011). Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions. Cell Stem Cell *9*, 113–118.

Armulik, A., Genové, G., e Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. Dev. Cell *21*, 193–215.

Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I., e Smith, A. (2002). Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. Nat. Biotechnol. *20*, 1240–1245.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., e Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev. *17*, 126–140.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., e Gottlied, D.I. (1995). Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. Dev. Biol. *168*, 342–357.

Battefeld, A., Rocha, N., Stadler, K., Bräuer, A.U., e Strauss, U. (2012). Distinct perinatal features of the hyperpolarization-activated non-selective cation current Ih in the rat cortical plate. Neural Dev. *7*, 21.

Berninger, B., Costa, M.R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B., e Götz, M. (2007). Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. J. Neurosci. *27*, 8654–8664.

Bertani, N., Malatesta, P., Volpi, G., Sonego, P., e Perris, R. (2005). Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. J. Cell Sci. *118*, 3925–3936.

Bertrand, N., Castro, D.S., e Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. Nat. Rev. Neurosci. *3*, 517–530.

Bibel, M., Richter, J., Lacroix, E., e Barde, Y.-A. (2007). Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. Nat. Protoc. *2*, 1034–1043.

Blanchard, J.W., Eade, K.T., Szűcs, A., Lo Sardo, V., Tsunemoto, R.K., Williams, D., Sanna, P.P., e Baldwin, K.K. (2015). Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons. Nat. Neurosci. *18*, 25–35.

Blau, H.M., Chiu, C.-P., e Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. Cell *32*, 1171–1180.

Blum, R., Heinrich, C., Sánchez, R., Lepier, A., Gundelfinger, E.D., Berninger, B., e Götz, M. (2011). Neuronal network formation from reprogrammed early postnatal rat cortical glial cells. Cereb. Cortex *21*, 413–424.

Briggs, R., e King, T.J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. *38*, 455–463.

Broccoli, V., Rubio, a., Taverna, S., e Yekhlef, L. (2015). Overcoming the hurdles for a reproducible generation of human functionally mature reprogrammed neurons. Exp. Biol. Med. 1–8.

Buzanska, L., Machaj, E., Zablocka, B., Pojda, Z., e Domanska-Janik (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. J. Cell Sci.

Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretskova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. Nature *476*, 224–227.

Can, A., e Karahuseyinoglu, S. (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells *25*, 2886–2895.

Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res. 9, 641–650.

Chan, S.S.-K., e Kyba, M. (2013). What is a Master Regulator? J. Stem Cell Res. Ther. 03.

Chanda, S., Ang, C.E., Davila, J., Pak, C., Mall, M., Lee, Q.Y., Ahlenius, H., Jung, S.W., Südhof, T.C., e Wernig, M. (2014). Generation of Induced Neuronal Cells by the Single Reprogramming Factor ASCL1. Stem Cell Reports *3*, 282–296.

Clarke, L.E., e Barres, B. a (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 311–321.

Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlström, H., Lendahl, U., e Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. Science (80-.). 288, 1660–1663.

Colman, A., e Dreesen, O. (2009). Pluripotent Stem Cells and Disease Modeling. Cell Stem Cell 5, 244–247.

Cornélio, D.A. (2012). Análise da estabilidade genética de células-tronco mesenquimais humanas Análise da estabilidade genética de células-tronco mesenquimais humanas.

Costa, M.R., Bucholz, O., e Schroeder, T. (2009). Late Origin of Glia-Restricted Progenitors in the Developing Mouse Cerebral Cortex. Cereb. Cortex 135–143.

Dani, J.W., Chernjavsky, a., e Smith, S.J. (1992). Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. Neuron *8*, 429–440.

Davis, R.L., Weintraub, H., e Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell *51*, 987–1000.

Ding, D.-C., Shyu, W.-C., e Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 20, 5–14.

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

Duarte, D.M., Cornélio, D. a, Corado, C., Medeiros, V.K., da Costa Xavier de Araújo, L. a, Cavalvanti, G.B., e de Medeiros, S.R. (2012). Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. Regen. Med. *7*, 147–157.

Fallahi-Sichani, M., Soleimani, M., Najafi, S.M.A., Kiani, J., Arefian, E., e Atashi, A. (2007). In vitro differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine-associated genes into neuron-like cells. Cell Biol. Int. *31*, 299–303.

Fan, C.-G., Zhang, Q., e Zhou, J. (2011). Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. Stem Cell Rev. 7, 195–207.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.-L., Anderson, D.J., e Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. Genes Dev. *14*, 67–80.

Fraichard, a, Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., e Samarut, J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J. Cell Sci. *108 (Pt 1*, 3181–3188.

Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., Raya, A., Boué, S., Barrero, M.J., Corbella, B.A., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood Using OCT4 and SOX2. Cell Stem Cell *5*, 353–357.

Giorgetti, A., Marchetto, M.C.N., Li, M., Yu, D., Fazzina, R., Mu, Y., Adamo, A., Paramonov, I., Cardoso, J.C., Monasterio, M.B., et al. (2012). Cord blood-derived neuronal cells by ectopic expression of Sox2 and c-Myc. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 12556–12561.

Goedert, M., Crowther, R. a, e Garner, C.C. (1991). Molecular characterization of microtubuleassociated proteins tau and MAP2. Trends Neurosci. *14*, 193–199.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., e Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron *39*, 749–765.

Greschat, S., Schira, J., Küry, P., Rosenbaum, C., Angelica, M., Silva, D.E.S., Kögler, G., Wernet, P., e Müller, H.W. (2008). Unrestricted Somatic Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood Can be Differentiated into Neurons with a Dopaminergic Phenotype. *232*, 221–232.

Guillemot, F. (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. Curr. Opin. Cell Biol. *17*, 639–647.

Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, a, Anderson, D.J., e Joyner, a L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. Cell *75*, 463–476.

Gurdon, J.B. (2006). From Nuclear Transfer to Nuclear Reprogramming: The Reversal of Cell Differentiation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22, 1–22.

Gurdon, J.B., Elsdale, T.R., e Fischberg, M. (1958). Sexually mature individuals of Xenopus laevis from the transplantation of single somatic nuclei. Nature *182*, 64–65.

Halder, G., Callaerts, P., e Gehring, W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. Science (80-.). 267, 1788–1792.

Hansen, D. V, Rubenstein, J.L.R., e Kriegstein, A.R. (2011). Review Deriving Excitatory Neurons of the Neocortex from Pluripotent Stem Cells. Neuron *70*, 645–660.

Harichandan, A., e Bühring, H.-J. (2011). Prospective isolation of human MSC. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 24, 25–36.

Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., e Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun. Signal. *9*, 12.

Heinrich, C., Blum, R., Gasco, S., Masserdotti, G., Tripathi, P., Tiedt, S., Schroeder, T., Go, M., e Sa, R. (2010). Directing Astroglia from the Cerebral Cortex into Subtype Specific Functional Neurons. PLoS Biol. *8*.

Hirase, H., Qian, L., Barthó, P., e Buzsáki, G. (2004). Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. PLoS Biol. 2, 494–499.

Horwitz, et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.

Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., e Kageyama, R. (2013). Oscillatory Control of Factors Determining Multipotency and Fate in Mouse Neural Progenitors. Science (80-.). *342*, 1203–1208.

Jang, Y.K., Park, J.J., Lee, M.C., Yoon, B.H., Yang, Y.S., Yang, S.E., Kim, S.U., e Blood, C. (2004). Retinoic Acid-Mediated Induction of Neurons and Glial Cells From Human Umbilical Cord-Derived Hematopoietic Stem Cells. *584*, 573–584.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature *418*, 41–49.

Johnson, J.E., Birren, S.J., e Anderson, D.J. (1990). Two rat homologues of Drosophila achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. Nature *346*, 858–861.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J., e Ohsawa, R. (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. Exp. Cell Res. *306*, 343–348.

Karahuseyinoglu, et al. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma : In Situ and In Vitro Surveys. 319–331.
Karow, M., Sánchez, R., Schichor, C., Masserdotti, G., Ortega, F., Heinrich, C., Gascón, S., Khan, M. a, Lie, D.C., Dellavalle, A., et al. (2012). Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. Cell Stem Cell *11*, 471–476.

Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. Cell Stem Cell 10, 709-716.

Kim, J., Lengner, C.J., Kirak, O., Hanna, J., Cassady, J.P., Lodato, M.A., Wu, S., Faddah, D.A., Steine, E.J., Gao, Q., et al. (2011a). Reprogramming of Postnatal Neurons into Induced Pluripotent Stem Cells by Defined Factors. Stem Cells *29*, 992–1000.

Kim, J., Su, S.C., Wang, H., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Lodato, M. a., Lengner, C.J., Chung, C.Y., Dawlaty, M.M., Tsai, L.H., et al. (2011b). Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. Cell Stem Cell *9*, 413–419.

Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., e Schöler, H.R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. Nature *461*, 649–3.

Kögler, G., Sensken, S., Airey, J. a, Trapp, T., Müschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V, Fischer, J., Rosenbaum, C., et al. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J. Exp. Med. *200*, 123–135.

Krabbe, C., Zimmer, J., e Meyer, M. (2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. APMIS *113*, 831–844.

Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F.-J., et al. (2012). Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. Nat. Methods *9*, 575–578.

Leão, R.N., Reis, A., Emirandetti, A., Lewicka, M., Hermanson, O., e Fisahn, A. (2010). A voltage-sensitive dye-based assay for the identification of differentiated neurons derived from embryonic neural stem cell cultures. PLoS One *5*.

Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., e McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. *18*, 675–679.

Liu, M.L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J.C., Gibson, J.R., Huber, K.M., e Zhang, C.L. (2013). Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. Nat Commun *4*, 2183.

Liu, X., Li, F., Stubblefield, E. a, Blanchard, B., Richards, T.L., Larson, G. a, He, Y., Huang, Q., Tan, A.-C., Zhang, D., et al. (2012). Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. Cell Res. *22*, 321–332.

Lo, L.C., Johnson, J.E., Wuenschell, C.W., Saito, T., e Anderson, D.J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. Genes Dev. *5*, 1524–1537.

Lu, P., Blesch, A., e Tuszynski, M.H. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? J. Neurosci. Res. 77, 174–191.

Marro, S., Pang, Z.P., Yang, N., Tsai, M.-C., Qu, K., Chang, H.Y., Südhof, T.C., e Wernig, M. (2011). Direct Lineage Conversion of Terminally Differentiated Hepatocytes to Functional Neurons. Cell Stem Cell *9*, 374–382.

Meirelles, L.D.S., e Nardi, N.B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br. J. Haematol. *123*, 702–711.

Mihelec, M., St Heaps, L., Flaherty, M., Billson, F., Rudduck, C., Tam, P.P.L., Grigg, J.R., Peters, G.B., e Jamieson, R. V (2008). Chromosomal rearrangements and novel genes in disorders of eye development, cataract and glaucoma. Twin Res. Hum. Genet. *11*, 412–421.

Mitchell, K.E. (2003). Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. Stem Cell 50– 60.

Morrison, S.J., e Spradling, A.C. (2008). Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. Cell *13*2, 598–611.

Morrison, S.J., Shah, N.M., e Anderson, D.J. (1997). Regulatory Mechanism in stem cell biology. Cell *88*, 287–298.

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

Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A., e Fischer, I. (2004). Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. J. Neurosci. Res. 77, 192–204.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., e Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell *95*, 379–391.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., e Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. Neuron 29, 401–413.

Noisa, P., Ramasamy, T.S., Lamont, F.R., Yu, J.S.L., Sheldon, M.J., Russell, A., Jin, X., e Cui, W. (2012). Identification and characterisation of the early differentiating cells in neural differentiation of human embryonic stem cells. PLoS One *7*, e37129.

Pang, Z.P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D.R., Yang, T.Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T.C., et al. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. Nature.

Parras, C.M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D.J., e Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. 324–338.

Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R.P., e Gurdon, J.B. (2011). Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. Trends Genet. *27*, 516–525.

Peljto, M., e Wichterle, H. (2011). Programming embryonic stem cells to neuronal subtypes. Curr. Opin. Neurobiol. *21*, 43–51.

Pereira, M., Pfisterer, U., Rylander, D., Torper, O., Lau, S., Lundblad, M., Grealish, S., e Parmar, M. (2014). Highly efficient generation of induced neurons from human fibroblasts that survive transplantation into the adult rat brain. Sci. Rep. 1–10.

Petsa, A., Gargani, S., Felesakis, A., Grigoriadis, N., e Grigoriadis, I. (2009). Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. *45*, 573–576.

Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., e Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 10343–10348.

Phinney, D.G., Kopen, G., Isaacson, R.L., e Prockop, D.J. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J. Cell. Biochem. *7*2, 570–585.

Rohwedel, J., Guan, K., e Wobus, a M. (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. Cells. Tissues. Organs *165*, 190–202.

ROMANOV, YURI A SVINTSITSKAYA, VERONIKA A SMIRNOV, V.N. (2003). Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. Stem Cell 105–110.

Rosenberg, S.S., e Spitzer, N.C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*, 1–13.

Ross, S.E., Greenberg, M.E., e Stiles, C.D. (2003). Basic Helix-Loop-Helix Factors in Cortical Development. Neuron *39*, 13–25.

Sanchez-ramos, J.R., Song, S., Kamath, S.G., Zigova, T., Willing, A., Cardozo-pelaez, F., Stedeford, T., Chopp, M., e Sanberg, P.R. (2001). Expression of Neural Markers in Human Umbilical Cord Blood. *115*, 109–115.

Schneider, R.K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., Pérez-Bouza, A., e Neuss, S. (2010). The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. Biomaterials *31*, 467–480. Sheng, C., Zheng, Q., Wu, J., Xu, Z., Sang, L., Wang, L., Guo, C., Zhu, W., Tong, M., Liu, L., et al. (2012). Generation of dopaminergic neurons directly from mouse fibroblasts and fibroblast-derived neural progenitors. Cell Res. *22*, 769–772.

Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C., e Livesey, F.J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. Nat. Neurosci. *15*, 477–486, S1.

Soleimani, M., e Nadri, S. (2009). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nat. Protoc. *4*, 102–106.

Son, E.Y., Ichida, J.K., Wainger, B.J., Toma, J.S., Rafuse, V.F., Woolf, C.J., e Eggan, K. (2011). Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons. Cell Stem Cell *9*, 205–218.

Sterneckert, J.L., Reinhardt, P., e Schöler, H.R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. Nat. Rev. Genet. *15*, 625–639.

Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J., e Wobus, a M. (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. Mech. Dev. *53*, 275–287.

Takahashi, K., e Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell *126*, 663–676.

Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., e Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature *416*, 542–545.

Tio, M., Tan, K.H., Lee, W., Wang, T.T., e Udolph, G. (2010). Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. PLoS One *5*, e9398.

Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., e Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete–scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. EMBO J. *19*, 5460–5472.

Troyer, D.L., e Weiss, M.L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells *26*, 591–599.

Vasilyev, D. V, e Barish, M.E. (2002). Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current Ih in mouse hippocampal pyramidal neurons. J. Neurosci. 22, 8992–9004.

Vassilopoulos, G., Wang, P.-R., e Russell, D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature *422*, 901–904.

Victor, M.B., Richner, M., Hermanstyne, T.O., Ransdell, J.L., Sobieski, C., Deng, P., Klyachko, V.A., Nerbonne, J.M., e Yoo, A.S. (2014). Generation of Human Striatal Neurons by MicroRNA-Dependent Direct Conversion of Fibroblasts. NeuroResource 311–323.

Vierbuchen, T., e Wernig, M. (2012). Molecular Roadblocks for Cellular Reprogramming. Mol. Cell *47*, 827–838.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., e Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature *463*, 1035–1041.

Volterra, A., Liaudet, N., e Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca(2+) signalling: an unexpected complexity. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 327–335.

Wainger, B.J., Buttermore, E.D., Oliveira, J.T., Mellin, C., Lee, S., Saber, W.A., Wang, A.J., Ichida, J.K., Chiu, I.M., Barrett, L., et al. (2014). Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts. Nat. Neurosci. *18*, 17–24.

Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., Fu, Y.-S., Lai, M.-C., e Chen, C.-C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 22, 1330–1337.

Wang, P., Liang, X., Yi, J., e Zhang, Q. (2008). Novel SOX2 mutation associated with ocular coloboma in a Chinese family. Arch. Ophthalmol. *126*, 709–713.

Wang, P., Zhang, H.L., Li, W., Sha, H., Xu, C., Yao, L., Tang, Q., Tang, H., Chen, L., e Zhu, J. (2014). Generation of patient-specific induced neuronal cells using a direct reprogramming strategy. Stem Cells Dev. *23*, 16–23.

Wang, T.T., Tio, M., Lee, W., Beerheide, W., e Udolph, G. (2007). Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA. Biochem. Biophys. Res. Commun. *357*, 1021–1027.

Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., e Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bonemarrow-derived hepatocytes. Nature *422*, 897–901.

Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., e Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 5856–5861.

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

Xu, J., Du, Y., e Deng, H. (2015). Direct Lineage Reprogramming: Strategies, Mechanisms, and Applications. Cell Stem Cell *16*, 119–134.

Xue, Y., Ouyang, K., Huang, J., Zhou, Y., Ouyang, H., Li, H., Wang, G., Wu, Q., Wei, C., Bi, Y., et al. (2013). Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated MicroRNA circuits. Cell *152*, 82–96.

Yamanaka, S., e Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. Nature *465*, 704–712.

Ying, Q.-L., Nichols, J., Evans, E.P., e Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. Nature *416*, 545–548.

Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W., e Crabtree, G.R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. Nature *476*, 228–231.

Yu, J., e Thomson, J. a (2008). Pluripotent stem cell lines. Genes Dev. 22, 1987-1997.

Zhu, H., Guo, Z.-K., Jiang, X.-X., Li, H., Wang, X.-Y., Yao, H.-Y., Zhang, Y., e Mao, N. (2010). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. Nat. Protoc. *5*, 550–560.