

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral

Paloma de Alvarenga Côrtes

**IMUNOFENOTIPAGEM DE PRECURSORES NEURAIIS
DIFERENCIADOS *IN VITRO* A PARTIR DE CÉLULAS-
TRONCO EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGOS**

**Belo Horizonte
2010**

Paloma de Alvarenga Côrtes

**IMUNOFENOTIPAGEM DE PRECURSORES NEURAIIS
DIFERENCIADOS *IN VITRO* A PARTIR DE CÉLULAS-
TRONCO EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Geral da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Patologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes

Coorientador: Dr. Rubens Lene Carvalho Tavares

**Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
2010**

AGRADECIMENTOS

À professora Rosa e ao Dr. Rubens, pela oportunidade e confiança, que, por fim, me proporcionaram enorme aprendizado.

À toda equipe do NIPE – alunos, professores e funcionários – que estiveram presentes na minha vida acadêmica desde os tempos de minha graduação e tiveram papel importante também durante a realização do mestrado.

À minha família e aos amigos pela compreensão, ajuda e paciência.

E a todos que me ajudaram de alguma forma – Muito obrigada!

*“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa
que fez tua rosa tão especial.”
Antoine de Saint-Exupéry*

COLABORADORES e FINANCIADORES

Esse trabalho contou com os seguintes colaboradores e financiadores:

Prof. Dr. AROLDO FERNANDO CAMARGOS, Prof. Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG;

Bayer-Schering-Pharma;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Diante da promessa de cura de diversas doenças as pesquisas com células-tronco estão em franca expansão. As células-tronco embrionárias tem sido foco de estudos por serem uma fonte promissora para terapia celular, já que proliferam sem limites, respondem a sinais moleculares e são facilmente acessíveis à manipulação genética. Tendo em vista a diferenciação destas células em precursores neurais e em neurônios maduros, com intuito de obter material para tratamento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson, um protocolo de cinco passos foi descrito na literatura e vem sendo amplamente estudado. No presente estudo adaptamos este protocolo com algumas modificações, acompanhamos a diferenciação fenotípica *in vitro* de uma nova linhagem de célula-tronco embrionária (CT-4) isolada no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG através de imunofenotipagem, objetivando uma alta taxa de diferenciação das mesmas em neurônios Tirosina Hidroxilase positivos. Constatamos que a porcentagem de células indiferenciadas (SSEA-1+) reduziu substancialmente ao longo dos estágios, sendo $1,67 \pm 0,11\%$ do total das células ao final do estágio 5. Os precursores neurais (nestina+) também reduziram progressivamente nos estágios de diferenciação (entre os estágios 3 e 5), enquanto a expressão de marcadores pan-neuronal (PGP) e de neurônios dopaminérgicos (TH) permaneceram praticamente estáveis, variando entre $19,58 \pm 2,49$ a $20,8 \pm 1,95\%$ e $12,2 \pm 1,53$ a $11,95 \pm 1,52\%$, respectivamente. Dessa forma, consideramos que nosso protocolo favoreceu a diferenciação terminal (neuronal), em detrimento da proliferação de precursores neurais, o que pode ter reduzido o número de neurônios dopaminérgicos ao final do cultivo.

ABSTRACT

Embryonic stem cells has been the focus of studies because they are a promising source for cell therapy, since they proliferate without limits, respond to molecular signals and are easily accessible to genetic manipulation. In order to differentiate these cells into neural precursors and mature neurons, to obtain material for treatment of neurodegenerative diseases like Parkinson's disease, a five-step protocol was described in the literature and has been widely studied. In this study we intend to manipulate the current protocols, controlling the differentiation phenotype *in vitro* of a new line of embryonic stem cell (CT-4) isolated at Laboratório de Reprodução Humana Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos, Hospital das Clínicas, UFMG by immuno-phenotyping, to obtain a high rate of Tيروسine Hidroxilase-positive neurons.

The percentage of undifferentiated cells (SSEA-1+) decreased substantially along the stages and at stage 5 less than 2% of total cells were SSEA-1+. The neural precursors (nestin-positive) also decreased gradually in the stages of differentiation (between stages 3 and 5), whereas the expression of pan-neuronal (PGP) and dopaminergic neurons (TH) markers remained virtually stable, at 20% and 10% respectively.

Our protocol has promoted terminal differentiation (neuronal) instead of proliferation of neural precursors, which may have reduced the number of dopaminergic neurons at the end.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Porcentagem de células marcadas contra os anticorpos anti-SSEA-1, anti-nestina, anti- β -III tubulina, anti-PGP e anti-TH nos estágios 1, 3, 4 e 5 do nosso protocolo de diferenciação. Foram analisadas 3-6 lamínulas obtidas de pelo menos 3 experimentos repetidos para cada anticorpo, em cada um dos estágios.	58
Gráfico 2	Porcentagem de células SSEA-1+ nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas desde o primeiro estágio até o último. N=54 campos obtidos a partir de 3-6 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao 3, ao 4 e ao 5, estágio 3 em relação ao 5, e estágio 4 em relação ao 5; ** $p < 0,001$ estágio 3 em relação ao 4. Teste de Friedman e pós teste Dunn.	59
Gráfico 3	Porcentagem de células marcadas positivamente contra o anticorpo anti-nestina nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais e no decorrer da diferenciação. N=56 campos obtidos a partir de 3-5 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5, e estágio 3 em relação ao 4 e ao 5, e estágio 4 em relação ao 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.	60
Gráfico 4	Porcentagem de células marcadas positivamente pelo anticorpo anti- β III tubulina nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais. Entre os estágios 3 a 5 observa-se que a porcentagem de células positivas permanece praticamente inalterada. N=53 campos obtidos a partir de 3-4 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.	61
Gráfico 5	Porcentagem de células PGP+ nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais. Entre os estágios de diferenciação neural/neuronal observa-se uma tendência à estabilidade do número de células PGP+ a despeito das diferenças estatísticas no aumento do número de células marcadas entre os estágios 3 e 4 e na redução de positividade entre os estágios 4 e 5. N=58 campos obtidos a partir de 3-5 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5; ** $p < 0,001$ estágio 3 em relação ao 4, e estágio 4 em relação ao 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.	62
Gráfico 6	Porcentagem de células TH+ nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais. Entre os estágios de diferenciação neural/neuronal observa-se uma tendência à estabilidade do número de células TH+ a despeito das diferenças estatísticas observadas entre os estágios 3 e 4, e 4 e 5. N=64 campos obtidos a partir de 3-5 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5, estágio 3 em relação ao 4, e estágio 4 em relação ao 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto geral da cultura nos estágios 1, 2, 3, 4 e 5.	45
Figura 2	Aspecto da imunofenotipagem do anticorpo anti-SSEA-1	48
Figura 3	Aspecto da imunofenotipagem do anticorpo anti-nestina	51
Figura 4	Aspecto da imunofenotipagem do anticorpo anti- β -III tubulina	52
Figura 5	Aspecto da imunofenotipagem do anticorpo anti-PGP	55
Figura 6	Aspecto da imunofenotipagem do anticorpo anti-TH	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação dos protocolos de diferenciação de CTE em neurônios	26
Quadro 2	Nomenclatura, Composição e utilização dos meios de cultura	29
Quadro 3	Caracterização dos anticorpos primários e secundários utilizados nas imunocitoquímicas	37
Quadro 4	Caracterização da presença ou ausência dos marcadores nos progressivos estágios de diferenciação	47
Quadro 5	Resultados dos protocolos relacionados nesse estudo	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido ascórbico
AADC	ácido aromático descarboxilase
bFGF	basic fibroblast growth factor (fator de crescimento fibroblástico básico)
β-ME	β-mercaptoetanol
BMP	proteína morfogenética óssea
CE	Corpos embrióides
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CT-4	Linhagem de célula-tronco embrionária
DAT	high affinity dopamine transporter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FGF-8	fator de crescimento fibroblástico 8
FGF-8b	isoforma b do fator de crescimento fibroblástico 8
Fn	Fibronectina
GABA	ácido γ-aminobutírico
GFAP	glial fibrillary acidic protein (proteína ácida fibrilar da glia)
hCG	human Chorionic Gonadotropin
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IP	Intraperitoneal
ITS	Insulina, transferrina, selênio
ITSFn	insulina, transferrina, selênio e fribronectina
KOSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
KO-DMEM	meio <i>Eagle modificado por Dulbecco Knockout</i>
LIF	Fator inibidor de leucemia
MAP-2	Microtubule-associated protein 2
MCI	Massa celular interna
NEAA	Aminoácidos não essenciais
NGF	Nerve Growth Factor
Nurr1	Nuclear-receptor-related factor1

Oct-3/4	octamer-binding transcription factor 3/4
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão salina fosfato)
PGP	protein gene product
PMSG	Gonadotrofina Sérica Equina
pen/strep	Penicilina/estreptomicina
RNTC	Rede Nacional de Terapia Celular
RP-HPLC	reverse-phase high-performance liquid chromatography
SEM	erro padrão da média
SFB	soro fetal bovino
Shh-N	peptídeo amino-terminal de Sonic Hedgehog
SNC	sistema nervoso central
SNE	sistema nervoso entérico
SNP	sistema nervoso periférico
SSEA-1	stage specific embryonic antigen 1
TH	tirosina hidroxilase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VMAT2	vesicular monoamine transporter
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
p	Valor de probabilidade
%	Porcentagem
+	Positivo

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Revisão de Literatura	18
2.1	<i>Definição e estudos com CT</i>	18
2.2	<i>Doença de Parkinson e neurônios dopaminérgicos</i>	20
2.3	<i>Estudos com CTE diferenciadas em neurônios dopaminérgicos</i>	21
2.4	<i>Neurito e evolução – desenvolvimento embrionário e neurito como marcador de diferenciação.....</i>	24
2.5	<i>Aspectos metodológicos do protocolo adaptado para cultivo de CTE</i>	25
3	Objetivos	28
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	28
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	28
4	Material e Métodos.....	29
4.1	<i>Meios utilizados.....</i>	29
4.2	<i>Obtenção das CTE.....</i>	30
4.3	<i>Diferenciação das CTE</i>	33
4.4	<i>Imunofluorescência</i>	36
4.5	<i>Documentação fotográfica</i>	38
4.6	<i>Identificação e padrão de expressão dos anticorpos primários.....</i>	39
4.7	<i>Quantificação das células</i>	40
4.8	<i>Análise estatística</i>	41
5	Resultados	42
5.1	<i>Caracterização morfológica dos tipos celulares nos estágios progressivos.....</i>	42
5.1.1	<i>Estágio 1.....</i>	42
5.1.2	<i>Estágio 2.....</i>	42
5.1.3	<i>Estágio 3.....</i>	43
5.1.4	<i>Estágio 4.....</i>	43
5.1.5	<i>Estágio 5.....</i>	44
5.2	<i>Caracterização imunofenotípica nos diversos estágios.....</i>	46
5.2.1	<i>Caracterização imunofenotípica e semiquantificação.....</i>	46
5.2.2	<i>Aspectos descritivos dos padrões de marcação.....</i>	47
5.3	<i>Quantificação da expressão dos diversos marcadores ao longo dos estágios.....</i>	58

6	Discussão.....	64
7	Conclusões	77
8	Referências Bibliográficas.....	78

1 Introdução

As novas pesquisas com células-tronco (CT) – também denominadas de células-mãe ou ainda células estaminais – têm despertado um grande debate. O potencial de aplicações médicas desta nova fronteira de conhecimento é muito vasto, mas apesar do entusiasmo dos cientistas e das esperanças depositadas por uma parcela considerável da população que poderá um dia beneficiar-se do conhecimento gerado nessa área, são necessárias ainda muitas pesquisas, financiamentos e disposições políticas, éticas e morais para compor o cenário ideal ao pleno desenvolvimento dessa área terapêutica.

Nas últimas décadas o conhecimento a respeito da neurogênese vem crescendo e em paralelo, o campo de pesquisas básicas e aplicadas com as células-tronco embrionárias (CTE) também está em franca expansão. Um dos desafios hoje é o desenvolvimento de novas terapias que utilizem materiais biológicos, como as CTE ou células-tronco adultas (CTA), capazes de desencadear uma resposta regenerativa *in vivo* ou que produza material *in vitro* para ser transplantado.

Mesmo depois do nascimento, isto é, após o estabelecimento da população neuronal, os neurônios maduros em geral não se dividem mais, embora, a neurogênese em adultos tenha sido comprovada em algumas localizações específicas como o bulbo olfatório e giro denteado hipocampal (MACKOWIAK, CHOCHYK et al., 2004).

As primeiras CTE de camundongos foram isoladas no início da década de 1980, a partir da massa celular interna (MCI) de um blastocisto (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981) e as humanas foram descritas em 1998 (THOMSON et al., 1998). Desde então, linhagens de CT vêm sendo obtidas tanto em humanos quanto em animais. Essas células teoricamente permitem a geração ilimitada de outros tipos celulares, cujos neurônios e/ou precursores neurais são de interesse para o nosso grupo, bem como abrem caminho para o estudo da neurogênese experimental e humana. A classificação e estudos morfofuncionais das CTE possibilitam estabelecer as bases para futuras terapias celulares em doenças neurodegenerativas, sendo que a experimentação em animais, tais como camundongos e ratos, se faz necessária como etapa anterior à aplicação em humanos.

Muitos protocolos se baseiam nos eventos ocorridos durante a embriogênese para direcionar as células para determinada linhagem celular. Entretanto, esses eventos indutivos que ocorrem na embriogênese são parcialmente compreendidos e a disposição espacial de células em cultura é completamente diferente daquela encontrada no embrião, tornando mais difícil a mimetização. Apesar destas dificuldades, a diferenciação neuronal de CTE vem sendo largamente inspirada pelo conhecimento de eventos iniciais do desenvolvimento que permitem a extrapolação dos fenômenos que determinam a diferenciação neural no embrião para a situação de cultura celular (SUTER e KRAUSE, 2008).

Em nosso laboratório, um interesse básico em investigar mecanismos de degeneração e regeneração dos tecidos nervosos, principalmente aqueles que atuam em patologias do sistema nervoso como a Doença de Parkinson, Alzheimer e Esclerose Múltipla nos aproximou da motivação para estudar aspectos do desenvolvimento *in vitro* de CTE de camundongo, como instrumento investigativo e terapêutico de valor potencial.

Estas doenças produzem piora significativa na qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias e as opções de tratamento disponíveis não corrigem as alterações patológicas nem são apropriadas para todos os pacientes em termos de eficácia e custos a longo prazo (VATS et al., 2005). Recentemente, em associação com o Laboratório de Reprodução Humana Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas, UFMG, estamos desenvolvendo um projeto que visa possibilitar isolamento e diferenciação de precursores neurais *in vitro*, a partir de CTE de camundongos. O presente projeto, portanto, é um subprojeto do Projeto intitulado: *“Estudo prospectivo, randomizado e controlado sobre terapia celular de doença de Parkinson criada experimentalmente em ratos com precursores neurais diferenciados a partir de células-tronco embrionárias de ratos e camundongos”*, coordenado pelo professor Dr. Aroldo Fernando Camargos (Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG) e pelo pesquisador do Hospital das Clínicas da UFMG, o Dr. Rubens Lene Carvalho Tavares, e é em grande parte financiado pela Bayer – Schering – Pharma.

Utilizamos a linhagem CT-4 de CTE de camundongos isolada previamente pelo Dr. Rubens Lene Carvalho Tavares, co-orientador desta

dissertação de mestrado, no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG. Objetivamos estabelecer um protocolo de diferenciação neuronal desta linhagem de CTE adaptado a partir de OKABE et al. (1996), LEE et al. (2000) e NISHIMURA et al. (2006), acompanhando sua diferenciação fenotípica através de imunofenotipagem, além de estabelecer a taxa de eficácia da diferenciação neural e neuronal *in vitro* para compreender o comportamento destas células em nossas condições experimentais.

2 Revisão de Literatura

2.1 Definição e estudos com CT

As CT são células indiferenciadas com capacidade de auto-renovação e de se transformarem em outro tipo de célula diferenciada. Podem ser classificadas, de acordo com sua capacidade de diferenciação em, unipotentes (geram apenas um tipo de célula adulta), multipotentes (dois ou mais tipos celulares), pluripotentes (grande número de tipos de celulares) e totipotentes (qualquer tipo de célula adulta).

Diz-se que uma CT é adulta quando ela é obtida após a embriogênese, ou seja, de um tecido já diferenciado. Nessa classificação se encaixam as CT extraídas de qualquer tecido, como medula óssea, tecido adiposo, ou cordão umbilical, por exemplo. Por definição, estas CTA são multipotentes, possuem plasticidade, conservando a capacidade de se renovarem por períodos longos e, com certa limitação, podem diferenciar-se para produzir um tipo de célula ou linhagem tecidual com funções especializadas (CONRAD e HUSS, 2005).

Já as CTE são células primitivas, indiferenciadas, pluripotentes, originadas do blastocisto e têm potencial para se tornar tipos celulares especializados de qualquer órgão ou tecido do organismo (DOETSCHMAN et al., 1985). As CTE são uma fonte promissora para terapia celular, pois proliferam sem limites, respondem a sinais moleculares e são facilmente acessíveis para manipulação genética (LEE et al., 2000).

A opção de desenvolver técnicas de produção de CT *in vitro* capazes de se diferenciar em neurônios com fenótipos específicos tem sido considerada por vários grupos que utilizam ratos (RUHNKE et al., 2003) ou camundongos (OKABE et al., 1996; LEE et al., 2000) para gerar estas linhagens celulares e testar sua implantação em sítios lesados do sistema nervoso central (SNC) (NISHIMURA et al., 2006; SOUNDARARAJAN et al., 2007) ou periférico (SNP) (BAIER et al., 2004; KIM et al., 2002). Atualmente no Brasil, a Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC) é um grupo de grande representatividade que reúne as principais linhas de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas no país nessa

área, no entanto não há estudos publicados por grupos brasileiros nesta linha de investigação até o momento.

Estudos anteriores *in vivo* e *in vitro* mostraram que a nestina, proteína de filamento intermediário, é expressa em precursores de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (LEND AHL et al., 1990), daí a importância dada à marcação positiva das células em cultura quando a intenção é diferenciá-las na direção neural. No outro extremo do processo de diferenciação os neurônios marcados positivamente contra a tirosina hidroxilase (TH+) são considerados dopaminérgicos, já que a tirosina hidroxilase é a enzima limítrofe da produção de dopamina no neurônio (LEE et al., 2000).

OKABE et al. (1996) caracterizaram população de células proliferativas positivas para nestina (nestina+), derivada de CTE em cultura em meio sem soro complementado com insulina, transferrina, selênio, fibronectina (ITSFn) e bFGF. Os dados apresentados por eles demonstram que CTE podem gerar precursores neuronais com capacidade proliferativa, os quais podem ser expandidos e diferenciados eficientemente em neurônios e células da glia capazes de fazerem sinapses. O fato de que os precursores neurais derivados das CTE apresentam propriedades comuns àqueles precursores neurais “autênticos”, isto é, serem nestina+, demonstra que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento *in vivo* também estão presentes na situação *in vitro* e que a restrição das linhagens observada no embrião pode ser replicada *in vitro* de uma maneira controlada. Eles efetivamente separaram os estados de células pluripotentes, de proliferação de precursores neurais e a diferenciação final na direção de neurônios e células da glia através do uso combinatório de condições de cultivo sem soro e fatores de crescimento sendo os primeiros a demonstrar que células proliferativas precursoras neuroepiteliais podem ser geradas em grande escala a partir de linhagens de CT pluripotentes.

LEE et al. (2000) apresentaram um método de obtenção de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos em grande escala a partir de CTE de camundongo *in vitro*, sendo que esses neurônios produzem dopamina, respondem a neurotransmissores e exibem atividade sináptica espontânea. Eles geraram inicialmente uma população de células progenitoras neurais do SNC (nestina+), expandiram essas células na presença de mitógenos e moléculas específicas de sinalização e promoveram a diferenciação e

maturação das mesmas com a retirada do mitógeno do meio de cultura. Modificações relevantes obtidas por eles neste trabalho incluem: 1) CTE primeiramente foram dissociadas em células únicas para obter formação mais uniforme de corpos embrioides (CE), o que fez com que a formação de células nestina⁺ aumentasse no estágio 3; 2) uso de Sonic Hedgehog N-terminal (Shh-N) e fator de crescimento fibroblástico 8 (FGF-8) no estágio 4 e de ácido ascórbico (AA) no estágio 5 aumentaram a produção de neurônios TH⁺, assim como de dopamina ao final do cultivo. Esse sistema experimental provê uma ferramenta poderosa para análise dos mecanismos moleculares que controlam as funções desses neurônios *in vitro* e *in vivo*, e o potencial de entender e tratar doenças neurodegenerativas, uma vez que o sucesso na conversão de CTE em neurônios dopaminérgicos *in vitro* potencialmente deve ser dependente da indução de expressão dos mesmos genes que são expressos *in vivo*.

Pesquisas com CT se justificam no intuito de se conhecer melhor os mecanismos através dos quais diversos genes e seus produtos atuam, obtendo-se assim, um sistema no qual o caminho das CTE até células nervosas pode ser reconstituído e estudado *in vitro* (BAIN et al., 1995).

Os maiores desafios hoje são, além de produzir células diferenciadas em número e pureza, mantê-las funcionantes por longos períodos de tempo (LANGSTON, 2005) e isso justifica um grande investimento em pesquisas antes de se indicar uma possível aplicabilidade clínica. Várias questões precisam ser bem investigadas, tais como: a capacidade das CTE se diferenciarem, de sobreviverem *in vitro* e/ou ao potencial transplante, de produzirem extensões neuríticas *in vitro* e em termos de comportamento fenotípico e funcional (síntese de neurotransmissores, dependência de fatores de crescimento, integridade estrutural do citoesqueleto e do transporte axonal e eventos sinápticos) (SONNTAG et al., 2005). Além disso, não existe na literatura em geral uma descrição sistemática de todo o processo de análise fenotípica desde o estágio indiferenciado ao estágio final de diferenciação.

2.2 Doença de Parkinson e neurônios dopaminérgicos

A Doença de Parkinson, descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, é uma doença progressiva do sistema nervoso central, idiopática,

que acomete ambos os sexos, caracterizada por uma desordem progressiva do movimento devido à disfunção dos neurônios secretores de dopamina nos gânglios da base, que controlam e ajustam a transmissão dos comandos conscientes vindos do córtex cerebral para os músculos do corpo humano.

O tratamento convencional com reposição de dopamina reduz consideravelmente as incapacidades motoras. O tratamento da depressão, dor, constipação e insônia associadas reduzem consideravelmente os sintomas e se refletem na qualidade de vida. Entretanto, as opções de tratamento disponíveis não corrigem as alterações patológicas nem são apropriadas para todos os pacientes em termos de eficácia e custos a longo prazo (VATS et al., 2005). Apesar de grande euforia relacionada às abordagens por terapia gênica e tratamento com CT que vêm sendo considerados promissores (LEES et al., 2009), estudos controlados por placebo mostraram ausência de benefícios e, além disso, indicaram o desenvolvimento de discinesias que se tornaram menos responsivas ao tratamento convencional (KRIKS e STUDER, 2009). Tais fatos reforçam ainda mais a importância de pesquisas básicas com o objetivo de compreender a biologia das CT e da diferenciação neuronal, os protocolos de diferenciação e purificação, dentro de uma perspectiva aplicada à sua utilização como terapia celular.

2.3 Estudos com CTE diferenciadas em neurônios dopaminérgicos

O denominador comum de todos os neurônios dopaminérgicos é a expressão de genes da via dopaminérgica, os quais codificam um grupo filogeneticamente conservado de proteínas envolvidas na síntese e no transporte de dopamina. Entretanto, os mecanismos genéticos regulatórios desta síntese e transporte ainda são pouco compreendidos (FLAMES e HOBERT, 2009).

Estratégias de diferenciação são em parte baseadas no conhecimento de eventos indutivos durante a embriogênese, mas também derivados empiricamente. Enquanto a geração de neurônios em meio a uma população heterogênea de células é facilmente obtida, a diferenciação celular na direção da linhagem neural continua sendo desafiante (SUTER e KRAUSE, 2008). O

mecanismo de diferenciação região-específico das células neuroepiteliais é comumente uma das questões principais do desenvolvimento neurobiológico desde o início das pesquisas nesse campo (OKABE et al., 1996). Todavia, hoje em dia acredita-se que isso pode ser alcançado através da modulação dos ambientes extra e intracelulares, bem como com manipulação genética. Fatores extracelulares, tais como fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular ou o contato com outros tipos de células, atuam nas CTE por meio de interações com componentes da membrana celular. Essas interações direcionam cascatas de sinalização intracelulares e resultam na modulação da diferenciação celular. Alternativamente, o meio intracelular pode ser também diretamente modificado, através, por exemplo, da expressão transgênica de proteínas ou pela adição de pequenas moléculas orgânicas ao meio de cultura (SUTER e KRAUSE, 2008). Nosso protocolo experimental baseia-se nos princípios básicos de modulação do ambiente extracelular que serão discutidos oportunamente.

Nos últimos anos tem ficado claro que a estratégia básica de diferenciação adotada por diversos grupos, aos quais nos incluímos, requer um refinamento no sentido de monitorar o substrato e os sinais do meio extracelular durante a diferenciação das CTE, com objetivo de direcionar a indução para mesencéfalo e sincronizar a diferenciação de células não comprometidas e precursores comprometidos para mesencéfalo na direção de neurônios dopaminérgicos (KRIKS e STUDER, 2009). Neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são diferentes daqueles do prosencéfalo ou do diencéfalo, portanto há a necessidade ainda de distingui-los quando em cultura. Sua morfologia, bem como sua ultra-estrutura já foram descritas na literatura (GRACE e ONN, 1989; SESACK et al., 1994) e as características dos neurônios dopaminérgicos gerados a partir de CTE em cultura devem ser semelhantes à essas descritas *in vivo*. Para demonstrar que esses neurônios gerados em cultura têm função dopaminérgica, ou seja, que liberam dopamina, medidas eletrofisiológicas podem ser tomadas e comparadas ao comportamento fisiológico natural, bem como a função bioquímica dessas células em cultura pode ser analisada por RP-HPLC (reverse-phase high-performance liquid chromatography) (KRIKS e STUDER, 2009; LEE et al., 2000).

Há muitas diferenças nos sinais controladores da manutenção de CTE de camundongos e de humanos, entretanto os sinais responsáveis pela indução neural na direção de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo parecem ser similares (KRIKS e STUDER, 2009). A presença de rosetas neurais parece ser mais comum e duradoura em culturas de células humanas quando se inicia a diferenciação neural. Essas rosetas foram caracterizadas como um novo tipo de CT neural primária, que expressa marcadores moleculares distintos dos clássicos FGF/EGF e mantém a capacidade de diferenciar em diversos tipos neurais, inclusive neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (ELKABETZ et al., 2008).

Na literatura, neurônios TH+ são considerados dopaminérgicos, já que a tirosina hidroxilase é a enzima limítrofe da produção de dopamina no neurônio (LEE et al., 2000). Entretanto, outras marcações podem ser feitas para se assegurar essa classificação, como com AADC (ácido aromático descarboxilase), VMAT2 (vesicular monoamine transporter) e DAT (high affinity dopamine transporter) (KRIKS e STUDER, 2009), como também a não marcação por outros anticorpos anti proteínas expressas em outros tipos neurais, tais como GABA (ácido γ -aminobutírico), serotonina, entre outras (LEE et al., 2000), pode ser usada.

Os principais marcadores de precursores neurais diferenciados a partir de CTE são estudados por técnicas de imuno-histoquímica (imunofluorescência) e incluem os seguintes marcadores de diferenciação neuronal: nestina, tirosina hidroxilase (TH) e β -III tubulina (KIM et al., 2002; LEE et al., 2000; NIH, 2001).

A PGP 9.5 (protein gene product 9.5), há aproximadamente 30 anos, foi detectada como uma “proteína específica do cérebro”. Ela é altamente conservada e localizada em neurônios e em células neuroendócrinas em vertebrados, correspondendo a 5-10% da proteína citoplasmática, por isso foi adotada em muitas áreas da neurobiologia como um marcador imunológico pan-neuronal, marcando neurônios dos SNC, SNP e SNE. Traços dessa proteína também são encontrados no intestino grosso, rins, ovário e testículo. No plexo mioentérico, no gânglio cervical superior e no gânglio trigeminal de humanos alguns neurônios marcam fracamente, enquanto outros marcam fortemente. Parece ser mais expressiva em neurônios com proeminentes axônios, marcando estes também fortemente, enquanto neurônios com axônios

inexpressivos são fracamente marcados. Em um estudo de oócitos de porco verificou-se que a expressão é aumentada durante a maturação do mesmo e sugere um papel na prevenção da polispermia (DAY e THOMPSON, 2010).

2.4 Neurito e evolução – desenvolvimento embrionário e neurito como marcador de diferenciação

Modelos *in vitro* de cultura celular e de tecidos são usados há décadas para estudar a dinâmica do desenvolvimento (LAERUM et al., 1985), sendo que estudos recentes vêm demonstrando uma enorme quantidade de genes expressos pelos neurônios em resposta aos componentes e à estrutura da matriz extracelular utilizada nas culturas. As complexas interações célula-matriz envolvem a expressão de genes relacionados ao citoesqueleto e ao crescimento de neuritos, além de influenciar a extensão das células em cultura (LI et al., 2007). Em situações de cultura, devido à impossibilidade de distinguir dendritos e axônios em preparações rotineiras, utiliza-se o termo neuritos para denominar todos os prolongamentos derivados dos corpos neuronais.

Para o desenvolvimento das ramificações dos neurônios é essencial o papel do cone de crescimento. O movimento deste pode ser influenciado por fatores solúveis, tais como os fatores de crescimento NGF e FGF, que podem iniciar e dirigir o crescimento e o movimento deste processo de prolongamento neuronal. Moléculas de adesão, tanto de células, como da matriz extracelular, também têm um papel importante nesse desenvolvimento neuronal, já que a adesão de estruturas de crescimento do cone, bem como dos prolongamentos neuronais, estabilizam sua extensão (CHAO, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário as células realizam migração para o sítio específico do órgão ou tecido do qual irão fazer parte. O mecanismo mais comum usado nessa translocação é a combinação da extensão de um processo celular e sua adesão ao substrato, no qual estão envolvidas proteínas contráteis associadas à rede intracelular de microfilamentos (ALBERTS et al., 2002), daí a importância que deve ser dada à manutenção da viabilidade do citoesqueleto neuronal, tanto na passagem entre os estágios de diferenciação, quanto na obtenção de neurônios próprios para transplante. O controle direcional dessa migração pode ocorrer através da

presença de célula guia, como as células da glia, que estão relacionadas a estabilização de culturas de neurônios simpáticos por induzir o crescimento de neuritos através da produção de proteínas que estimulam a expansão dessa rede de prolongamentos (LEIN et al., 2002), ou através de um terreno multicelular guiado pelo gradiente de concentração.

Em culturas primárias, em geral, após o plaqueamento em condições adequadas os neurônios passam da forma arredondada e em suspensão para a adesão ao substrato e modificações progressivas da forma que culminam com a expansão neurítica (ARANTES et al 2000; ARANTES e ANDREWS, 2006).

A expansão neurítica ocorre apenas quando a sinalização intracelular é estimulada por fatores do meio e substrato, refletindo o funcionamento de vias intracelulares que resultam em aspectos diferenciados dos neurônios em cultivo. Desta forma, o crescimento neurítico nas culturas de CTE é um marcador morfológico da maturação funcional dos aparatos de diferenciação neuronal.

2.5 Aspectos metodológicos do protocolo adaptado para cultivo de CTE

Para realização do presente trabalho tivemos como base principalmente três trabalhos da literatura. Sabemos que diversos outros foram feitos, inclusive com resultados bastante positivos e promissores, entretanto optamos por focar nos aspectos metodológicos dos trabalhos que utilizamos como orientação para estabelecimento do presente protocolo e sua explicação racional, com a finalidade de contribuir para o entendimento dos mecanismos básicos que sustentam a diferenciação neuronal *in vitro*, a partir de CTE.

O **Quadro 1** abaixo relaciona as principais racionalizações de cada um dos protocolos realizados nesses trabalhos citados, sendo que na última coluna apresentamos nosso protocolo modificado. Um dos nossos objetivos neste trabalho é, além de padronizar um protocolo de diferenciação que favoreça a obtenção de neurônios dopaminérgicos a partir do cultivo de CTE *in vitro*, discutir os prováveis mecanismos que atuam em cada etapa da transformação destes neurônios.

Para tanto, realizamos as etapas de formação de CE, seguida pela diferenciação em precursores neurais e sua proliferação, e finalmente a etapa de obtenção de neurônios dopaminérgicos.

Quadro 1 Relação dos protocolos de diferenciação de CTE em neurônios

	OKABE et al., 1996	LEE et al., 2000	NISHIMURA et al., 2006	Protocolo realizado
Estágio 1	<p>1x10⁶ células/6 cm - depois de 3 a 4 dias elas serão em torno de 2x10⁷ células.</p> <p>Meio de crescimento completo similar ao descrito por ROBERTSON (1987), no qual utiliza-se: DMEM SFB a 10% NEAA a 1% 2-mercaptoetanol penicilina estreptomina</p> <p>Quando em gelatina, o meio de crescimento completo foi suplementado com 100U/mL de ESGRO (LIF recombinante solúvel; ROBERTSON, 1997).</p> <p>Substrato: camada de fibroblastos inativados.</p> <p>Passagem: 0,25% tripsina/0,04% EDTA</p>	<p>KO-DMEM LIF SFB a 15% NEAA MEM 2- mercaptoetanol L-glutamina penicilina estreptomina</p> <p>Substrato: gelatina</p> <p>Passagem: 0,05% tripsina/0,04% EDTA</p>	<p>5x10⁵ células/10mL em placas de 9 cm</p> <p>DMEM LIF SFB a 10% NEAA 2- mercaptoetanol piruvato de sódio penicilina estreptomina blasticidina S</p> <p>Substrato: gelatina</p> <p>Passagem: 0,25% tripsina/1mM EDTA</p>	<p>KO-DMEM LIF SFB a 15% NEAA MEM β-mercaptoetanol L-glutamina penicilina estreptomina</p> <p>Substrato: gelatina</p> <p>Passagem: 0,25% tripsina/1mM EDTA</p>
Estágio 2	<p>Cultivo mantido em suspensão por 4 dias.</p> <p>CE são passados para camada aderente e deixados em meio DMEM suplementado com SFB a 10% por 24h.</p>	<p>2-2,5x10⁴ células/cm²</p> <p>Cultivo mantido em suspensão no mesmo meio do estágio 1 por 4 dias e depois os CE foram plaqueados em camada adesiva de células e deixados para aderir por 24h.</p>	<p>2,5x10⁴ células/mL mantidas em suspensão em gotas em meio basal sem LIF por 4 dias.</p> <p>CE formados são então plaqueados em placas de 100mm cobertas por gelatina e deixados por 24h.</p>	<p>2,5x10⁴ células/cm² mantidas em suspensão por 4 dias em meio KO-DMEM sem LIF com KOSR (descrito no Quadro 2).</p> <p>CE são passados para placas cobertas com gelatina e deixados por 24h para aderirem.</p>

Quadro 1 Relação dos protocolos de diferenciação de CTE em neurônios
(continuação)

Estágio 3	Meio ITSFn: DMEM/F12 insulina transferrina cloreto de selênio fibronectina 6-8 dias Dissociação: 0,05% tripsina/0,04% EDTA	Meio ITSFn: DMEM/F12 insulina transferrina cloreto de selênio fibronectina 6-10 dias Dissociação: 0,05% tripsina/0,04% EDTA	Meio ITSFn: ITS fibronectina 6-10 dias Não faz dissociação para passar para o próximo estágio.	Meio ITSFn: DMEM/F12 ITS fibronectina penicilina estreptomomicina 6 dias Dissociação: 0,05% tripsina/0,04% EDTA
Estágio 4	0,5 - 2x10 ⁵ células/cm ² Substrato: poliornitina/laminina Meio N3: DMEM/F12 insulina transferrina progesterona putrecina cloreto de selênio Com e sem: bFGF e laminina tempo de cultivo variou dependendo do objetivo do estudo da cultura.	1,5-2x10 ⁵ células/cm ² Substrato: poliornitina/laminina Meio N2 modificado de acordo com JOHE et al. (1996) contendo: DMEM/F12 insulina apotransferrina humana progesterona putrecina selenito de sódio bFGF, laminina glicose, glutamina bicarbonato de sódio Com e sem: Shh-N e FGF-8b 6 dias	N2 N2 bFGF laminina Shh-N FGF-8b 6 dias	1,5x10 ⁵ células/cm ² Substrato: poliornitina/laminina DMEM/F12 N2 bFGF laminina Shh-N FGF-8b 6 dias
Estágio 5	Retirada do bFGF Substrato: poliornitina/laminina ou monocamada de células da glia obtidas de prosencefalo de camundongos neonatos Meio neurobasal suplementado com B27 e SFB a 5%. Tempo de cultivo variou dependendo do objetivo da cultura.	Retirada do bFGF Substrato permanece o mesmo – não realiza passagem Meio N2 suplementado com laminina Com e sem cAMP e AA 6-15 dias	Retirada do bFGF Substrato permanece o mesmo – não realiza passagem Meio N2 laminina AA 6-15 dias	Retirada dos mitógenos Substrato permanece o mesmo – não realiza passagem DMEM/F12 Meio N2 laminina AA pen/estrep 6 dias

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de diferenciação neural da linhagem CT-4 de CTE de camundongos, controlando sua diferenciação fenotípica *in vitro* através de imunofenotipagem e estabelecer a taxa de diferenciação em nossas condições experimentais.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar os aspectos morfológicos das células ao longo dos estágios de diferenciação correlacionando com a expressão dos marcadores fenotípicos.
- Analisar o estado de indiferenciação das células em cultura nos diferentes estágios do protocolo, através da expressão imuno-histoquímica dos antígenos embrionários Oct-3/4, Oct-4 e SSEA-1.
- Analisar o estado diferenciado das células cultivadas nos diferentes estágios do protocolo, através da expressão imuno-histoquímica das proteínas nestina, β -III tubulina, PGP e TH.
- Relacionar a quantidade de células marcadas por cada anticorpo contra as proteínas SSEA-1, nestina, β -III tubulina, PGP e TH durante a progressão da cultura nos diferentes estágios.

4 Material e Métodos

4.1 Meios utilizados

Para sistematizar o uso dos meios de cultura optamos por denominá-los de acordo com o quadro abaixo.

Quadro 2 Nomenclatura, Composição e utilização dos meios de cultura

Nome de referência	Composição	Utilização
Meio de cultivo padrão	Para cada 1.000 mL de meio: 750mL de meio <i>Eagle modificado por Dulbecco Knockout</i> (KO-DMEM, 10829-018, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), soro fetal bovino (SFB, 12657-029, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) a 15%, 2mM L-glutamina (35050-061, Invitrogen Corporation, São Paulo, SP, Brasil), 50µg/mL penicilina/estreptomicina (pen/strep, 15070-063, Invitrogen Corporation, São Paulo, SP, Brasil), 0,1 mM de NEAA (aminoácidos não essenciais, 11140-050, Invitrogen Corporation, São Paulo, SP, Brasil), 0,1mM de β-mercaptoetanol (β-ME, ES-007-E, Millipore, Billerica, MA, USA) e 1.400 U/mL de fator inibidor de leucemia (LIF, L5158-5UG, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil)	Estágio 1 Bloqueio da tripsina
Meio de cultivo padrão sem SFB e LIF	Para cada 1.000 mL de meio: 750mL de KO-DMEM, <i>Knockout Serum Replacement</i> (KOSR, 10828, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) a 15%, 2mM L-glutamina, 50µg/mL pen/estrep, 0,1 mM NEAA e 0,1mM de β-ME	Estágio 2
Meio de cultivo padrão somente sem LIF	Para cada 1.000 mL de meio: 750mL de KO-DMEM, SFB a 15%, 2mM L-glutamina, 50µg/mL pen/estrep, 0,1mM de NEAA, 0,1mM de β-ME	Estágio 3
Meio <i>serum-free</i> ITSFn	Para cada 100 mL de meio: 97,5mL de DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 11320-033, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA); 1mL de ITS (insulina, transferina, selênio - 51300-044, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA); 1mL de pen/estrep 100x e 5µg/mL de fibronectina (Fn, 33016-015, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA)	Estágio 3

Quadro 2 Nomenclatura, Composição e utilização dos meios de cultura
(continuação)

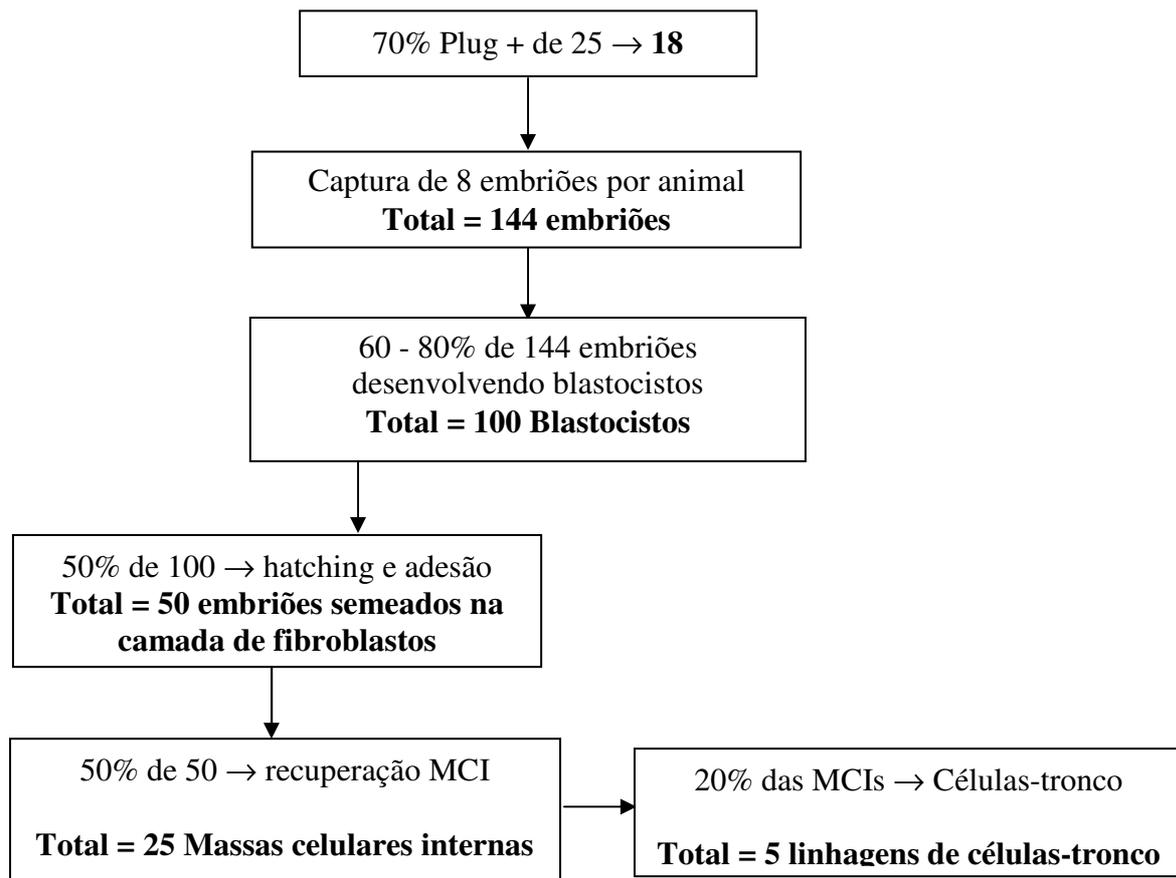
Meio de expansão de células nestina+	DMEM/F12, meio N2 (17502-048, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) a 1%, 1µg/mL de laminina (23017-015, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 10 ng/mL de bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico, 133-FB, R&D Systems, Minneapolis, MN), 500 ng/ml de Shh-N (461-SH, R&D Systems, Minneapolis, MN) e 100 ng/mL de FGF-8b (isoforma b do fator de crescimento fibroblástico 8, 423-F8, R&D Systems, Minneapolis, MN)	Estágio 4
Meio de diferenciação	DMEM/F12, meio N2 a 1%, 1µg/mL de laminina, pen/estrep a 1% e 200µM de AA (102890, MP Biomedicals, Tokio, Japão)	Estágio 5

4.2 Obtenção das CTE

Neste estudo foi utilizada nova linhagem de CTE isolada de blastocistos obtidos de camundongos da linhagem 129/Sv, segundo metodologia descrita anteriormente (TAVARES et al., 2007; NAGY et al., 2003).

De forma resumida, foram utilizados camundongos de 3 a 12 semanas de vida, adquiridos do biotério do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da Universidade de São Paulo e mantidos de acordo com as leis de proteção e manuseio dos mesmos no biotério da Faculdade de Medicina da UFMG.

A taxa de sucesso de isolamento de novas linhagens de CTE é de cerca de 20% (ABBONDANZO et al., 1993) das MCI coletadas após cultivo, assim, foram utilizados 25 animais para indução de ovulação e coleta de embriões, obtendo-se ao final, quatro novas linhagens. O número necessário de animais foi calculado segundo fluxograma abaixo.



A superovulação foi realizada via intraperitoneal (IP) com 5 UI de PMSG (Gonadotrofina Sérica Equina, Folligon® 1.000 UI, Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) e, após 48h, a indução de ovulação com 5 UI via IP de hCG (human Chorionic Gonadotropin, Choragon 1.500 UI - Ferring, São Paulo, Brasil). Logo após uso do hCG e acasalamento, as fêmeas com sinais de copulação na manhã do dia seguinte (plug vaginal positivo) foram separadas e mortas por deslocamento cervical para coleta de embriões no dia 3,5 após verificação do plug vaginal positivo.

Após antissepsia com álcool a 70%, retirou-se os dois cornos uterinos sendo os mesmos imediatamente imersos e lavados em meio M2 (M7167, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em placa de Petri de plástico. Os blastocistos foram coletados injetando-se meio M16 (M7292, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) nos cornos uterinos, com auxílio de seringa de insulina e lupa estereotática, em uma placa de Petri, em capela de fluxo laminar. Os blastocistos foram capturados com pipeta de Pasteur de vidro afilada em chama, com diâmetro de cerca de 100 µm.

Cada embrião foi lavado em cinco diferentes microgotas com cerca de 30µl de meio M16 sob óleo mineral (M5310, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e, posteriormente, todos os embriões foram transferidos para uma nova placa de Petri de vidro aquecida contendo sistema de cultura em microgotas com meio M16. Ambas as placas foram montadas no dia anterior à coleta embrionária e estabilizadas na incubadora.

Todo cultivo embrionário e celular realizado neste estudo foi mantido em incubadora de CO₂, com concentração de 6%, em temperatura de 37°C e alta umidade e a manipulação sempre foi realizada em ambiente estéril de capela de fluxo laminar.

Os embriões foram avaliados diariamente em microscópio invertido, sendo que aqueles em fase de mórula foram mantidos em cultivo até a fase de blastocisto por um período de até dois dias. Os blastocistos expandidos foram semeados em placas de cultivo de 24 poços (142475, Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), previamente tratadas com solução de gelatina a 0,1% (ES-006-B, Millipore, Billerica, MA, USA) e camada celular contendo 1x10⁵ fibroblastos sem atividade mitótica por poço (PMEF-H, Millipore, Billerica, MA, USA).

O meio de cultivo foi trocado diariamente, e após cinco a seis dias, foi realizada a remoção da MCI com pipeta P-200 utilizando-se ponteiras atóxicas e estéreis. Para tanto, cada poço foi lavado com PBS (tampão salina fosfato) sem cálcio e magnésio (14190-144, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e então a MCI foi removida e submetida a tratamento com tripsina 0,25%/1mM EDTA (25200-056, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) por 4 minutos, em placa de 96 poços mantida em incubadora.

Neste estudo o bloqueio da atividade enzimática durante as passagens celulares sempre foi realizado com o meio de cultivo padrão descrito no **Quadro 2**, devido ao fato deste conter SFB. A cada 2–3 dias, dependendo da análise da confluência da placa, foi realizado o procedimento aqui denominado de passagem. Esta passagem consistiu na dissociação das células com tripsina 0,25%/1mM EDTA por três minutos em incubadora e posterior bloqueio da ação da tripsina. As células indiferenciadas obtidas eram re-plaqueadas em novas placas, garantindo-se assim, a proliferação das CTE indiferenciadas de forma contínua.

Em torno da passagem número 5 a 7, após confirmação morfológica e molecular do estado indiferenciado das células, cada nova linhagem de CT foi congelada com meio contendo DMSO (dimetilsulfóxido, C-6164, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mantidas em nitrogênio líquido até o momento dos experimentos de diferenciação descritos a seguir.

4.3 Diferenciação das CTE

As CTE foram isoladas e cultivadas no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG, sob co-orientação do pesquisador Dr. Rubens Lene Carvalho Tavares.

A diferenciação das linhagens neuronais foi obtida em cinco estágios, conforme descrito por OKABE et al. (1996), LEE et al. (2000) e NISHIMURA et al. (2006) com algumas modificações. A metodologia para tratamento e obtenção das CTE e sua seqüencial diferenciação está descrita em detalhes, a saber:

Estágio 1 – Obtenção de células indiferenciadas

Após o descongelamento rápido, em banho-maria, a 37 °C, da colônia CT-4, iniciou-se o processo de diferenciação das CTE nos subseqüentes estágios. Para tanto, a placa de 60 mm foi tratada com a solução de gelatina a 0,1% por no mínimo dez minutos, em ambiente estéril de capela de fluxo laminar. Após este período, o excesso da solução de gelatina foi retirado, sendo adicionado 2,5mL de meio de cultivo padrão, detalhado no **Quadro 2**, e imediatamente semeadas e cultivadas as CTE.

O cultivo *in vitro* das CTE é dependente da citocina LIF, que é uma proteína essencial para a manutenção da natureza pluripotente das CTE, já que inibe a diferenciação espontânea destas células (NAGY et al., 2003). ABBONDANZO et al. (1993) corroboram essa definição ao afirmarem que na ausência deste fator as células se diferenciam e eventualmente perdem também a capacidade proliferativa. Além do LIF, outro fator relevante utilizado no meio, que exerce o papel de manutenção e crescimento das células indiferenciadas, é o KO-DMEM, um meio basal especial para cultura de CTE

murinas e humanas, pois apresenta uma osmolaridade reduzida, mimetizando melhor o ambiente natural do tecido embrionário.

O cultivo controlado para análise de interesse do nosso trabalho, a saber, caracterizar as células nos seus diferentes estágios de diferenciação, foi sempre realizado em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis, para viabilizar a realização das imunofluorescências e a documentação fotográfica. Para o estágio 1 estes poços foram então tratados somente com a solução de gelatina a 0,1% e 1×10^5 células/poço foram plaqueadas. Essa densidade de CTE plaqueadas foi obtida a partir da observação da confluência da placa de 24 poços, objetivando-se obter um número adequado de células para análise morfológica e quantificação através da documentação fotográfica.

As placas de 60 mm, nas quais a cultura passou a ser mantida, eram analisadas diariamente. A cada dois ou três dias, dependendo do grau de confluência da placa, as células eram submetidas à passagem. Esse grau de confluência deveria ser de no mínimo 70%, para passagem para o próximo estágio, e de no máximo 90%, para evitar a diferenciação celular.

Estágio 2 – Formação de CE

Para induzir a formação de CE, após a dissociação enzimática, $2,5 \times 10^4$ células/cm² foram cultivadas em suspensão em placas de 60 mm por quatro dias em meio de cultivo padrão sem SFB e LIF, detalhado no **Quadro 2**. Neste estágio é preferível o uso do KOSR, pois o SFB pode conter complementos inibidores da diferenciação neuronal (NISHIMURA et al., 2006). No intuito de permitir a diferenciação na direção dos folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, o LIF também foi retirado neste estágio.

Estágio 3 – Seleção de células nestina+

Para prosseguir na diferenciação, os CE foram semeados em placas cobertas por gelatina a 0,1% e mantidos em cultura por um dia no meio de cultivo padrão somente sem LIF, detalhado no **Quadro 2**. O retorno da utilização do SFB se deu devido ao fato de que observamos que na sua ausência as células não aderiram ao substrato. O período de 24 horas permitiu que os CE se estendessem pelo substrato e após isto, o meio foi substituído pelo meio *serum-free* ITSFn, detalhado no **Quadro 2**. O meio de cultura foi

trocado a cada dois dias, sendo que o cultivo permaneceu por seis dias. Após esses seis dias de cultivo no meio ITSFn, as células foram dissociadas pela última vez durante o processo de diferenciação para serem passadas para o estágio 4.

Estágio 4 – expansão das células nestina+

O substrato das células a partir desse estágio passa a ser poliornitina (P4957, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) (15µg/mL) / laminina (1µg/mL), e somente o meio foi o diferencial para estimular a progressão dos estágios.

Para tanto, as placas foram tratadas com 15µg/mL de poliornitina cerca de um a quatro dias antes de seu uso. Antes de seu uso foram lavadas com PBS sem cálcio e magnésio por três vezes, incubadas com 1µg/mL de laminina em meio DMEM/F12 por no mínimo quatro horas dentro da incubadora, quando o excesso desta foi retirado e as células plaqueadas.

Para serem plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células/cm², as células nesta passagem foram dissociadas com tripsina 0,05%/EDTA 0,04%, centrifugadas por dois minutos, ressuspensas em meio de expansão de células nestina+ detalhado no **Quadro 2**, no qual foram deixadas por cinco a sete minutos na incubadora, sendo então, somente as células presentes no sobrenadante, utilizadas.

O cultivo foi realizado neste mesmo meio de expansão de células nestina+ por um período de seis dias, sendo o mesmo trocado a cada dois dias.

Estágio 5 – diferenciação das células nestina+

A diferenciação é induzida pela retirada dos mitógenos bFGF e FGF-8b. Conseqüentemente, o meio foi trocado para o meio de diferenciação detalhado no **Quadro 2**, sendo este também trocado a cada dois dias por um período de seis dias.

O AA já foi previamente aplicado na promoção da produção de neurônios dopaminérgicos de culturas primárias de SNC conforme demonstrado por KALIR et al. (1991) e LEE et al. (2000). Posteriormente foi demonstrado que sua inclusão neste último estágio, após à adição dos Shh-N e FGF-8b no

estágio anterior, aumentou a produção de neurônios TH+, assim como de dopamina (LEE et al., 2000).

4.4 Imunofluorescência

Para os estágios analisados, as células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro previamente tratadas de acordo com o protocolo experimental pelo período determinado. No final deste período, que foi de um dia para o primeiro estágio e seis dias para os demais, as lamínulas foram lavadas cuidadosamente em PBS (14040-141, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e fixadas em formalina tamponada a 10% em PBS, sendo armazenadas até o momento da realização da técnica de imunofluorescência para detecção dos antígenos de interesse e posterior documentação fotográfica. Este período de armazenamento variou de semanas a meses. Vale ressaltar também que a densidade de células plaqueadas por cm² em placa/poço de cada estágio visa garantir um padrão adequado de densidade e distribuição das células em cultura, para sua proliferação e diferenciação adequadas, segundo os estudos citados e observações realizadas durante nossos experimentos piloto.

As colônias de células obtidas após cultivo de cada um dos estágios foram submetidas à técnica de imunocitoquímica para caracterização dos tipos celulares presentes e sua quantificação. Foram utilizados marcadores específicos de células pluripotentes e totipotentes, como SSEA-1 (stage specific embryonic antigen 1) e Oct-3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4), marcadores genéricos neurais, como GFAP (glial fibrillary acidic protein), nestina, β -III tubulina e PGP 9.5, e como marcador neuronal, na direção dos neurônios dopaminérgicos, utilizou-se TH. Como controle negativo, em todos os experimentos, foi realizado procedimento idêntico ao descrito para as lamínulas de análise, omitindo-se o anticorpo primário. O **Quadro 3** abaixo apresenta as principais características dos anticorpos primários e secundários utilizados.

Quadro 3 Caracterização dos anticorpos primários e secundários utilizados nas imunocitoquímicas

Nome do anticorpo	Marca e referência comercial	Origem e Diluição	Sistema de detecção/anticorpo secundário	Diluição feita do secundário
SSEA-1 (480)	Santa Cruz Biotechnology, Inc sc-21702	monoclonal de camundongo 1:250	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG A-11017 Molecular Probes	1:500
Oct-3/4	R&D Systems, Inc MAB1759	monoclonal de rato 1:50	Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG A-11006 Molecular Probes	1:200
GFAP	Dako Glostrup, Dinamarca Z0334	policlonal de coelho 1:500	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG A-11008 Molecular Probes	1:400
Nestina	Abcam Inc Cambridge, MA ab5968	policlonal de coelho 1:1000	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG A-11008 Molecular Probes e Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG A-11010 Molecular Probes	1:400 (ambos)
β -III tubulina	Abcam Inc Cambridge, MA ab18207	policlonal de coelho 1:480	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG A-11008 Molecular Probes e Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG A-11010 Molecular Probes	1:400 (ambos)
PGP 9.5	UltraClone Ltd Yarmouth, Reino Unido RA95101	policlonal de coelho 1:600	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG A-11008 Molecular Probes e Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG A-11010 Molecular Probes	1:400 (ambos)
Tirosina hidroxilase	Millipore Corporation AB152	policlonal de coelho 1:300	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG A-11008 Molecular Probes e Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG A-11010 Molecular Probes	1:400 (ambos)

Após fixação em formol a 10% em PBS, as lamínulas foram lavadas em três banhos de PBS a 10% em água destilada por cinco minutos cada e em PBS a 10% com Triton X-100 (11-332-481-001, Roche, Basel, Suíça) a 0,01% e albumina bovina (1870, Inlab, Diadema, Brasil) a 2% em um banho de cinco minutos. Em seguida, foram incubadas em soro normal de cabra na diluição 1:40 em PBS a 10% com Triton X-100 a 0,01% e albumina bovina a 2% por quarenta e cinco minutos e então incubadas com os anticorpos primários, por no mínimo duas horas, na temperatura ambiente, ou overnight à 4°C, e com o anticorpo secundário por uma hora. Entre cada etapa as lamínulas foram lavadas em dois banhos de cinco minutos em PBS a 10% em água destilada e em um banho de cinco minutos em PBS 10% com Triton X-100 a 0,01%, exceto entre as incubações com soro normal de cabra e anticorpos primários, momento em que os banhos foram omitidos.

Para detecção do núcleo e sua caracterização morfológica utilizou-se 0,2 µg/mL do marcador Hoechst (H1399, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com capacidade de ligação em sequências de poli d (A-T), intercalando-se no DNA (LATT e STETTEN, 1976) e permitindo evidenciar com nitidez a morfologia do núcleo e aspectos da membrana nuclear e da cromatina. Ao final as células foram incubadas com a solução do corante pelo período mínimo de cinco minutos à temperatura ambiente e posteriormente lavadas três vezes em PBS a 10% em água destilada, montadas com *hydromount* (HS-106, National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) e examinadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão).

4.5 Documentação fotográfica

Imagens de 1392x1040 pixels obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando-se filtros UV, para rodamina e fluoresceína, em objetivas de 20x e 40x foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

As imagens gravadas foram utilizadas para contagem das células marcadas pelos anticorpos específicos e dos núcleos em seu total.

As imagens representativas da expressão dos diferentes marcadores nos diferentes estágios estudados foram selecionadas e transferidas para o programa Power Point para a montagem das pranchas. As figuras foram impressas em impressora a laser de alta qualidade.

4.6 Identificação e padrão de expressão dos anticorpos primários

Para a avaliação da positividade de uma célula marcada especificamente por cada anticorpo considerou-se o padrão de marcação previamente descrito na literatura, conforme se segue.

SSEA-1 – CTE têm a habilidade de se manterem indiferenciadas e proliferando indefinidamente *in vitro*, enquanto mantêm o potencial de diferenciar em derivados de qualquer um dos três folhetos embrionários. SSEA-1 (SOLTER e KNOWLES, 1978), assim como, SSEA-3 e SSEA-4 são marcadores que caracterizam células-tronco embrionárias e germinativas. Local de marcação: membrana (TERAMURA et al., 2009).

Oct-3/4, também denominado Oct-3 ou Oct-4 – É um fator de transcrição POU expresso em células-tronco embrionárias e germinativas totipotentes que se faz necessário para que as CT mantenham a capacidade de se auto-renovarem e sua pluripotencialidade. É considerado o maior regulador de pluripotencialidade que controla o comprometimento de linhagens específicas e é o principal e mais amplamente reconhecido marcador de CTE totipotentes, observando-se um *downregulation* à medida que a célula se diferencia. Local de marcação: núcleo (PESCE e SCHOLER, 2001).

GFAP – Marcador genérico de células acessórias da glia já bem estabelecido desde a década de 80 como marcador de astrócitos do SNC (ENG, 1985), de glia do SNE (JESSEN e MIRSKY, 1980), de células de Schwann (JESSEN, THORPE et al., 1984) e de células satélites ganglionares do SNP (JESSEN e MIRSKY, 1985). Local de marcação: citoesqueleto (HANSSON e RONNBACK, 2003).

Nestina – É um filamento intermediário classe VI expresso no SNC em desenvolvimento, nos estágios mais primários. Essa proteína é amplamente utilizada como marcador de CT e progenitoras neurais, não marcando neurônios maduros e glia (LEE et al., 2000; FREDERIKSEN e MCKAY, 1988; JOHANSSON et al., 2008). Local de marcação: citoplasma (JOHANSSON et al., 2008).

β -III tubulina – É uma isoforma neurônio específica (BAIN et al., 1995) abundante nos SNC e SNP onde é bem expressa durante as fases fetal e pós-natal do desenvolvimento, com expressão distinta de gradientes dependentes da localização da estrutura e do período de desenvolvimento. Local de marcação: citoplasma (TAY et al., 2008).

PGP 9.5 – É uma proteína citoplasmática abundante e específica de células neuronais e neuroendócrinas. Anticorpos contra essa proteína vêm sendo estabelecidos como marcadores de neurônios tanto do SNC quanto do SNP e células do sistema neuroendócrino difuso, nas quais marcam os corpos neuronais e os axônios. Local de marcação: citoplasma (ARANTES et al., 2000).

TH – É a enzima limitante (enzima final) na biossíntese da dopamina e um marcador de neurônios mesencefálicos (LEE et al., 2000), por isso aqueles neurônios marcados pelo anticorpo contra essa proteína foram admitidos como os de nosso maior interesse, neurônios dopaminérgicos. Local de marcação: citoplasma (TABUCHI et al., 2007).

4.7 Quantificação das células

As imagens obtidas conforme descrito no item 4.5 foram analisadas para quantificação de alguns dos anticorpos utilizados.

Foram capturados de 8 a 30 campos por lamínula, buscando-se obter um total de no mínimo mil células contadas por lamínula, isto é, de núcleos de células, nos aumentos de 20x e 40x, dependendo do estágio de diferenciação, o que interferiu diretamente na densidade de células por campo.

O resultado foi expresso como a média das razões entre o número de células positivas para o anticorpo em estudo e o número de núcleos contados por imagem \pm erro padrão da média (SEM). Para cada anticorpo, em cada

estágio analisado foi realizada a contagem de três a cinco lamínulas, derivadas de pelo menos três experimentos de diferenciação repetidos.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para comparar a expressão de cada anticorpo nos diferentes tempos de diferenciação. Como as amostras são pareadas e os dados não são paramétricos, o teste utilizado no programa GraphPad Prism 5.0 para se comparar todos os grupos entre si foi o *Friedman test* com *Dunn's Multiple Comparison Test*. Valores de probabilidade (p) iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 Resultados

5.1 Caracterização morfológica dos tipos celulares nos estágios progressivos

Os diversos estágios de diferenciação celular são caracterizados por presença de diversos tipos celulares, alguns predominantes, cujos aspectos citológicos estão descritos a seguir.

5.1.1 Estágio 1

Predominam células com aspecto indiferenciado. Quando marcadas pelo corante nuclear Hoechst e examinadas à fluorescência, apresentam-se alguns aglomerados de células esféricas, sem característica de diferenciação citoplasmática. Algumas apresentam o núcleo mais denso, enquanto outras o apresentam maior, com cromatina frouxa e membrana nuclear evidenciada. Alguns aglomerados apresentam células fusiformes e em alguns campos observam-se células isoladas com citoplasma volumoso, núcleos vesiculosos, por vezes com figuras de mitose evidentes (Detalhe da **Figura 1A**).

Observados em campo claro (**Figura 1A**) os aglomerados multicelulares são dispersos, tendendo a formar traves que se projetam entrem si. Algumas células dispersas isoladas são vistas entre os aglomerados. O aspecto mais escuro de algumas células indica maior densidade citoplasmática. Tal aspecto passa a predominar quando o cultivo se prolonga além dos 2-3 dias preconizados.

5.1.2 Estágio 2

As células e agregados que se aderem à placa são descartados quando da passagem para o terceiro estágio, assim, apenas a parte dos CE que permanecem em suspensão no meio é de nosso interesse. O aspecto panorâmico dos CE se apresentam em campo claro como agregados grandes e esféricos cujas células são melhor visualizadas na periferia e viáveis em sua maioria (**Figura 1B**).

5.1.3 Estágio 3

CE deixados em meio de cultivo padrão somente sem LIF (detalhado no **Quadro 2**) por 24h em substrato de gelatina passam a produzir células que se aderem fortemente ao substrato. Após a troca do meio de cultivo para meio *serum-free* ITSFn (detalhado no **Quadro 2**), os CE começam a se aplanar, indicando que as células que se proliferam tendem a se difundir na placa ao redor e à distância dos CE. Ao final dos seis dias de cultivo neste meio, os prolongamentos do citoplasma de várias células individuais já são bastante visíveis, formando ligações entre os CE e muitas vezes apoiados sobre uma monocamada de células mais planas (**Figura 1C**). Tais estruturas assemelham-se a uma rede que se torna mais evidente nos estágios subsequentes. Os aglomerados celulares, formados pelos CE aplanados, são denominados a partir deste estágio de neuroesferas (**Figura 2E**).

Nesse estágio encontramos grande heterogeneidade de núcleos e células com morfologia diferenciada (**Figuras 1C e 1D**). Grande parte das células presentes nas neuroesferas apresentam-se arredondadas, assemelhando-se às dos estágios anteriores. Em áreas próximas às neuroesferas, ao redor das mesmas, observa-se a presença de células justapostas em forma de rosetas (Detalhe da **Figura 1D**), as quais apresentam núcleos menores. Nas colorações para estruturas neurais, nestas neuroesferas são observados prolongamentos, os quais são identificados como neuritos (**Figura 4C**). Outro tipo celular visualizado com maior frequência do que nos estágios anteriores são células com morfologia semelhante à de células mesenquimais. A partir desse estágio sempre são observadas na superfície dos aglomerados muitas figuras sugestivas de apoptose.

5.1.4 Estágio 4

Mesmo após a dissociação que ocorre entre os estágios 3 e 4 a formação das neuroesferas permanece e delas se originam células com morfologia diferenciada de aspecto triangular ou poligonal, de superfície abaulada, que se projeta acima do plano do substrato, típica de neurônios, os quais emitem prolongamentos individuais, muito finos, que se conectam e às vezes apresentam aspecto em “rosário de contas” visíveis apenas nas marcações específicas (**Figura 5D**). Algumas vezes observamos corpos neuronais

alinhados como que em feixes que se conectam às neuroesferas (**Figura 6C**). Essas células (posteriormente marcadas imunofenotipicamente como neurônios), com corpos celulares e núcleos pequenos, e prolongamentos citoplasmáticos, aparentam estar superpostas a células maiores, com núcleos volumosos com aspecto mesenquimal, as quais identificamos posteriormente como células da glia (**Figuras 1E e 6F**).

5.1.5 Estágio 5

O aspecto geral permanece semelhante ao do estágio anterior (**Figura 1F**), e a presença de figuras sugestivas de apoptose se torna mais freqüente. Com a mudança do meio, observa-se aumento do número de células nas formações em roseta. O número de células com morfologia neuronal é grande e há aumento de complexidade (dicotomias, bifurcações) dos neuritos dessas células.

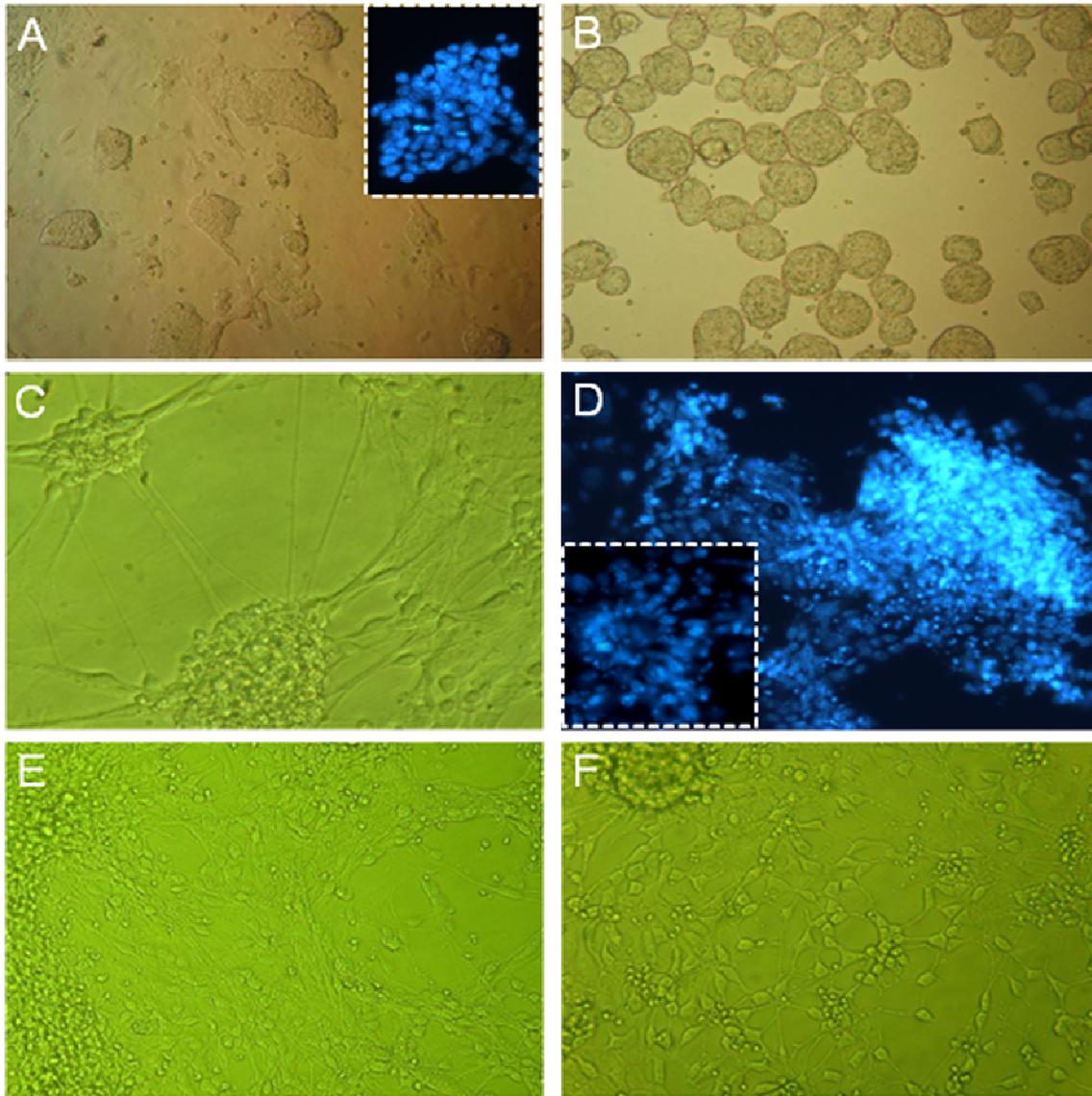


Figura 1

A Aspecto geral da cultura das células-tronco no estágio 1 em campo claro. Aumento original: 5x. Em detalhe: aspectos nucleares destas mesmas células através de marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Aumento original: 10x.

B Corpos embrióides vistos em campo claro como agregados grandes e esféricos. Aumento original: 5x.

C Aspecto da cultura do estágio 3 em meio *serum-free* ITSFn (detalhado no **Quadro 2**), evidenciando os prolongamentos do citoplasma de várias células individuais, que formam uma rede de ligação entre os corpos embrióides. Aumento original: 40x.

D Aspectos nucleares das células em cultura do estágio 3 evidenciados através de marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Aumento original: 10x. Em detalhe: aspecto de células justapostas em forma de roseta. Aumento original: 40x.

E Aspecto panorâmico do estágio 4 em campo claro. Aumento original: 20x.

F Aspecto panorâmico do estágio 5 em campo claro. Aumento original: 40x.

5.2 Caracterização imunofenotípica nos diversos estágios

Além das avaliações qualitativas descritas no item anterior (**Item 5.1, Figuras 1 a 6**) foi feita uma avaliação semi-quantitativa (**Quadro 4**), e uma avaliação quantitativa morfométrica (**Item 5.3, Gráficos 1 a 6**) dos diversos marcadores nos diferentes estágios de cultivo.

Uma vez que os CE estão em sua maioria em suspensão e devido à dificuldade de se fixar os mesmos em sua integridade, optamos por não fazer a análise sistemática dos mesmos com marcadores como nos demais estágios. Em alguns experimentos, os CE que naturalmente ficariam aderidos à placa e, portanto, seriam descartados, puderam ser recuperados quando frouxamente aderidos a algumas lamínulas que foram colocadas no fundo da placa de 60 mm. Examinamos a marcação para PGP, GFAP, e TH nas lamínulas obtidas, mas fazemos a ressalva que o material de interesse seria os CE que se manteriam suspensos, e potencialmente, passados para o estágio subsequente.

Deste modo, no segundo estágio encontramos positividade do marcador de células comprometidas com a linhagem neuronal, o PGP, enquanto não observamos positividade para GFAP ou para TH. No quarto e último dia do estágio 2, foi observado apoptose em células localizadas próximas aos CE, que ficam aderidos ao fundo da placa.

5.2.1 Caracterização imunofenotípica e semiquantificação

A caracterização imunofenotípica foi realizada para cada um dos marcadores utilizados, de acordo com o **Quadro 3**. O **Quadro 4** abaixo indica o perfil de positividade para os marcadores nos diferentes estágios de diferenciação. Os espaços vazios (*) indicam que o anticorpo não foi utilizado neste estágio.

Quadro 4 Caracterização da presença ou ausência dos marcadores nos progressivos estágios de diferenciação

	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 4	Estágio 5
SSEA-1(480)	Positivo	*	Positivo	Positivo	Positivo
Oct-3/4	Positivo	*	Positivo	*	*
GFAP	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Nestina	Positivo	*	Positivo	Positivo	Positivo
β-III tubulina	Positivo	*	Positivo	Positivo	Positivo
PGP 9.5	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
TH	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

5.2.2 Aspectos descritivos dos padrões de marcação

Os marcadores Oct-3/4 e GFAP foram estudados apenas qualitativamente, e não tiveram sua expressão imunocitoquímica quantificada.

Oct-3/4 – A marcação por este anticorpo apareceu no núcleo, e por pertencer a uma família de reguladores de fatores de transcrição que se expressa em populações celulares *in vitro* e *in vivo*, identificou no nosso material, células indiferenciadas, e cujo grau de expressão diminuiu à medida que as células se diferenciaram.

GFAP – Marcador genérico de células da glia, que evidencia o citoesqueleto, aparecendo fibrilar no citoplasma. No Estágio 3 a marcação apareceu granulosa, mas com o decorrer do protocolo a marcação passou a apresentar o padrão evidente (**Figura 6F**).

SSEA-1 – A **Figura 2** evidencia o aspecto da coloração pelo SSEA-1, marcador de CT indiferenciada, capaz de evidenciar molécula de superfície, e assim, delimita muito bem a marcação de membrana da célula.

No Estágio 1 marca a maioria das células ($75,25 \pm 2,13\%$), que se apresentam como aglomerados de células esféricas, sem tendência à diferenciação. Algumas apresentam o núcleo mais denso, enquanto outras o apresentam maior, vesiculoso. Alguns aglomerados apresentam células fusiformes (**Figura 2A**).

No Estágio 3 $25,81 \pm 1,71\%$ das células são SSEA-1+. Além de algumas células íntegras coradas, observamos grande número de restos celulares e estruturas arredondadas, semelhantes a corpos apoptóticos (**Figura 2B**).

No Estágio 4, apesar de serem raras ($2,83 \pm 0,19\%$), verifica-se a presença de células indiferenciadas, muitas vezes em grupos (**Figura 2C**) e fora das formações em rosetas. Devido às várias camadas de células superpostas há artefatos na documentação das imagens de fluorescência que aparecem em diferentes níveis de foco nos diferentes filtros utilizados (**Figura 2D**).

No Estágio 5, a marcação é muito rara ($1,67 \pm 0,11\%$) e inequívoca, em células que aparecem próximas ou mesmo dentro das neuroesferas (**Figuras 2E e 2F**), porém não são detectáveis nas formações em rosetas. Como no estágio anterior, devido às várias camadas de células superpostas há artefatos na documentação das imagens de fluorescência.

Figura 2

A Imunofluorescência para SSEA-1 no estágio 1 evidenciando em verde (Alexa Fluor 488) as margens citoplasmáticas. Marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Aumento original: 20x. Em detalhe: observar o distinto padrão de marcação da membrana (setas). Aumento original: 40x.

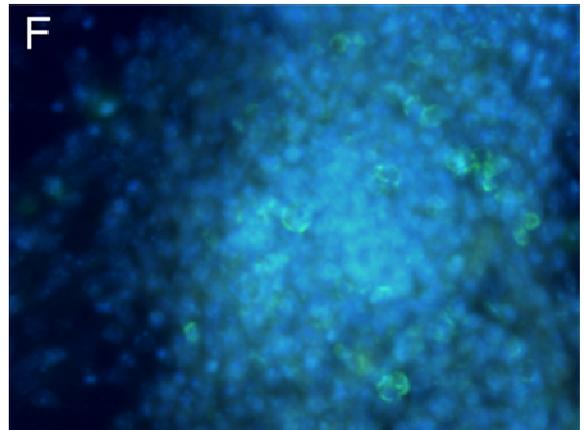
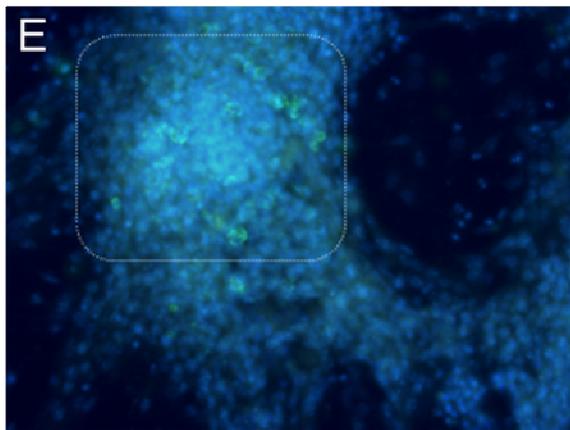
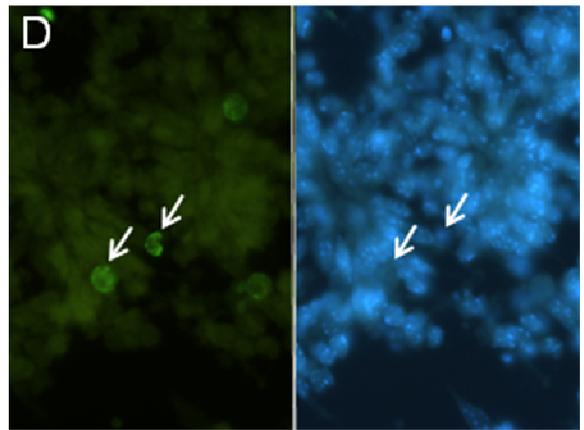
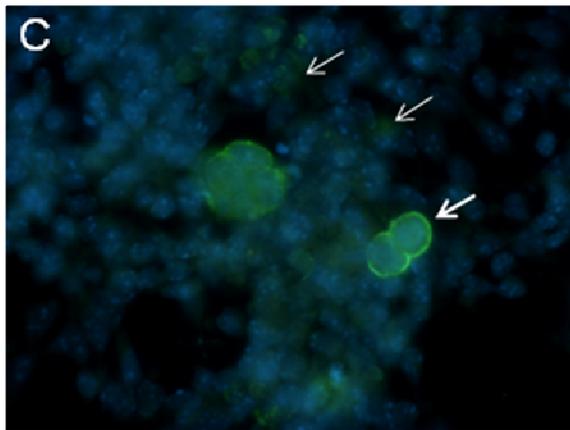
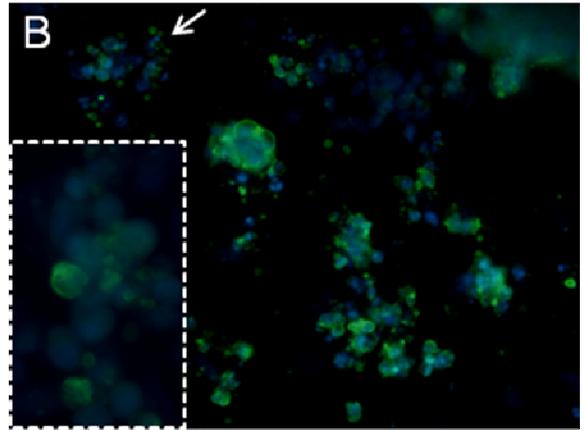
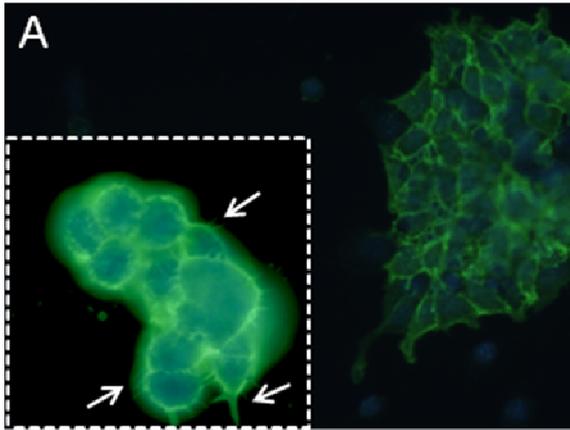
B Imunofluorescência positiva para SSEA-1 (Alexa Fluor 488, verde) no estágio 3. Observe grande número de restos celulares e estruturas arredondadas, semelhantes a corpos apoptóticos (seta). Aumento original: 20x. Em detalhe: aumento de 40x.

C Marcação para SSEA-1 no estágio 4 (seta) distinta da coloração de fundo inespecífica (setas finas). As células imunopositivas têm padrão indiferenciado. Aumento original: 40x.

D Observe imunopositividade evidente para SSEA-1 no estágio 4 (imagem à esquerda, setas) seletiva, cujos núcleos são difíceis de serem focados por estarem em diferentes níveis na preparação (imagem à direita, setas). Aumentos originais: 40x.

E Panorama de parte de uma neuroesfera pequena documentado no estágio 5. Aumento original: 10x. Em destaque parte ampliada em F.

F Amplificação da área destacada em E, para evidenciar as células imunopositivas em pequeno número nesse estágio 5. Compare com imunopositividade para PGP nas neuroesferas na Figura 5.



Nestina – A marcação pela nestina (**Figura 3**) se deu no citoplasma, com aspecto granuloso. Houve coloração de fundo, que, embora não prejudicasse a identificação das células, apareceu no material de documentação.

Alta porcentagem de células marcadas positiva e inequivocamente no Estágio 1 ($78,07 \pm 1,55\%$), diferente do descrito em outros estudos (**Figura 3A**).

No Estágio 3 observou-se acentuada diminuição na porcentagem de células positivas para nestina ($25,22 \pm 2,25\%$) e que células em mitose também foram marcadas (**Figura 3B**).

No Estágio 4 apenas $12,76 \pm 1,19\%$ das células foram nestina+. A marcação aparentou maior nitidez, entretanto algumas células ainda marcaram granulosamente. Como nos estágios anteriores estas células marcadas granulosamente foram consideradas positivas, elas continuaram sendo admitidas assim neste estágio. A marcação passa a ser mais dos prolongamentos da célula do que no corpo celular, por isso muitas vezes se percebe algo positivo no campo, mas não se encontra o núcleo da célula (**Figura 3C**).

O padrão de marcação do Estágio 5 foi muito semelhante ao do estágio anterior, apresentando em alguns campos uma positividade mais evidente, marcando $9,70 \pm 1,29\%$ das células totais (**Figuras 3D e 3E**).

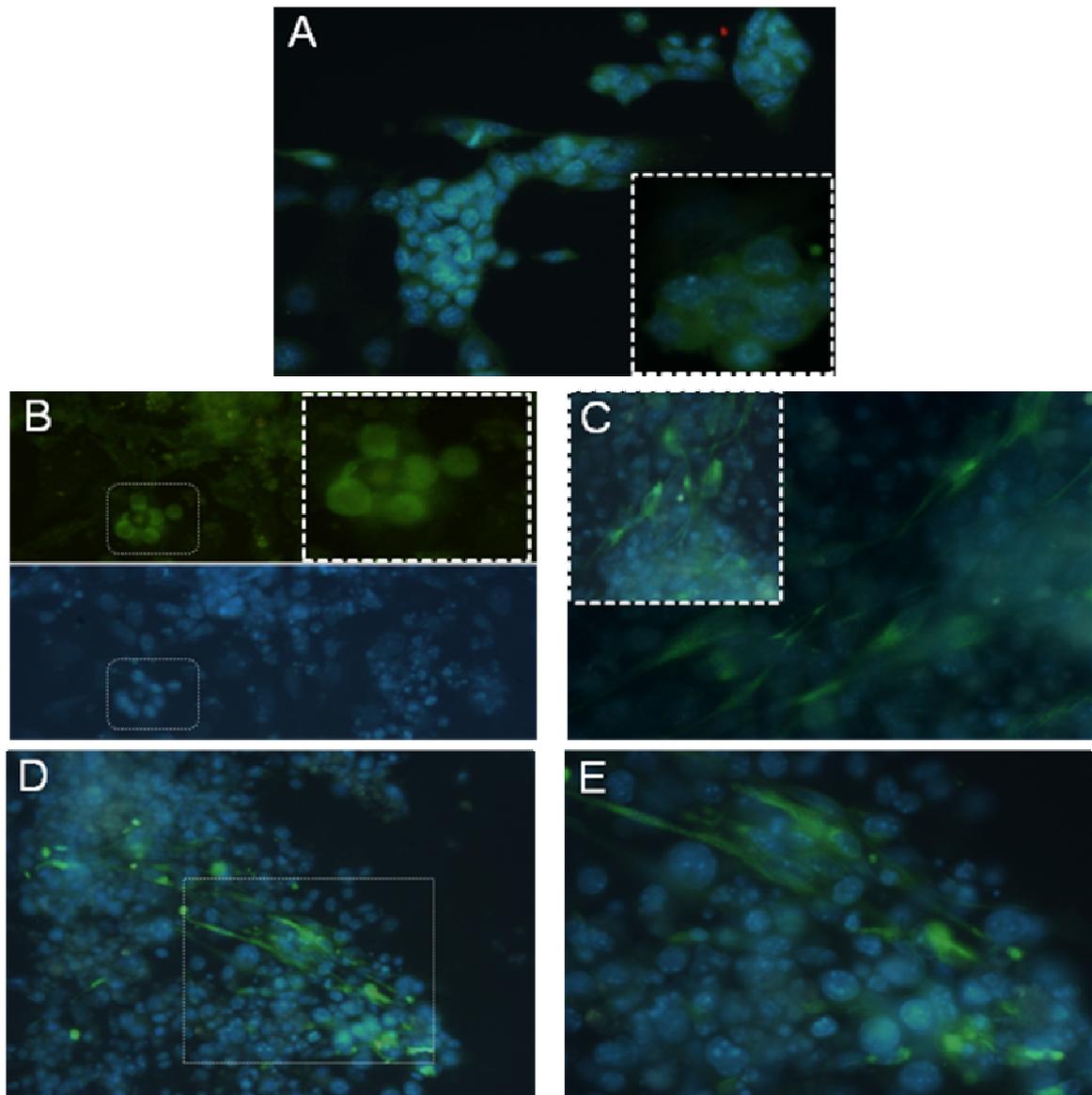


Figura 3

A Imuno-positividade citoplasmática para nestina no estágio 1. Aumento original: 20x. Em detalhe aumento de 40x.

B Observar aspectos de células nestina+ no estágio 3 marcadas por Alexa Fluor 488 (verde, parte superior) e seus respectivos núcleos marcados por Hoechst 33342 (azul, parte inferior). Aumentos originais: 20x. Destacado e em detalhe, observar o aspecto da coloração citoplasmática (aumento original: 40x).

C Aspecto da imuno-fluorescência para nestina no estágio 4 mostrando positividade nos prolongamentos de células cujos núcleos não estão visíveis, documentados na borda de um grupamento celular denso. Aumento original: 40x. Em detalhe, do lado superior esquerdo, aumento de 20x.

D Aspecto panorâmico da imuno-positividade para nestina no estágio 5. Em destaque parte que foi ampliada em E. Aumento original: 20x.

E Maior detalhamento da marcação pela nestina no estágio 5 evidenciando o aspecto alongado do citoplasma e diferentes graus de intensidade de marcação. Aumento original: 40x.

β -III tubulina – A marcação é citoplasmática e muito evidente, podendo marcar prolongamentos (**Figura 4**).

No Estágio 1, $60,76\pm 1,64\%$ das células foram marcadas positivamente (**Figura 4A**).

No Estágio 3 observou-se boa marcação tanto do corpo celular, quanto dos prolongamentos, inclusive evidenciando regiões mais dilatadas dos neuritos (prováveis varicosidades sinápticas) (**Figuras 4B e 4C**), marcando $6,36\pm 0,51\%$ do total de células. Células com esta morfologia geralmente estão localizadas ao redor das neuroesferas, todavia são observadas não somente nas rosetas, mas também em outros campos. Há muitos restos celulares marcados neste estágio, o que dá aspecto de marcação em grãos grosseiros e de fragmentos citoplasmáticos anucleares.

No Estágio 4, assim como no estágio anterior, há muita marcação de restos celulares e $6,53\pm 0,45\%$ das células foram positivas. Nas células íntegras, o corpo celular e os prolongamentos citoplasmáticos foram evidentemente marcados (**Figuras 4D e 4E**).

O padrão de expressão da β -III tubulina no Estágio 5 foi semelhante ao do estágio anterior, marcando $8,45\pm 1,47\%$ do total de células, embora tenha sido observada abundante presença de restos celulares (**Figuras 4F e 4G**).

Figura 4

A Imunofluorescência para β -III tubulina no estágio 1 por Alexa Fluor 488 (verde, imagem à esquerda) e marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul) (imagem à direita) evidenciando os aspectos nucleares e do citoplasma das células características deste estágio. Aumento original: 20x.

B Aspecto geral da imunofluorescência para β -III tubulina no estágio 3 por Alexa Fluor 488 (verde). Observe marcação evidente dos prolongamentos, inclusive das estruturas varicosas (setas). Aumento original: 20x.

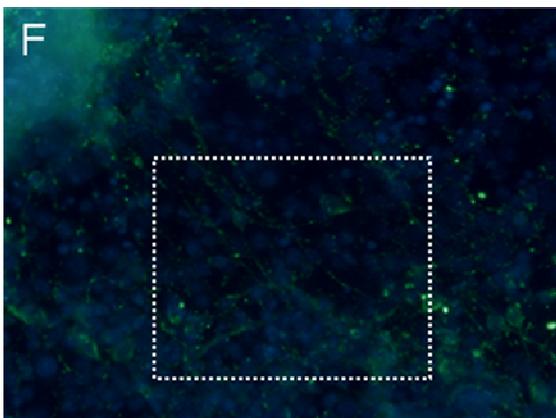
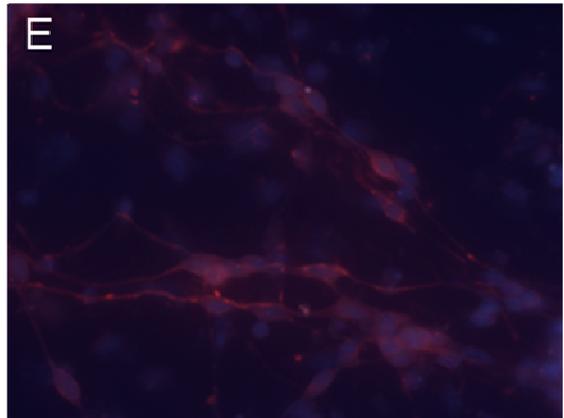
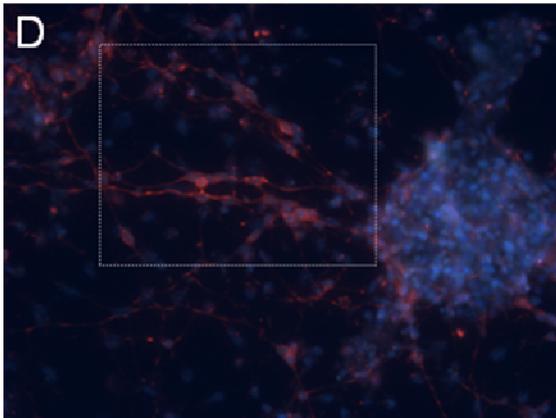
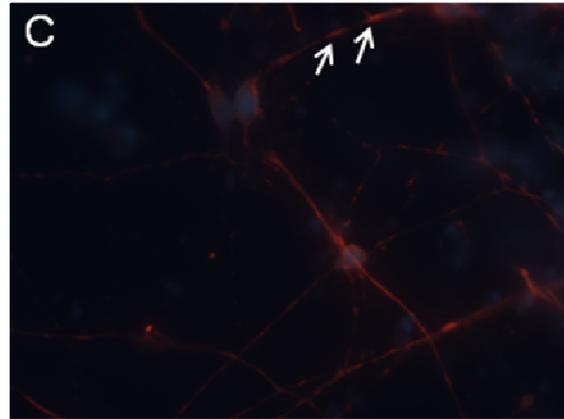
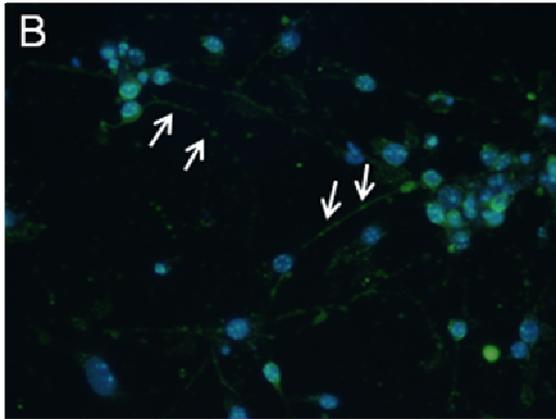
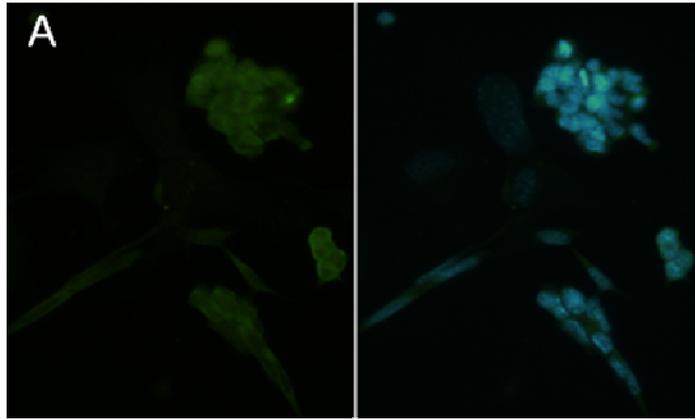
C β -III tubulina no estágio 3 por Alexa Fluor 546 (vermelho), com melhor visibilidade dos prolongamentos, inclusive das estruturas varicosas (setas). Aumento original: 40x.

D Aspecto geral da imunofluorescência para β -III tubulina no estágio 4 por Alexa Fluor 546 (vermelho). Observe marcação evidente dos prolongamentos, inclusive das varicosidades sinápticas. Em destaque parte ampliada em E. Aumento original: 20x.

E Maior detalhamento da imunofluorescência para β -III tubulina no estágio 5 vista em D. Aumento original: 40x.

F Aspecto geral da imunofluorescência para β -III tubulina no estágio 5 por Alexa Fluor 488 (verde). Em destaque parte ampliada em G. Aumento original: 20x.

G Maior detalhamento da imunofluorescência para β -III tubulina no estágio 5 vista em F. Aumento original: 40x.



PGP 9.5 – A marcação é citoplasmática, evidenciando tanto corpo celular, quanto prolongamentos neuronais (**Figura 5**).

No Estágio 1, a maioria das $82,66 \pm 1,89\%$ das células marcadas estavam presente nos grandes aglomerados e apresentaram marcação intensa. Os corpos marcados eram arredondados, com alguns prolongamentos muito curtos, visíveis principalmente nas células da periferia dos aglomerados. Havia algumas células pavimentosas distribuídas entre os aglomerados, que apesar de núcleo visível, de aspecto viável, não se coraram pela PGP 9.5 (**Figura 5A**).

A quantidade de células imunopositivas reduziu no Estágio 3 ($19,58 \pm 2,49\%$), entretanto o que foi marcado permaneceu nítido. Observou-se marcação evidente de neuritos, inclusive com suas expansões bem delimitadas, e presença de células mesenquimais não coradas (**Figura 5B**).

No Estágio 4 houve discreto aumento na porcentagem de células marcadas ($22,86 \pm 1,25\%$). A coloração de fundo esteve presente, embora facilmente distinguível do material especificamente positivo. Observou-se imunopositividade próximo as formações em rosetas e dentro das neuroesferas, indicando conexão entre as neuroesferas, inclusive devido à grande presença de neuritos (**Figuras 5C e 5D**).

Para o Estágio 5, a imagem panorâmica evidencia a presença de grande número de células PGP+, clara distribuição em rosetas e neuroesferas, nas quais grande número de células foi marcado (**Figura 5E**). Observou-se imunopositividade bastante evidente tanto dos corpos neuronais, quanto dos neuritos, inclusive evidenciando suas expansões, as quais foram identificadas como varicosidades sinápticas (**Figura 5F**). Do total de células, $20,80 \pm 1,95\%$ foram PGP+.

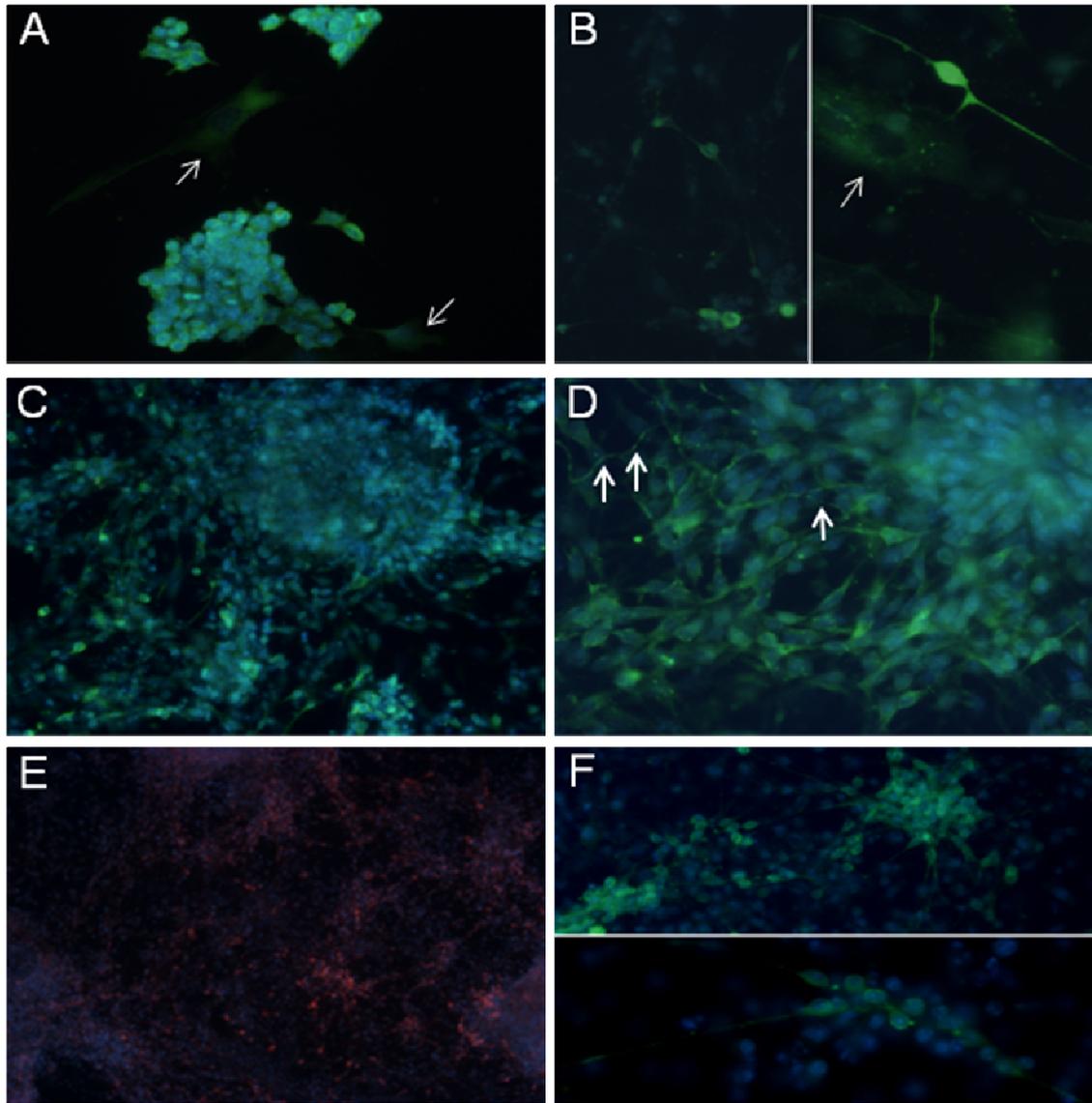


Figura 5

A Imuno-fluorescência por Alexa Fluor 488 (verde) para PGP 9.5 no estágio 1 e marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Observe setas finas indicando células marcadas inespecificamente. Aumento original: 20x.

B Aspecto geral da imuno-positividade para PGP 9.5 no estágio 3. Observe marcação evidente, em contraste à marcação inespecífica de células mesenquimais (seta fina, imagem à direita). Aumentos originais: 20x à esquerda e 40x à direita.

C Aspecto geral da imuno-positividade para PGP 9.5 no estágio 4. Aumento original: 20x.

D Observe detalhes da marcação dos neuritos e das varicosidades sinápticas (setas) para PGP 9.5 em células do estágio 4. Aumento original: 40x.

E Aspecto geral da imuno-fluorescência por Alexa Fluor 546 (vermelho) para PGP 9.5 no estágio 5. Aumento original: 10x.

F Aspecto geral da imuno-fluorescência para PGP 9.5 em células do estágio 5 por Alexa Fluor 488 (verde). Observe marcação dos neuritos, formando rede de conexão entre as neuroesferas (imagem superior, em aumento original de 20x). Imagem inferior evidencia marcação em aumento de 40x.

TH – A marcação ocorrida no citoplasma das células não foi muito boa, embora suficiente para evidenciar a positividade do anticorpo, tanto no corpo celular, quanto nos prolongamentos neuronais (**Figura 6**).

No Estágio 1 a marcação se apresentou forte em algumas células e também granulosa em outras, sendo num total de $83,44 \pm 1,74\%$ das células marcadas (**Figura 6A**).

No Estágio 3, observou-se tanto positividade evidente, quanto marcação granulosa dos corpos neuronais e das varicosidades sinápticas, sendo a marcação granulosa considerada positiva, assim como o foi nos demais estágios. No total de células em cultura $12,20 \pm 1,53\%$ foram TH+ (**Figura 6B**).

Observou-se queda na porcentagem de TH+ no Estágio 4 ($8,01 \pm 1,49\%$), sendo a marcação semelhante à do estágio anterior (**Figura 6C**).

A marcação no Estágio 5 também foi semelhante à dos estágios anteriores, em um total de $11,95 \pm 1,52\%$ TH+. Observou-se marcação de células presentes nas neuroesferas e daquelas que parecem “sair” destas e conectá-las (**Figura 6D**). Em alguns campos a positividade dos corpos neuronais é bastante nítida (**Figura 6E**).

Figura 6

A Aspecto geral da imunofluorescência para TH em células-tronco embrionárias do estágio 1 por Alexa Fluor 488 (verde, imagem superior). Observe marcação granulosa (seta fina) e marcação forte (setas grossas) evidenciando alta taxa de células positivas. Na imagem inferior, marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Aumentos originais: 20x.

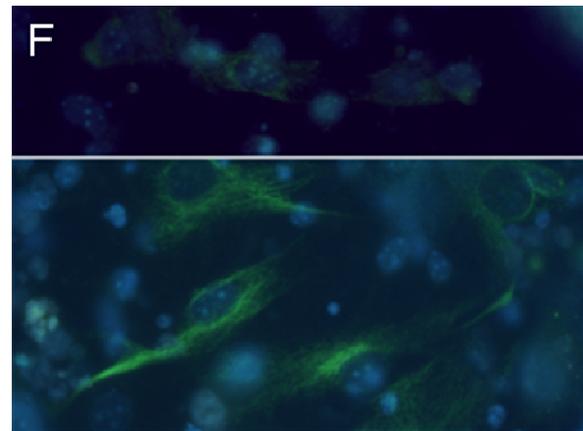
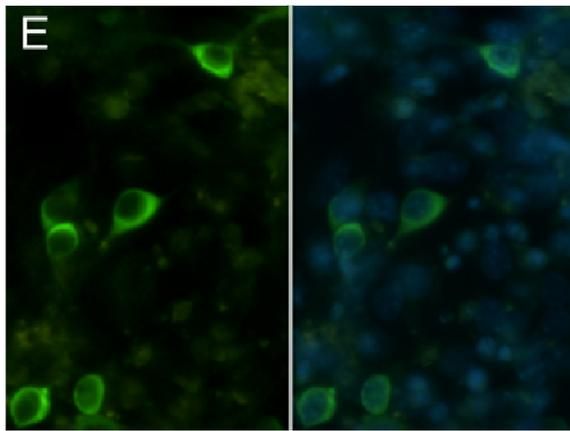
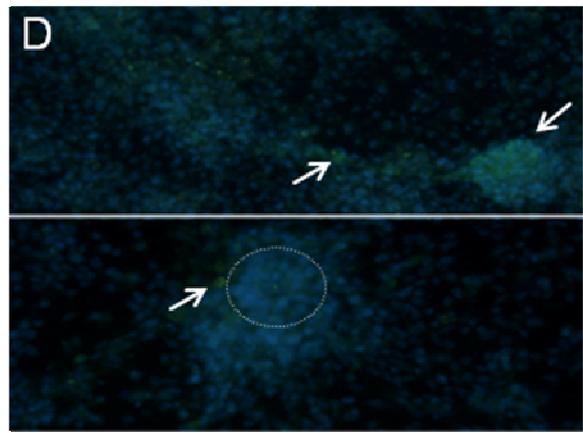
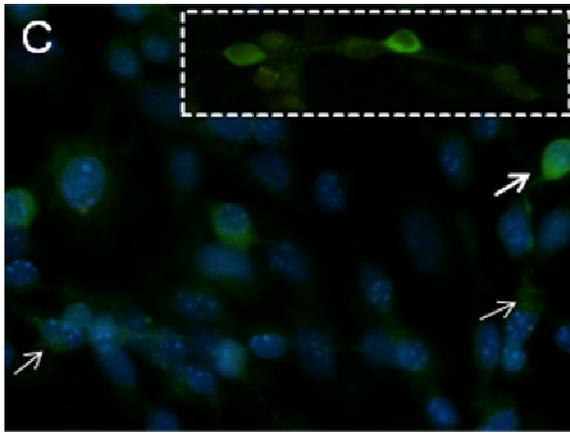
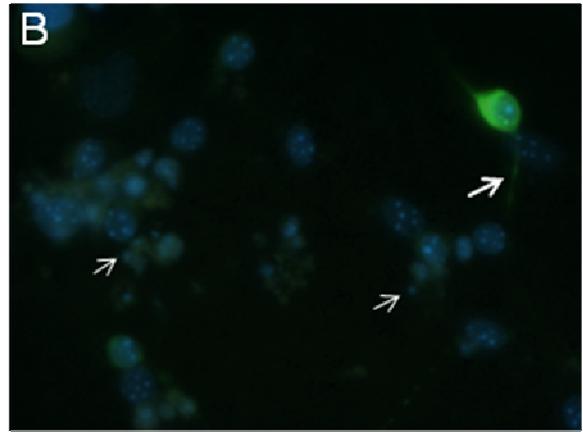
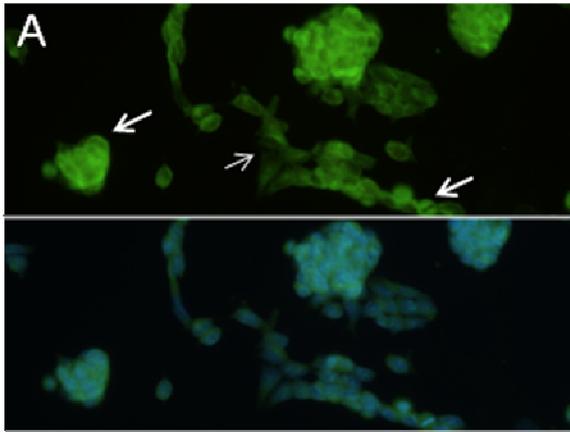
B Imunofluorescência para TH em células do estágio 3. Observe marcação bastante evidente de célula com varicosidades sinápticas (seta grossa) e restos celulares (setas finas). Aumento original: 40x.

C Aspecto da imunofluorescência para TH em células do estágio 4. Observar coloração evidente (seta grossa) e marcação granulosa do citoplasma neuronal (setas finas). Em destaque na parte superior, feixe de corpos neuronais proveniente de outro campo de observação. Aumento original: 40x.

D Na imagem superior, aspecto geral da imunofluorescência para TH no estágio 5 por Alexa Fluor 488 (verde, setas) e marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Aumento original: 10x. Na imagem inferior observar positividade próxima à roseta (em destaque). Aumento original: 20x.

E Imunofluorescência para TH no estágio 5. Marcação evidente. À esquerda somente a marcação por Alexa Fluor 488 (verde) e à direita esta mesma marcação juntamente com a marcação nuclear por sonda fluorescente Hoechst 33342 (azul). Aumentos originais: 40x.

F Imunofluorescência para GFAP nos estágios 3 (parte superior) e 5 (parte inferior), demonstrando marcação granulosa e evidente, respectivamente.



5.3 Quantificação da expressão dos diversos marcadores ao longo dos estágios

Conforme descrito, foram quantificadas células que apresentaram marcação imunofenotípica para os marcadores de indiferenciação e diferenciação celular SSEA-1, nestina, β -III tubulina, PGP e TH. O número total de células foi considerado igual ao número de núcleos celulares contados, sendo as células positivas aquelas nas quais visualizamos o núcleo e a marcação do citoplasma ou membrana correspondente.

De forma abrangente, no decorrer dos estágios, a marcação dos anticorpos no estágio 1 foi bastante elevada, sendo sempre reduzida nos estágios em diferenciação e diferenciado, conforme pode ser visto no **Gráfico 1** abaixo, o qual apresenta uma visão geral do que será analisado adiante.

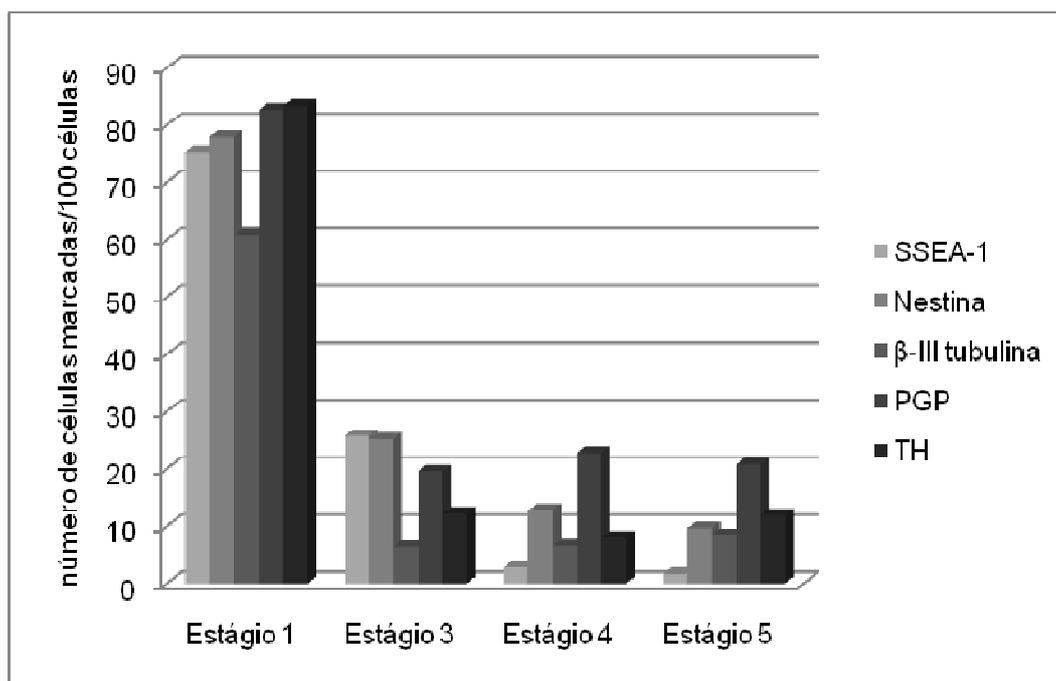


Gráfico 1 Porcentagem de células marcadas contra os anticorpos anti-SSEA-1, anti-nestina, anti- β -III tubulina, anti-PGP e anti-TH nos estágios 1, 3, 4 e 5 do nosso protocolo de diferenciação. Foram analisadas 3-6 lamínulas obtidas de pelo menos 3 experimentos repetidos para cada anticorpo, em cada um dos estágios.

Com a diferenciação celular espera-se observar cada vez menos células SSEA-1+, sendo que o objetivo seria extinguir a presença de células indiferenciadas ao final do nosso cultivo. Obtivemos uma redução bastante significativa das células SSEA-1+ (**Gráfico 2**).

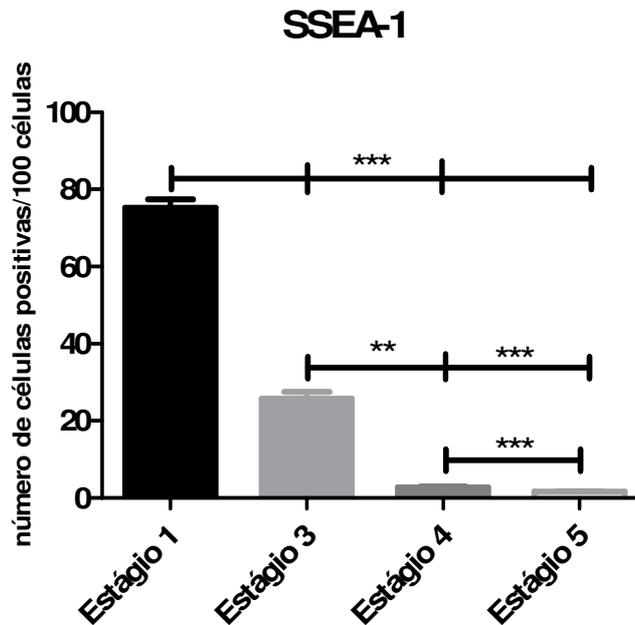


Gráfico 2 Porcentagem de células SSEA-1+ nos subsequentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas desde o primeiro estágio até o último. N=54 campos obtidos a partir de 3-6 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao 3, ao 4 e ao 5, estágio 3 em relação ao 5, e estágio 4 em relação ao 5; ** $p < 0,001$ estágio 3 em relação ao 4. Teste de Friedman e pós teste Dunn.

O marcador de precursor neural, nestina, apresentou redução contínua no número de células positivas no decorrer dos estágios de diferenciação, o que se justifica pelo fato de que as células que se direcionam para uma posterior diferenciação neuronal perdem a positividade para esse marcador (**Gráfico 3**).

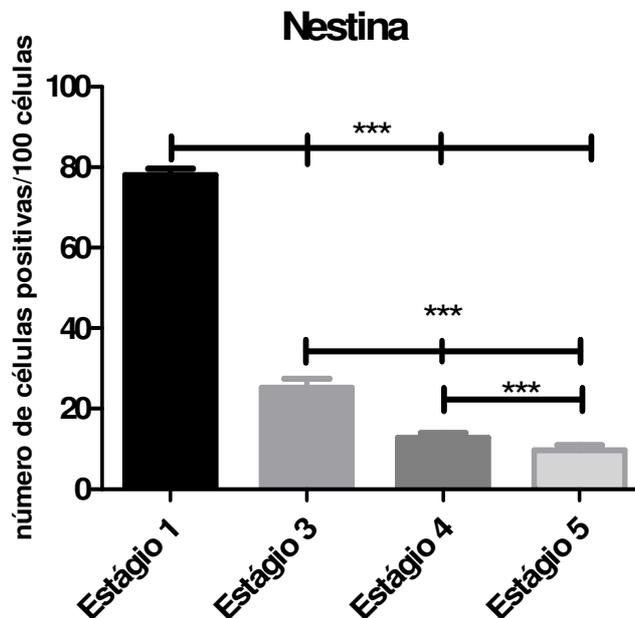


Gráfico 3 Porcentagem de células marcadas positivamente contra o anticorpo anti-nestina nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais e no decorrer da diferenciação. N=56 campos obtidos a partir de 3-5 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5, e estágio 3 em relação ao 4 e ao 5, e estágio 4 em relação ao 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.

O número de células β -III tubulina+ praticamente se manteve estável desde o estágio 3 até o estágio 5 (**Gráfico 4**).

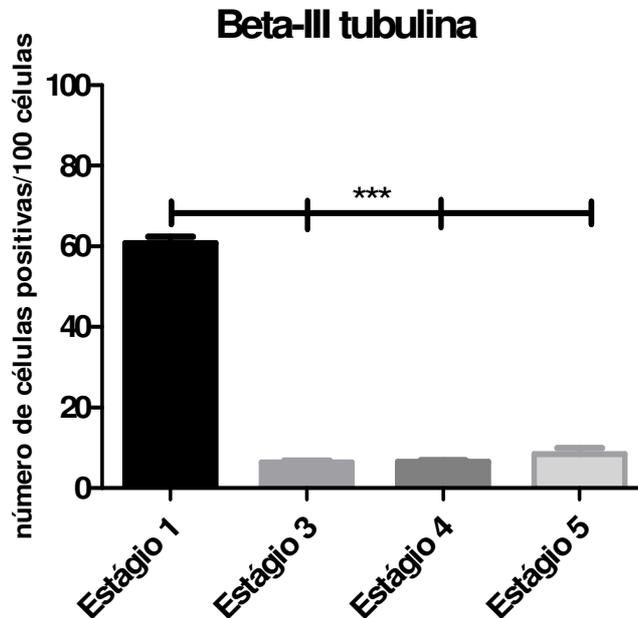


Gráfico 4 Porcentagem de células marcadas positivamente pelo anticorpo anti- β III tubulina nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais. Entre os estágios 3 a 5 observa-se que a porcentagem de células positivas permanece praticamente inalterada. N=53 campos obtidos a partir de 3-4 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.

Já o marcador pan-neuronal PGP teve variações durante o processo de diferenciação. Entre os estágios de seleção e de expansão das células nestina+ (estágios 3 e 4, respectivamente), o número de neurônios aumentou. Já entre os estágios 4 e 5 observou-se uma diminuição deste marcador, indicando que parte desses neurônios podem ter morrido. Apesar disso, se compararmos os estágios 3 e 5 observaremos que o percentual de células positivas praticamente se manteve estável (**Gráfico 5**).

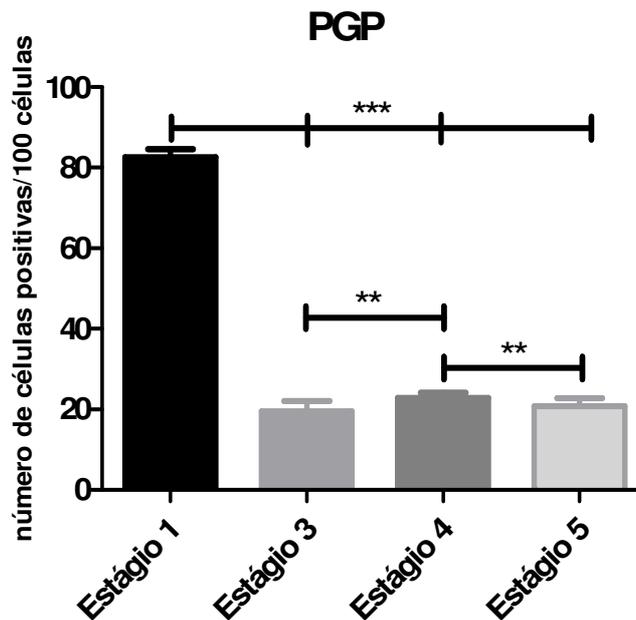


Gráfico 5 Porcentagem de células PGP+ nos subseqüentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais. Entre os estágios de diferenciação neural/neuronal observa-se uma tendência à estabilidade do número de células PGP+ a despeito das diferenças estatísticas no aumento do número de células marcadas entre os estágios 3 e 4 e na redução de positividade entre os estágios 4 e 5. N=58 campos obtidos a partir de 3-5 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5; ** $p < 0,001$ estágio 3 em relação ao 4, e estágio 4 em relação ao 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.

Finalmente, a quantidade de neurônios dopaminérgicos, isto é, de células TH+, obtida através do nosso protocolo foi satisfatória, mesmo sendo observada uma redução de marcação no estágio 4 (**Gráfico 6**).

A variação ocorrida entre as lamínulas estudadas tanto no estágio 4, quanto no 5, foi grande. No estágio 4 observamos uma lamínula na qual obtivemos em torno de 50% de TH+, enquanto nas outras quatro lamínulas obtivemos aproximadamente 1,7% em duas delas e nas outras duas 3,5% e 8%. No estágio 5 obtivemos duas lamínulas em torno de 25% e outras duas em torno de 2,5-3%.

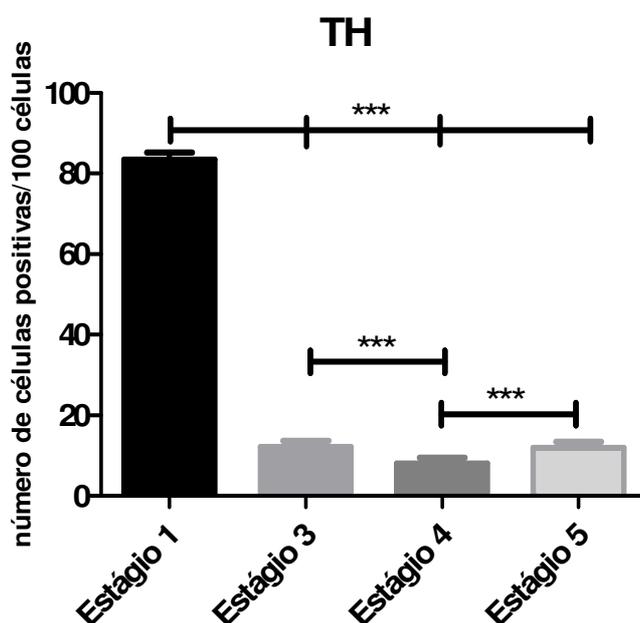


Gráfico 6 Porcentagem de células TH+ nos subsequentes estágios de diferenciação. Diminuição significativa do número de células positivas do primeiro estágio para os demais. Entre os estágios de diferenciação neural/neuronal observa-se uma tendência à estabilidade do número de células TH+ a despeito das diferenças estatísticas observadas entre os estágios 3 e 4, e 4 e 5. N=64 campos obtidos a partir de 3-5 lamínulas derivadas de pelo menos 3 experimentos distintos. *** $p < 0,0001$ estágio 1 em relação ao estágios 3, 4 e 5, estágio 3 em relação ao 4, e estágio 4 em relação ao 5. Teste de Friedman e pós teste Dunn.

6 Discussão

Nas últimas décadas, numerosos estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de obter-se uma metodologia para indução de diferenciação de células funcionais a partir de CTE. Esses estudos têm demonstrado que as CTE podem se diferenciar em diversos tipos celulares *in vitro*, e que essa diferenciação mimetiza parcialmente a embriogênese, indicando a utilidade das CTE como um modelo do desenvolvimento embrionário de camundongos (OHSE et al., 2009). Em particular, muitos estudos vêm sendo feitos no sentido da diferenciação neuronal. CE são formados a partir de culturas de CTE em suspensão em meio sem LIF, e o ácido retinóico promove a diferenciação neural dos CE eficientemente (BAIN et al., 1995). LEE et al. (2000) aperfeiçoaram esse método para induzir neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos através da seleção e expansão de precursores neurais a partir desses CE.

O protocolo realizado no presente estudo para diferenciação das CTE em neurônios foi baseado em estudos anteriores, com algumas modificações (OKABE et al., 1996, LEE et al., 2000 e NISHIMURA et al., 2006). O **Quadro 5** abaixo apresenta os resultados obtidos por esses autores em comparação com os nossos resultados para facilitar a discussão que se segue.

Quadro 5 Resultados dos protocolos relacionados nesse estudo

	OKABE et al., 1996	LEE et al., 2000	NISHIMURA et al., 2006	Protocolo realizado
Estágio 1	Até a colocação dos CE em camada de substrato permissiva, relata a não existência de células de nenhuma linhagem neural (mas não mostra os dados).			SSEA-1 – 75% Nestina – 78% β-III tubulina – 61% PGP – 83% TH – 83%
Estágio 3	Durante as 72h iniciais na cultura com meio ITSFn relata lise de parte das células e as que restam mudam sua morfologia - de células epiteliais 'empacotadas', para células pequenas e alongadas. Após 5-7 dias no mesmo meio, grande parte das células assume essa morfologia alongada. 84% de células nestina+ após cultivo neste meio por 6-8 dias.			SSEA-1 – 26% Nestina – 25% β-III tubulina – 6% PGP – 20% TH – 12%
Estágio 4	80% de células nestina+. 10-15% de MAP-2+. 2% de GFAP+. Nenhuma O4+ ou Gal-C+. Marcaram também a proliferação celular e viram que 90% das BrdU+ eram nestina+, enquanto menos de 1% das BrdU+ eram MAP-2+.	15% TUJ1+		SSEA-1 – 3% Nestina – 13% β-III tubulina – 7% PGP – 23% TH – 8%
Estágio 5	Após 4 dias da retirada do bFGF, observa uma diminuição das células nestina+ e um aumento de MAP-2+ (>60% do total de células). Reduz também o número de células total.	72% TUJ1+ e dessas 7% TH+. Depois do tratamento com Shh-N/FGF-8 no estágio 4 e AA no estágio 5 obtiveram 40% de TH+ dos neurônios (>40 campos com 4,2x10 ³ neurônios), o que corresponde a 20% do número total de células.	10% GFAP+ 5% nestina+ 80% MAP-2+ 32% TH+	SSEA-1 – 2% Nestina – 10% β-III tubulina – 8% PGP – 21% TH – 12%

O número de células plaqueadas no estágio 1 por NISHIMURA et al. (2006) foi de 5×10^5 em placa de petri de 9 cm de diâmetro, mas no mesmo estudo e na literatura também está descrito o cultivo de estágio indiferenciado com sucesso sem a necessidade de contagem precisa deste número de células indiferenciadas plaqueadas em cada passagem (LEE et al., 2000; TAVARES et al., 2007), como foi o caso do nosso protocolo.

Para cultivo e expansão das CTE em estágio indiferenciado frequentemente é utilizada uma camada celular de fibroblastos, que funciona como nutridora e produtora de LIF, elemento essencial para o crescimento das CTE *in vitro*. Entretanto, a utilização da gelatina como substrato no cultivo de CTE pode substituir a camada de fibroblastos, mas exige a suplementação do meio de cultivo com LIF (ABBONDANZO et al., 1993), como foi o caso do nosso protocolo.

As CTE são muito sensíveis ao tipo e à qualidade do soro no qual elas são cultivadas, por isso a enorme importância dada a esse fator. É sabido que o SFB varia em cada lote e de acordo com o fabricante, principalmente na oferta de fatores de crescimento não caracterizados e de fatores protéicos que funcionam como ligantes de receptores de superfície, de forma não controlada, ativando ou desativando vias de sinalização intracelulares, muitas das quais ainda desconhecidas. Por tal razão é essencial que se teste qual o melhor lote deste soro no cultivo das células em questão, como fator determinante entre sucesso e fracasso do cultivo (ABBONDANZO et al., 1993; NAGY et al., 2003; NISHIMURA et al., 2006). O SFB utilizado por nós mostrou-se eficaz no cultivo celular indiferenciado, pois conseguimos manter tal cultivo por até nove meses seguidos, em experimentos prévios até a passagem 136. Por isso nosso cultivo foi realizado sempre com a mesma linhagem de CT (CT-4) e o SFB era proveniente do mesmo lote.

Também são relatados protocolos de cultivo sem soro nesse primeiro estágio, no intuito de verificar qual seria o destino de células cultivadas sem influência externa. Essas células são dissociadas e a tentativa é de mantê-las afastadas, para que fatores extrínsecos liberados por determinada célula não afete o destino da outra. Nesse tipo de cultivo de condições mínimas foi relatado que logo após quatro horas de cultivo 90% das células eram nestina+, indicando um destino neural “default” (SMUKLER et al., 2006).

No estágio 1 todos os protocolos listados nos **Quadros 1 e 5** são muito semelhantes entre si, utilizando componentes similares no meio, embora com pequena variação das concentrações dos elementos ativos no meio requerido, o que pode variar de acordo com as demandas de cada linhagem de CTE.

Alguns protocolos utilizam o DMEM (NISHIMURA et al., 2006), enquanto outros utilizam o KO-DMEM (LEE et al., 2000), assim como fizemos no nosso protocolo, uma vez que sabe-se que os produtos *knockout*, como KO-DMEM e KOSR apresentam uma osmolaridade menor, mimetizando melhor o ambiente embrionário (CHENG et al., 2004).

O meio deve ser armazenado no escuro a 4°C para evitar a quebra de vitaminas, e mesmo a 4°C, quando contém glutamina misturada com soro, o período de armazenamento é ainda menor e torna-se necessário suplementá-lo com L-glutamina após um período de estocagem superior a 14 dias. Esse fato deve-se à instabilidade deste aminoácido quando na presença de soro, pois este contém glutaminase, que oxida a glutamina em ácido glutâmico. A L-glutamina melhora o desempenho do sistema de cultivo celular de mamíferos, devido a sua importância para o metabolismo celular (NAGY et al., 2003). Nosso protocolo utilizou meios de cultivo armazenados por até 14 dias e suplementados com L-glutamina.

Encontramos grande positividade dos diversos marcadores no estágio 1, inclusive daqueles de precursores neurais e neuronais, o que não foi relatado por nenhum dos artigos nos quais nos baseamos. HEMMATI-BRIVANLOU e MELTON (1997) afirmam que a indução de diferenciação neural de células embrionárias parece ocorrer quando as células não recebem nenhum outro sinal que as induza a epiderme, mesoderma ou endoderma. Outros autores também demonstraram que CTE irão gerar neuroectoderma quando diferenciadas como CE ou como monocamadas na ausência de soro e de moléculas indutivas (WILES e JOHANSSON, 1999; YING et al., 2003), mas afirmam que essa diferenciação para neuroectoderma nessas culturas não parece ser dependente de FGF (YING et al., 2003), diferentemente do afirmado por OKABE et al. (1996) e LEE et al. (2000), discutido adiante. SMUKLER et al. (2006) corroboram a teoria do destino neural “default” com a informação de que CTE de camundongos cultivadas em meio sem soro e sem fatores de crescimento adquirem um destino neural “primitivo” na ausência de bFGF

exógeno ou parácrino. Todavia, sem a adição de fatores de crescimento, as células não são capazes de sobreviverem e proliferarem. Portanto, o papel do bFGF parece ser dispensável nos estágios iniciais da diferenciação, mas se torna importante mais tarde, para sustentar a sobrevivência, a proliferação e a posterior diferenciação, o que foi comprovado no presente estudo e em estudos anteriores (OKABE et al., 1996, LEE et al., 2000 e NISHIMURA et al., 2006).

Quando da formação dos CE (estágio 2) optamos pelo uso do KOSR, pois o SFB pode conter complementos inibidores da diferenciação neuronal, embora seu uso não tenha apresentado nenhum problema (NISHIMURA et al., 2006). No intuito de permitir a diferenciação na direção dos folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, o LIF também foi retirado e o cultivo celular foi mantido em suspensão por quatro dias. Após este período, os trabalhos relatam o cultivo celular em camada aderente por 24h e, logo a seguir, muda-se o meio para iniciar o estágio 3. Nosso protocolo manteve estas etapas de forma similar. Este estágio 2 não foi incluído em nossa análise quantitativa devido à impossibilidade de obter, isolar e analisar os CE sobrenadantes, que são aqueles utilizados na sequência da progressão nos estágios de diferenciação. Os resultados qualitativos obtidos nesse estágio são provenientes de células que ficaram aderidas às lamínulas colocadas no fundo da placa quando da passagem do estágio 2 para o 3, e não são representativos do material transferido para as etapas seguintes.

No estágio de diferenciação, protocolos direcionados para endoderma e mesoderma mantêm soro no meio de cultivo. Em contraste, protocolos de diferenciação para ectoderma são caracterizados pela omissão do soro. Trabalho feito em CTE de camundongos demonstrou que a diferenciação neuronal aumentou em meio sem soro (OKABE et al., 1996), sugerindo então a presença de sinais inibidores no soro, tais como os membros da família BMP (proteína morfogenética óssea) (YING et al., 2003; SUTER e KRAUSE, 2008). Apesar do uso empírico nesses protocolos, o papel preciso de todos os componentes do soro na diferenciação celular ainda não está bem elucidado na literatura. Tendo em vista que muitos protocolos de diferenciação neuronal são apresentados em condições livre de soro, se faz necessário adicionar suplementos. Conforme apresentado no **Quadro 1**, para cada estágio foram

adicionados ou suprimidos diferentes elementos, nos diversos protocolos em comparação com o nosso.

Portanto, no estágio 3 passou-se a usar o DMEM/F12 suplementado com insulina, transferrina, selênio e fibronectina (meio ITSFn), que foi incluído no protocolo de OKABE et al. (1996) por ter sido demonstrado anteriormente eficaz na indução neuronal de linhagens de células de carcinoma embrionário (RIZZINO e GROWLEY, 1980), dando início ao processo de diferenciação neural. Nessa fase todos os protocolos relacionados no presente estudo são semelhantes, exceto pelo fato de que mantivemos o cultivo por estritos seis dias, enquanto os outros estudos relatam de seis a oito dias (OKABE et al., 1996) e de seis a dez dias (LEE et al., 2000 e NISHIMURA et al., 2006), o que pode ter reduzido a quantidade de precursores neurais obtidos em nosso protocolo ao final deste período, já que, a despeito das limitações na quantificação, OKABE et al. (1996) relatam 84% de células nestina+ com até oito dias de cultivo deste estágio, enquanto nós obtivemos 25%.

Para quantificar a densidade celular OKABE et al. (1996) fizeram a média de oito campos por lamínula em magnitude de 200x, em três ou cinco experimentos independentes. JOHE et al. (1996) contou pelo menos cinco campos por amostra em magnitude de 400x, em um total de mais de mil células por amostra para determinar a imunoreatividade dos anticorpos utilizados. LEE et al. (2000) utilizaram uma técnica de contagem não muito clara, entretanto coloca que sua quantificação dos anticorpos estudados se deu a partir de três experimentos independentes, em um total de mais de quarenta campos. Portanto, percebe-se que não há um padrão nessa quantificação. Nós contamos de 8 a 30 campos por lamínula, em magnitudes de 20x ou 40x dependendo do estágio de diferenciação, já que isto interferia diretamente na densidade de células por campo, e procuramos contar no mínimo mil células por lamínula. Realizamos de três a seis experimentos. Para realizarmos o teste estatístico consideramos como nosso N amostral em cada estágio, todos os campos observados e tivemos que fazer uma adaptação em nosso banco de dados, nivelando todos os estágios pelo o que apresentava menor número de campos contados.

A partir do estágio 3 passaram a ser identificadas células com morfologia diferenciada semelhante a neurônios, com neuritos visíveis. Além disso, foram

visualizadas formações em roseta, as quais foram relatadas na literatura como estruturas que contêm CT precursoras neurais (ELKABETZ et al., 2008). Neste estágio também verificamos presença significativa de todos os marcadores analisados. Observou-se que as quantidades de células indiferenciadas (SSEA-1+) e de precursores neurais (nestina+) foram semelhantes, em torno de 25%, o que pode ter ocorrido devido ao fato deste ser um estágio intermediário de nosso protocolo de diferenciação.

OKABE et al. (1996) afirmam não haver células da linhagem neural na cultura antes do estágio que corresponde ao estágio 3 do nosso protocolo. Eles relatam que durante os três primeiros dias deste estágio algumas células se soltam da placa e sofrem lise. Também verificamos essa modificação em nossa cultura, entretanto acreditamos que as células sofrem apoptose, devido à presença maciça de corpos esféricos, bastante compactos, semelhantes a corpos apoptóticos que foram documentados na **Figura 2B**. Eles relatam ainda que as células que permanecem aderidas modificam sua morfologia de células epiteliais fortemente aderidas para células pequenas e alongadas e que em torno do dia 5-7 no meio ITSFn, grande parte das células sobreviventes desenvolvem esse padrão de morfologia similar a células precursoras neuroepiteliais *in vivo*. Assim como eles, observamos que o restante da população celular é uma mistura de células com morfologias variadas. As células pequenas e alongadas no cultivo dos autores citados foram seletivamente marcadas com anticorpo contra nestina, assim como no nosso estudo, onde obtivemos positividade tanto para nestina, como também para outras proteínas sabidamente presentes em neurônios, como β -III tubulina (6%), PGP (20%) e TH (12%).

NISHIMURA et al. (2006) não fazem a tripsinização dos CE para avançar na diferenciação, pois afirmam que isso irá danificar as células e prejudicar a continuidade do desenvolvimento das mesmas. No entanto, este processo é defendido por outros estudos (OKABE et al., 1996; LEE et al., 2000) nos quais nos baseamos.

A literatura descreve melhor obtenção de células nestina+ a partir do protocolo de OKABE et al. (1996), que utilizou bFGF e laminina no meio de cultivo do estágio 4. O bFGF é um membro da família FGF que estimula a proliferação de diversos tipos celulares originários das três camadas

germinativas e induz a diferenciação, sobrevivência e regeneração neuronal (RIZZINO et al., 1988). O bFGF foi incluído em nosso protocolo por ser considerado um forte mitógeno de precursores neuroepiteliais e a laminina por ter apresentado uma taxa de proliferação celular um pouco maior do que a fibronectina neste estágio, de acordo com OKABE et al (1996).

Os protocolos de diferenciação para tipos neuronais específicos incluem a sequência combinatória de fatores reguladores que têm papel no estabelecimento dessas linhagens no desenvolvimento embrionário. Em 2000, LEE et al. divulgaram o melhor protocolo para obtenção de células dopaminérgicas até então, fazendo uma modificação no estágio 4 do meio sugerido por JOHE et al. (1996), suplementando o meio N2 com Shh-N e FGF-8b, já que estes dois fatores haviam sido previamente demonstrados como indutores na direção ventral mesencefálica em transplante de placa neural (YE et al., 1998). O Shh-N é importante neste protocolo, pois está envolvido na regulação do padrão de desenvolvimento do SNC, e evidências sugerem que ele esteja envolvido na regulação do destino de CT para as linhagens neural e hematopoiética (YE et al., 1998). O FGF-8 também é um membro da família FGF que apresenta oito isoformas distintas, entretanto, apenas as isoformas a, b e f existem em humanos, sendo que a isoforma b tem 100% de identidade entre humanos e camundongos. O FGF-8 é amplamente expresso na embriogênese e media a transição epitélio-mesenquimal. Durante a gastrulação regula o padrão de formação mesencéfalo/rombencéfalo, entre outros. Entre as isoformas, o FGF-8b é o que apresenta maior afinidade ao receptor e capacidade de transformação oncogênica. (YE et al., 1998). Devido ao sucesso obtido por LEE et al. (2000) em seu protocolo de diferenciação com a retirada do mitógeno e adição de AA no último estágio (estágio 5), ele se tornou referência nesse campo das CT e essas modificações (tanto no estágio 4, quanto no 5) foram adotadas tanto por NISHIMURA et al. (2006), quanto por nós, com intuito de garantirmos uma obtenção tão significativa de neurônios dopaminérgicos quanto a relatada por LEE et al. (2000), o que consideramos ter alcançado, conforme discutido abaixo.

O suplemento N2 (também chamado de meio N2), incluído na maioria dos protocolos, consiste de cinco elementos básicos que são transferrina, insulina, putrescina, progesterona e selênio. Este suplemento foi inicialmente utilizado

nas culturas primárias de neurônios e posteriormente em protocolos de diferenciação de CTE. Essas moléculas que constituem o meio N2 atuam como suplemento ao meio de cultivo sem soro, conferindo vantagem à proliferação e sobrevivência dos precursores neuronais e neurônios e até direcionando o destino neuronal, regenerando e proliferando axônios (SUTER e KRAUSE, 2008). Outro suplemento comumente utilizado em protocolos relacionados na literatura de diferenciação neuronal a partir de CTE que permite a proliferação de neurônios em meio sem soro é o referido como B27. Este é mais complexo que o N2, contendo mais de vinte componentes, dentre os quais estão vitaminas, hormônios e fatores de crescimento, antioxidantes e ácidos gordurosos, sendo que sua composição patenteada não foi completamente revelada (SUTER e KRAUSE, 2008). Nosso protocolo optou pelo uso de N2, com base nos trabalhos de LEE et al. (2000) e NISHIMURA et al. (2006), apesar de trabalho anterior ter utilizado suplementos semelhantes aos componentes do meio N2 no estágio 4 e meio neurobasal, suplementado com B27 e 5% de SFB, no estágio 5, por mais de duas semanas sem significativa morte celular (OKABE et al., 1996). Este mesmo trabalho relata que a cultura por período longo é dificultada em meio sem soro, corroborando a idéia da necessidade de um suplemento substituto do soro, como foi o caso do N2 nos estágios 4 e 5 do nosso protocolo.

O período de cultivo no estágio 5 varia na literatura entre seis a quinze dias, enquanto o mantivemos por apenas seis dias. Optamos por definir um tempo exato de cultivo para todos os nossos experimentos a fim de garantir um padrão de comparação da diferenciação neuronal, evitando variação no tempo de cultivo e exposição aos fatores de diferenciação que pudessem interferir irregularmente com os resultados. Isso pode ter interferido na obtenção de células dopaminérgicas ao final dos 5 estágios de diferenciação.

LEE et al. (2000) só encontram células TH+ depois do estágio 5, nós encontramos desde o estágio 1 (~83%), todavia células com morfologia diferenciada semelhante à de neurônios somente foram vistas em nossa cultura a partir do estágio 3, e as TH+ corresponderam a aproximadamente 12% neste estágio. Eles encontraram no estágio 5 que em torno de 70% das células eram TUJ1+ (β -III tubulina+) e destas, aproximadamente 7% eram TH+. Por terem encontrado expressão uniforme de células nestina+ no estágio 4, o

que indica que estas células são comprometidas com a linhagem neural, sugerem que esta população de células proliferativas nestina+ do estágio 4 se diferencia posteriormente, no estágio 5, em neurônios do SNC, devido à marcação de mais de 70% das células por TUJ1 (β -III tubulina) e que parte destes são diferenciados em neurônios mesencefálicos, devido à marcação por TH. NISHIMURA et al. (2006) encontraram que do total das células no estágio 5 aproximadamente 5% eram nestina+, 32% eram TH+, 80% de MAP-2+ e 10% de GFAP+. Nós encontramos aproximadamente 10% de nestina+, 8% de β -III tubulina+, 21% de PGP+ e 12% de TH+, mas não sabemos a relação entre elas.

As quantidades de neurônios dopaminérgicos, isto é, de células TH+, obtidas nos nossos estágios 4 e 5 foram bastante variáveis. No estágio 4 analisamos um total de cinco lamínulas e verificamos que em uma delas obtivemos uma quantidade bastante satisfatória de TH+, em torno de 50%. Entretanto, nas outras quatro lamínulas obtivemos aproximadamente 1,7% em duas delas e nas outras duas 3,5% e 8%. Portanto, após os ajustes para análise estatística, obtivemos a média de 8%. No estágio 5 essa diferença entre as lamínulas foi ainda mais intrigante, já que ao observamos um total de quatro lamínulas verificamos que duas delas apresentaram em torno de 25% de TH+, enquanto as outras duas apresentaram em torno de 2,5 – 3% de TH+, fazendo com que obtivéssemos 12% em média.

Podemos extrapolar e inferir que essa variação na porcentagem de células TH+ pode vir a ocorrer nas culturas quando da intenção do tratamento da doença de Parkinson, o que pode afetar consideravelmente o número de células já diferenciadas que teoricamente poderiam ser transplantadas. Uma perspectiva de melhora em nossos resultados pode ser pensada no sentido de prolongarmos o período de cultivo nesses estágios, no intuito de que as células possam se adaptar melhor ao meio, e assim, obtermos um número mais significativo de neurônios dopaminérgicos ao final do nosso protocolo. Outra perspectiva é no sentido de número absoluto de células obtidas, já que atualmente existe a promessa de se separar essas células após a diferenciação através da técnica de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), um método que vem sendo explorado na literatura e parece bastante promissor que possibilita a separação de células fenotipicamente diferenciadas

de outras que não expressam determinada proteína de interesse, permite medir o tamanho das células e o quanto a proteína é expressa em cada célula (PARMAR e LI, 2007). Assim, não importa a porcentagem de células obtidas, e sim o número absoluto necessário para se fazer o transplante. Não temos esses dados. Seria necessário estimar a quantidade de células total para fazer uma relação da porcentagem encontrada.

A literatura tem demonstrado que o contato das CTE com diferentes componentes da matriz extracelular pode alterar seu programa de diferenciação. A utilização *in vitro* de camada de laminina/poliornitina aumenta a diferenciação neuronal de CTE quando comparada com outros substratos ou o plástico, enquanto o tratamento com gelatina parece favorecer o comprometimento na direção da glia (GOETZ et al., 2006). A laminina apresenta certo grau de especificidade para a adesão de células neurais, por isso é usada como uma camada na maioria dos protocolos de cultura, e permite o enriquecimento de células neurais pela simples passagem (SUTER e KRAUSE, 2008). Utilizamos tanto a gelatina nas fases mais iniciais do protocolo, quanto o composto poliornitina/laminina nos estágios tardios. Um dos desdobramentos deste trabalho seria testar o papel do substrato Matrigel (354234, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) como fator de diferenciação nos estágios 4 e 5, devido à experiência do nosso grupo com culturas de neurônios e células da glia e também da literatura (BIEDERER e SCHEIFFELE, 2007), nas quais se utiliza este gel comercial que mimetiza a matriz extracelular. Sabe-se que o Matrigel é utilizado em culturas de diversos tipos celulares por reconstituir de certa forma a membrana basal, com similaridades em estrutura, composição, propriedades físicas e funcionais às encontradas *in vivo*, apresentando componentes como laminina, colágeno IV e fatores de crescimento (KLEINMAM et al., 1982; KLEINMAM et al., 1987; MCGUIRE e SEEDS, 1989; VUKICEVIC et al., 1992).

Células nestina+ derivadas de CTE contem uma população celular capaz de originar neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, por isso a diferenciação na direção de células da glia também foi analisada no estágio 4, através da utilização de GFAP (OKABE et al., 1996). As células GFAP positivas apresentaram características morfológicas semelhantes àquelas de cultivo de astrócitos e foram em torno de 2% da população total de células na cultura de

OKABE et al. (1996). Nós também observamos pequena quantidade de células GFAP positivas, mas não quantificamos. A marcação no estágio 3 foi granulosa, mas distinguível do negativo. Com o decorrer dos estágios a marcação ficou bastante nítida (**Figura 6F**).

A natureza do microambiente da célula, bem como o ambiente no qual ela está crescendo influenciam no balanço entre sobrevivência e morte celular. Sendo assim, a quantidade de fatores adicionados ao meio de cultivo deve ser bastante criteriosa. Fatores críticos produzidos por um tecido *in vivo* contribuem para a regulação da sobrevivência das células, assim como quantidades limitadas de fatores solúveis liberados levam a uma competição entre as células dependentes destes fatores. Isso pôde ser verificado em nosso experimento quando da passagem para o estágio 5 retiramos do meio de cultivo os fatores de crescimento, no intuito de reforçarmos a diferenciação neuronal e com isso encontramos grande quantidade de células mortas ao final do cultivo.

O mecanismo de adaptação ao meio de cultura observado nos estágios 4 e 5 merece ser ressaltado quando observamos a presença maciça de neuroesferas, apresentando células diferenciadas em neurônios, e entre essas neuroesferas, como que fazendo a sustentação e a ligação entre as células observamos a presença tanto de células da glia, como de feixes de neurônios, exemplo de que o controle direcional da migração neuronal pode se dar tanto pela presença de célula guia (células da glia), quanto por gradiente de concentração (feixes de neurônios).

Outro fator relevante na diferenciação celular é a migração das células. Na morfogênese do cérebro os neurônios viajam longas distâncias através de uma matriz extracelular complexa durante o desenvolvimento embrionário para encontrar sua posição final. O mecanismo mais comum usado nessa translocação é a combinação da extensão de um processo celular e sua adesão ao substrato, no qual estão envolvidas proteínas contráteis associadas à rede intracelular de microfilamentos, daí a importância que deve ser dada à manutenção da viabilidade do citoesqueleto neuronal, tanto quando da passagem entre os estágios de diferenciação, quanto na obtenção de neurônios próprios para transplante (O'LEARY et. al., 1990).

Mais estudos são necessários para saber a eficácia e a segurança na utilização a longo prazo destas células em tratamentos. Células inapropriadas podem ser incluídas no transplante e o maior risco é a formação de tumores. Como vimos, no nosso protocolo de diferenciação, no estágio 5 encontramos menos de 2% de células SSEA-1+, todavia verificamos que há células em outros estágios de diferenciação e até células com morfologia distinta daquela de neurônios, as quais não deveriam ser transplantadas. Conseqüentemente, há necessidade de se assegurar que os neurônios obtidos e transplantados sejam neurônios mesencefálicos dopaminérgicos, seja via super-expressão do fator transcricional Nurr1 (nuclear-receptor-related factor1) (KIM et al., 2002), ou FACS. Essa análise pode ser feita através da expressão gênica de marcadores região-específicos do cérebro, e a partir de eletrofisiologia e microscopia eletrônica pode se concluir se os neurônios pós-mitóticos fazem conexões sinápticas funcionais (OKABE et al., 1996).

Em uma visão geral os marcadores, tanto de célula indiferenciada (SSEA-1), quanto de precursores neurais (nestina) tiveram sua expressão reduzida progressivamente em nosso protocolo, enquanto aqueles marcadores de neurônios gerais (PGP) e dopaminérgicos (TH) permaneceram praticamente estáveis. Isso sugere que nosso protocolo tem como tendência selecionar aqueles neurônios já diferenciados, ao invés de proliferar os precursores para depois diferenciá-los. Nossa explicação para tal é que ao utilizarmos o KOSR no estágio 2 quando todos os outros estudos utilizaram o SFB, reduzimos a inibição à diferenciação neuronal, permitindo que ela ocorresse em estágio mais anterior àquele esperado e conseqüentemente, nos estágios subseqüentes só houve a seleção destes em detrimento dos precursores.

7 Conclusões

Nosso protocolo foi eficiente em gerar precursores neurais e neurônios diferenciados a partir do cultivo de linhagens de CTE obtidas de camundongos. Células com aparência de neurônios expressam proteínas usualmente associadas a precursores neurais, como a nestina, e também associadas a neurônios, como β -III tubulina, PGP e TH, e aparentam estarem sustentadas por células maiores, que nos estágios mais diferenciados são evidentemente marcadas por GFAP, uma enzima expressa em células gliais.

Nos estágios iniciais, células com aparência de indiferenciação foram marcadas por anticorpos anti-proteínas que são expressas em células sabidamente indiferenciadas, tais como SSEA-1 e Oct-3/4. A expressão de proteínas relacionadas à indiferenciação celular é reduzida drasticamente, como pôde ser observado com a mensuração da expressão da SSEA-1.

O período mínimo de 25 dias foi necessário para a transformação progressiva das CTE em neurônios.

A imunopositividade para β -III tubulina, PGP e TH aparece ainda em concomitância com as células indiferenciadas no estágio 1, o que pode indicar que estas células podem ter como padrão “default” a diferenciação para células neuronais.

As primeiras células da glia do tipo astrócito (GFAP+) aparecem no estágio 3, quando o intuito era selecionar os precursores neurais (células nestina+), talvez indicando a tentativa de se formar um arcabouço na cultura para o desenvolvimento de tecido nervoso.

Marcadores de célula indiferenciada (SSEA-1) e marcadores de precursores neurais (nestina) tiveram sua expressão reduzida progressivamente em nosso protocolo.

Marcadores de neurônios gerais (PGP) e dopaminérgicos (TH) permaneceram praticamente estáveis.

Nosso protocolo selecionou neurônios já diferenciados em detrimento dos precursores desde o estágio 3 o que pode explicar a estabilização das taxas de diferenciação obtidas.

8 Referências Bibliográficas

Abbondanzo S. J., Gadi I. e Stewart C. L. **Derivation of embryonic stem cell lines** (1993) *Methods in Enzymology* 225:803-23.

Alberts B., Johnson A., et al. **Molecular Biology of the Cell** New York, NY Garland Science (2002).

Arantes R.M. e Andrews N.W. **A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons** (2006) *J Neurosci* 26(17):4630-4637.

Arantes R.M., Lourenssen S., Machado C.R., Blennerhassett M.G. **Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury *in vitro*** (2000) *Neuroreport* 11(1):177-81.

Baier P.C., Schnidehutte J., Thinyane K. et al. **Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration** (2004) *Stem Cells* 22:396-404.

Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J. E., Gottlieb D. I. **Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*** (1995) *Developmental biology* 168:342-357.

Biederer T. e Scheiffele P. **Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation** (2007) *Nature Protocols* 2(3):670.

Chao M. V. **Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways** (2003) *Nature Reviews Neuroscience* 4:299-309.

Cheng J., Dutra A., Takesono A., Garrett-Beal L., Schwartzberg P.L. **Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media** (2004) *Genesis* 39(2):100-104.

Conrad C. e Huss R. **Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery** (2005) *Journal of Surgical Research* 124:201–208.

Day I.N.M., Thompson R.J. **UCHL1 (PGP 9.5): Neuronal biomarker and ubiquitin system protein** (2010) *Progress in Neurobiology* 90:327–362.

Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. e Kemler, R. **The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium** (1985) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87:27-45.

Elkabetz Y., Panagiotakos G., AlShamy G. et al. **Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage** (2008) *Genes Dev* 22:152-165.

Eng L. F. **Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes** (1985) *J Neuroimmunol* 8(4-6):203-14.

Evans M.J., Kaufman M.H. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos** (1981) *Nature* 292:154-156.

Flames N., Hobert O. **Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation** (2009) *Nature* 458:885-9.

Frederiksen K. e McKay R. D. G. **Proliferation and Differentiation of Rat Neuroepithelial Precursor Cells *in vivo*** (1988) *The Journal of Neuroscience* 8(4):1144-1151.

Goetz A.K., Scheffler B., Chen H.X., Wang S., Suslov O., Xiang H., et al. **Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells** (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11063–11068.

Grace A.A., Onn S.P. **Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded *in vitro*** (1989) *J Neurosci* 9:3463-3481.

Hansson E. e L. Ronnback. **Glial neuronal signaling in the central nervous system** (2003) *Faseb J* 17(3):341-8.

Hemmati-Brivanlou A. e Melton D. **Vertebrate Embryonic Cells Will Become Nerve Cells Unless Told Otherwise** (1997) *Cell* 88:13–17

Jessen K. R., Thorpe R., et al. **Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes** (1984) *J Neurocytol* 13(2):187-200.

Jessen K. R. e Mirsky R. **Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein** (1980) *Nature* 286(5774):736-7.

Jessen K. R. e Mirsky R. **Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution** (1985) *J Neuroimmunol* 8(4-6):377-93.

Johansson S., Price J., Mado M. **Effect of Inflammatory Cytokines on Major Histocompatibility Complex Expression and Differentiation of Human Neural Stem/Progenitor Cells** (2008) *Stem Cells* 26:2444–2454.

Johe K. et al. **Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult nervous system** (1996) *Genes Dev.* 10:3129–3140.

Kalir H. H. e Mytilineou C. **Ascorbic acid in mesencephalic cultures: Effects on dopaminergic neuron development** (1991) *Journal of Neurochemistry* 57:458-464.

Kim J.H., Auerbach J.M., Rodriguez-Gomes J.A. *et al.* **Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease** (2002) *Nature* 418:50-56.

Kleinman H. K., Graf J., et al. **Role of basement membranes in cell differentiation** (1987) *Ann N Y Acad Sci* 513:134-45.

Kleinman H. K., Mcgarvey M. L., et al. **Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma** (1982) *Biochemistry* 21(24):6188-93.

Kriks S. e Studer L. (2009) **Protocols for Generating ES Cell-Derived Dopamine Neurons** In: Development and Engineering of Dopamine Neurons 651:101-111.

Laerum O. D., Steinsvag S., et al. **Cell and tissue culture of the central nervous system: recent developments and current applications** (1985) Acta Neurol Scand 72(6):529-49.

Langston, J.W. **The promise of stem cells in Parkinson disease** (2005) Journal of Clinical Investigation 115:23-25.

Latt S. A. e Stetten G. **Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis** (1976) J Histochem Cytochem 24(1):24-33.

Lee S-H., Lumelsky N., Studer L. et al. **Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells** (2000) Nat biotechnol 18:675-679.

Lees A.J., Hardy J., Revesz T. **Parkinson's disease** (2009) Lancet 373:2055-66.

Lein P. J., Beck H. N., et al. **Glia induce dendritic growth in cultured sympathetic neurons by modulating the balance between bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP antagonists** (2002) J Neurosci 22(23):10377-87.

Lendahl U., Zimmerman L.B. e McKay R.D.G. **CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein** (1990) Cell 60:585-595.

Li G. N., Livi L. L., et al. **Genomic and morphological changes of neuroblastoma cells in response to three-dimensional matrices** (2007) Tissue Eng 13(5):1035-47.

Mackowiak M., Chocyk A., et al. **Neurogenesis in the adult brain** (2004) Pol J Pharmacol 56(6):673-687.

Martin G.R. **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells** (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:7634-7638.

Mcguire P. G. e Seeds N. W. **The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells** (1989) J Cell Biochem 40(2):215-27.

Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K. e Behringer R. (2003) **Isolation and culture of blastocyst-derived stem cell lines** In: Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

National Institutes of Health. **Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions** (2001).

Nishimura F., Toriumi H., Ishizaka S., Sakaki T., Yoshikawa M. **Use of differentiating embryonic stem cells in the Parkinsonian mouse model** (2006) Methods Mol Biol 329:485-93.

Ohse K., Ohtsu M., Onoda F., Murakami Y. **Development of effective isolation method of ES cells for analysis of differentiation** (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387:64-69.

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

O'Leary D.D., Bicknese A.R., De Carlos J.A., Heffner C.D., Koester S.E., Kutka L.J., Terashima T. **Target selection by cortical axons: alternative mechanisms to establish axonal connections in the developing brain** (1990) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:453-468.

Parmar M. e Li M. **Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation** (2007) *BMC Developmental Biology* 7:86-94.

Pesce M., Scholer H.R. **Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development** (2001) *Stem Cells* 19(4): 271-278.

Rizzino A. e Growley C. **Growth and differentiation of embryonal carcinoma cell line F9 in defined media** (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:457-461.

Rizzino A., Kazakoff P., Ruff E., Kuszynski C., Nebelsick J. **Regulatory effects of cell density on the binding of transforming Growth Factor β , Epidermal Growth Factor, Platelet-derived Growth Factor, and Fibroblast Growth Factor** (1988) *Cancer Research* 48:4266-4271.

Robertson E.J. **Derivation and maintenance of embryonic stem cell cultures** (1997) *Methods in Molecular Biology* 75:173-184.

Robertson E.J. **Embryo-derived stem cell lines** (1987) In Robertson, E.J. (ed.), *Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C., p. 71-112.

Ruhnke M., Ungefroren H., Zehle G., Bader M., Kremer B., Fändrich F. **Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages** (2003) *Stem Cells* 21:428-436.

Sesack S.R., Aoki C., Pickel V.M. **Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets** (1994) *J Neurosci* 14:88-106.

Smukler S. R., Runciman S. B., Xu S., Derek van der Kooy **Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences** (2006) *The Journal of Cell Biology* 172(1):79-90.

Solter D., Knowles, B. B. **Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)** (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5565-5569.

Sonntag K.C., Simantov R., Isacson O. **Stem cells may reshape the prospect of Parkinson's disease therapy** (2005) *Brain Res Mol Brain Res* 134:34-51.

Soundararajan P., Lindsey B.W., Leopold C., Rafuse V.F. **Easy and rapid differentiation of embryonic stem cells into functional motoneurons using sonic hedgehog-producing cells** (2007) *Stem Cells* 25:1697-706.

Suter D.M. e Krause K-H. **Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potencial for cell therapy** (2008) *Journal of Pathology* 215: 355-368.

Tabuchi K., Blundell J., Etherton M. R., Hammer R. E., Liu X., Powell C.M., Südhof T. C. **A Neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice** (2007) *Science* 318: 71-76.

Tavares R.L., Xu K., Zhang C., de Freitas V. **A specific and quick gene expression study in mouse ES cells** (2007) *J Assist Reprod Genet* 24:366-72.

Tay Y. M.-S., Tam W-L., Ang Y-S., Gaughwin P. M., Yang H., Wang W., Liu R., George J., Ng H-H., Perera R. J., Lufkin T., Rigoutsos I., Thomson A. M., Lim B. **MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1** (2008) *Stem Cells* 26:17–29.

Teramura T., Onodera Y., Murakami H., Ito S., Mihara T., Takehara T., Kato H., Mitani T., Anzai M., Matsumoto K., Saeki K., Fukuda K., Sagawa N. and Hosoi Y. **Mouse androgenetic embryonic stem cells differentiated to multiple cell lineages in three embryonic germ layers *in vitro*** (2009) *Journal of Reproduction and Development* 55(3):283-292.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., et al. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts** (1998) *Science* 282:1145–1147.

Vats A., Bielby R.C., Tolley N.S., Nerem R., Polak J.M. **Stem Cells** (2005) *Lancet* 366:592-602.

Vukicevic S., Kleinman H. K., et al. **Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components** (1992) *Exp Cell Res* 202(1):1-8.

Wiles M. V. e Johansson B. M. **Embryonic stem cell development in a chemically defined medium** (1999) *Experimental Cell Research* 247:241–248.

Ye W. et al. **FGF and SHH signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate** (1998) *Cell* 93:755–766.

Ying Q-L., Stavridis M., Griffiths D., Li M., e Smith A. **Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture** (2003) *Nature Biotechnology* 21:183-186.