

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS
PRECURSORES NEURAIS DO SISTEMA NERVOSO
PÓS-NATAL DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

LINA MARIA DELGADO GARCIA

Botucatu, SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS
PRECURSORES NEURAIS DO SISTEMA NERVOSO
PÓS-NATAL DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

LINA MARIA DELGADO GARCIA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

E-mail linadelgadamvz@gmail.com

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Delgado-Garcia, Lina Maria.

Estudo da proliferação, migração e diferenciação dos precursores neurais do sistema nervoso pós-natal de camundongos (mus musculus) / Lina Maria Delgado-Garcia. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501062

1. Células-tronco. 2. Sistema nervoso. 3. Medicina regenerativa. 4. Camundongo.

Palavras-chave: Células-tronco neurais; Neuroblastos; Neurogênese adulta; Nichos neurogênicos; Progenitores neurais.

Nome do Autor: Lina Maria Delgado Garcia

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS
PRECURSORES NEURAIS DO SISTEMA NERVOSO
PÓS-NATAL DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu

Prof. Dra. Marimélia Aparecida Porcionatto
Membro
Departamento de Bioquímica
Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo

Prof. Dra. Ana Liz Garcia Alves
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu

Prof. Dra. Juliany Gomes Quitzan
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu

Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes
Membro
Departamento de Ciências Biológicas
Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis

Data de dissertação: 2 maio de 2016

DEDICATÓRIA

*A Deus quem ilumina sempre meu caminho,
A minha família e seres queridos, principais colaboradores na minha formação
pessoal e profissional, que mesmo distantes, sempre me apoiaram com muito amor
Aos meus pacientes, meus professores, e meus futuros estudantes, que me fazem ser
uma pessoa para o mundo*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Elizabeth, a meu irmão Juan a toda minha família e seres queridos, a meu namorado Angel e em especial meus tios Norberto e Cássia, são poucas as palavras para descrever minha eterna gratidão, a família é a base de tudo,

Aos novos amigos Gabriela, Diego, Juliana, Martha, Carla, Patrícia, Pamela, Raíza, Renan, Camila, Junior e Leonardo pela linda amizade e apoio,

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pela confiança, apoio e disposição, pelos comentários generosos e as críticas construtivas, aos meus colegas do grupo de Terapia celular e da Pós-Graduação Diana, Denis e Danielle, ainda os colegas da salinha de cardiologia Amanda, Angélica e Mauricio pela companhia,

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes FCL, UNESP pelo aporte teórico sem o qual este trabalho não poderia ter sustentação, à Prof. Dra. Fernanda Landim e o pessoal do laboratório LANÇA, FMVZ, UNESP, pela ajuda prestada,

À Prof. Dra. Marimélia Porcionatto, EPM, UNIFESP, e sua equipe, Patricia, Layla, Michelle, Alexandre, Fernando, Lucas e Agnes, pela oportunidade de trabalharmos em conjunto e me auxiliarem nos experimentos,

À Prof. Dra. Maria Elisa Calcagnotto, ICBS, UFRGS e sua equipe, Leticia, Mayara, Francine e Grace pelas discussões produtivas, ao Prof. Dr. Daniel Pens Gelain e ao Prof. Dr. Jose Claudio Fonseca, ICBS, UFRGS, e sua equipe em especial Diana, Thalitha e Moara, pelo apoio oferecido durante a minha estadia na realização deste trabalho,

Ao Prof. Dr. José Anchieta IBB, UNESP, pela disponibilidade, à Prof. Dra. Luciane Alarcão Dias Melicio FMB, UNESP e à Prof. Dra. Ana Liz Garcia Alves, FMVZ, UNESP pela presença e sugestões na minha banca de qualificação,

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação, e o seu pessoal, funcionários, técnicos e todos os profissionais por dividirem comigo a jornada diária e a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com o sucesso deste trabalho.

"Believe that you can and you will be halfway there"
Theodore Roosevelt

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. - Contexto histórico em biologia do desenvolvimento e células-tronco	26
Figura 2. - Século XIX-XX, as guerras napoleônicas e as sociedades industriais.....	27
Figura 3.- Século XX, a I e II Guerra Mundial	31
Figura 4.- Origem das células-tronco e seu potencial de diferenciação	34
Figura 5.- Transição das camadas germinativas ao tubo neural	37
Figura 6.- Participação da notocorda na formação do neuroectoderma	37
Figura 7. - Participação dos fatores indutores na formação do neuroectoderma	39
Figura 8.- Formação do sistema nervoso primitivo	40
Figura 9. - Participação dos fatores na formação do sistema nervoso primitivo	42
Figura 10 - Tipos de migração dos neurônios no sistema nervoso	42
Figura 11.- A diferenciação neural no sistema nervoso	46
Figura 12. - Desenvolvimento do sistema nervoso e participação dos fatores indutores.	48
Figura 13. Os tipos de cérebros nas espécies animais.....	50
Figura 14. - Sinopses nos eventos da formação do córtex	51
Figura 15. - Fatores de transcrição no desenvolvimento do córtex.....	52
Figura 16. - <i>Figure 1. Neurogenic niches in the adult mammalian brain.....</i>	73
Figura 17. - <i>Figure 1. Adult subventricular zone neural precursor cells SVZ-NPCs neurospheres population fate and proliferation.</i>	89
Figura 18. - <i>Figure 2. Adult subventricular zone neural precursor cells SVZ-NPCs neurospheres conserve their migration program.....</i>	90

Figura 19. -	<i>Figure 3. Adult subventricular zone neural precursor cells SVZ-NPCs differentiation as a neuronal immature-like or glial mature-like and immature-like cell.....</i>	91
Figura 20. -	Tipos de regiões neurogênicas no cérebro adulto.....	96
Figura 21. -	Diagrama da sequência de isolamento e cultivo dos precursores neurais (NPCs) de camundongos.....	115
Figura 22. -	Morfologia dos cultivos dos precursores neurais (NPCs) de camundongos.....	118
Figura 23. -	Diferenciação dos precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ).....	121

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.- Estatística descritiva do diâmetro das neuroesferas	118
Tabela 2.- Estatística descritiva da fluorescência normalizada dos marcadores para diferenciação de precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ)	122
Tabela 3.- Estatística descritiva da fluorescência normalizada dos marcadores para diferenciação de precursores neurais (NPCs) da zona subgranular (SGZ)	122
Tabela 4.- Estatística descritiva da fluorescência normalizada dos marcadores para diferenciação de precursores neurais (NPCs) e células imaturas	122

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1.-	Origem das células-tronco e seu potencial de diferenciação	34
Quadro 2.-	Tipos de regulação dos fatores indutores sobre as células-tronco (NSCs) e progenitores.....	40
Quadro 3.-	Anticorpos no experimento de diferenciação de precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ)	120

ABREVIACES

ALS Amyotrophic lateral sclerosis

APC/Axin/PP_{2A}/GSK/CK_{1α} Adenomatosis polyposis coli / Axin / protein phosphatase_{2A} / Glycogen Synthase Kinase / casein kinase_{1α}

ASCL Achaete-scute homolog

BHLH basic Helix-loop-helix protein

BMPs Bone morphogenetic protein

BFS Bovine fetal serum

CKIs Cyclin-dependent kinase inhibitors

CNS Central nervous system

DCX Doublecortin

DG Dentate gyrus

DLL Delta-Like

DLX related to Drosophila distal-less (Dll) gene

DNA Deoxyribonucleic acid

DV Dishevelled

EGF Epidermal growth factor

EMX Empty spiracle home-box

EN Engrailed home-box

ERBB / HER Erythroblastic leukemia viral oncogene / related to Epidermal growth factor receptor EGFR

FGF fibroblastic growth factor / bFGF basic fibroblastic growth factor

GABA Gamma aminobutyric acid

GAD Glutamate decarboxylase / Glutamic acid decarboxilase

GBX Gastrulation brain home-box

GFAP Glial fibrillary acid protein

GLI Glioma-Associated Oncogene

GSK Glycogen synthase kinase

HES Hairy/enhancer of split

IGF Insulin-like growth factor

iPCs Induced pluripotent stem cells

JAK Janus kinase

MAP Microtubule associated protein

MATH related to Atonal BHLH Transcriptor Factor 1

MASH Mammalian achaete-scute homologous

NEUROD Neurogenic differentiation factor

NICD Notch intracellular domain

NOTCH Neurogenic locus notch homolog protein

NPCs Neural precursor cells

NRP Neuropilin

NRSE Neuron-Restrictive Silencer Element

NRSF Neuron-Restrictive Silencer Factor

NSCs Neural stem cells

NSE Neuron specific enolase protein

NUMB Protein numb homolog

O4 Oligodendrocyte Marker

OB olfactory bulb

OLIG Oligodendrocyte transcription factor

OTX Orthodenticle home-box

SOX Sry-related HMG box

PAX Paired box gene

PTC Patched protein

PTF Phototrophin and Flippase kinases

RARs Retinoic acid receptor

RARE_s Retinoic acid response elements

REST RE₁-Silencing Transcription factor

RMS Rostral migratory stream

SEMA Semaphorins protein

SGZ Subgranular zone

SHH sonic hedgehog

SMADs MAD mothers against decapentaplegic / SMA small body size

SMO Smoothened protein

SOD cytoplasmic superoxide dismutase

STAT Signal transducer and activator of transcription

SVZ Subventricular zone

TCF/LEF T-cell factor / lymphoid enhancer factor

TGF Transforming growth factor

VEGF Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

Página

RESUMO	17
ABSTRACT	18
CAPÍTULO I	19
1.1 INTRODUÇÃO	20
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	23
1.2.1 A BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO E AS CÉLULAS-TRONCO	24
<i>O século das sociedades industriais e o surgimento da embriologia</i>	25
<i>O auge das sociedades contemporâneas e das ciências</i>	30
<i>Conceitos gerais em células-tronco</i>	33
1.2.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO	35
<i>A transição do ectoderma ao tubo neural</i>	36
<i>Proliferação das células-tronco e os progenitores</i>	40
<i>Os programas de migração dos neurônios imaturos</i>	42
<i>O controle da proliferação e diferenciação das NSCs</i>	44
1.2.3 A FORMAÇÃO DO CÓRTEX CEREBRAL	49
<i>Os tipos de córtex cerebral</i>	50
<i>Proliferação e formação das regiões no neocórtex</i>	52
<i>A migração e diferenciação dos neurônios</i>	53
1.3 OBJETIVO	55
CAPÍTULO II	57
2. ADULT BRAIN NEUROGENESIS, NEURAL STEM CELLS AND NEUROGENIC NICHES	58
<i>Abstract</i>	59
<i>Introduction</i>	60
<i>Discovering adult brain neurogenesis</i>	60
<i>Adult neural stem cells (NSCs) activity</i>	62

<i>Neurogenic niche microenvironment</i>	65
<i>Conclusions and prospects for brain repair in spinal cord injury and amyotrophic lateral sclerosis</i>	66
References	68
CAPÍTULO III	75
3. CELLULAR ASPECTS OF <i>IN VITRO</i> PROLIFERATION, MIGRATION AND DIFFERENTIATION OF ADULT NEURAL PRECURSOR CELLS FROM THE SUBVENTRICULAR ZONE OF MICE	76
<i>Abstract</i>	77
<i>Background</i>	78
<i>Materials and methods</i>	79
<i>Results and discussion</i>	81
<i>References</i>	84
CAPÍTULO IV	93
4.1 DISCUSSÃO	94
4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
REFERÊNCIAS	102
ANEXO	113
1. PROTOCOLO PARA O ISOLAMENTO E CULTIVO DE PRECURSORES (NPCS) DA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ) E A ZONA SUBGRANULAR (SGZ)	114
2. DIFERENCIAÇÃO DOS PRECURSORES NEURAI (NPCS) DA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ) E A ZONA SUBGRANULAR (SGZ)	119

DELGADO-GARCIA, L.M. **Estudo da proliferação, migração e diferenciação dos precursores neurais do sistema nervoso pós-natal de camundongos (*Mus musculus*)**. Botucatu, 2016. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

No final dos anos 60, os experimentos em proliferação celular anunciaram a neurogênese adulta em mamíferos. Três décadas depois a relação entre neurogênese e células-tronco neurais (NSCs) foi estabelecida. Atualmente, as NSCs são objeto de pesquisas na medicina como modelo de estudo de múltiplos estados anormais e distúrbios orgânicos, além de se propor como uma estratégia em condições com poucas alternativas terapêuticas. Contudo o desenvolvimento destas terapias depende do entendimento dos mecanismos moleculares, celulares e biológicos que controlam a neurogênese e as NSCs. Assim, o objetivo deste trabalho foi o estudo das teorias no funcionamento dos nichos neurogênicos e as NSCs com ênfase na proliferação, migração e diferenciação, além da descrição dos aspectos celulares *in vitro* dos precursores neurais (NPCs) dos nichos neurogênicos dos mamíferos. Os nichos são regiões do sistema nervoso adulto que apresentam neurogênese pela presença das NSCs e um microambiente celular apropriado. Nos mamíferos existem pelo menos dois nichos, a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (SGZ) do hipocampo. Os estudos revisados demonstram que existem diferenças e semelhanças no comportamento das NSCs nos nichos neurogênicos adultos, levando a que a proliferação, migração e diferenciação seja menos efetiva quando comparada com o desenvolvimento embrionário. Para finalizar, se descreveu o protocolo para isolamento e cultivo dos NPCs e seus aspectos celulares. Os NPCs proliferaram como populações heterogêneas multipotentes. Após a diferenciação, as células migraram e apresentaram características morfológicas e imunofenotípicas de células neurais imaturas, com o predomínio de células gliais. Em conjunto, os NPCs *in vitro* mimetizam os aspectos gerais da neurogênese.

Palavras chave: células-tronco neurais, desenvolvimento, medicina regenerativa, neuroblastos, neurogênese adulta, nichos neurogênicos, progenitores neurais.

DELGADO-GARCIA, L.M. **Proliferation, migration and differentiation of neural precursor cells NPCs of the post-natal nervous system of mice (*Mus musculus*)**. Botucatu, 2016. 122p. Thesis (Master Degree) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In the late 60's, the experiments on cell proliferation announced adult neurogenesis in mammals. Three decades later, the link between neurogenesis and neural stem cells (NSCs) was recognized. Currently, NSCs are the matter of research in human and veterinary medicine as a model of multiple abnormal states and organic disorders, in addition to be proposed as a strategy for diseases and conditions with few therapeutic alternatives. However, the successful development of these therapies depends on the understanding of molecular, cellular and biological mechanisms that control neurogenesis and NSCs. Therefore, the aim of this work was the study of the theories on neurogenic niches and NSCs with focus in proliferation, migration and differentiation, beyond the description of the cellular aspects of *in vitro* neural precursors cells (NPCs) of the neurogenic niches of the mammals. The neurogenic niches are regions of the adult nervous system which display complete neurogenesis because of the presence of NSCs and an appropriate cell microenvironment. In mammals, there are at least two neurogenic niches, the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus. The reviewed studies showed that exists differences and similarities in the behavior of the adult NSCs in the neurogenic niches that lead to less effective proliferation, migration and differentiation; when compared with the embryonic development. Finally, was described the protocol for isolation and cultivation of NPCs and their cellular aspects. NPCs proliferated as heterogeneous multipotent populations. Differentiation analyses showed that cells migrated and showed morphological and immunophenotypical characteristics of immature cells with the predominance of glial cells. Overall, NPCs effectively reproduce the general aspects of neurogenesis.

Key words: adult neurogenesis, development, neural progenitors, neural stem cells, neuroblasts, neurogenic niches, regenerative medicine.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

1.2 REVISÃO DE LITERATURA:

1.2.1 A BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO E AS CÉLULAS-TRONCO

1.2.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

1.2.3 A FORMAÇÃO DO CÓRTEX CEREBRAL

1.3 OBJETIVO

1.1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

No final dos anos 60, os experimentos de cinética da proliferação celular anunciaram a neurogênese adulta em mamíferos (ALTMAN et al, 1962, ALTMAN et DAS 1965A, 1965B; ALTMAN 1969; ALTMAN et DAS, 1966; KAPLAN et HINDS, 1977). Três décadas depois a relação conceitual entre neurogênese e células-tronco foi estabelecida (GAGE et al, 1995; GAGE, 2000). Atualmente, as células-tronco são objeto de intensas pesquisas nas ciências básicas e médicas. Nas ciências básicas os estudos permitem aprofundar aspectos moleculares, proteicos, e genéticos do desenvolvimento dos organismos; já na área da medicina humana e veterinária, se consolidam como modelo de estudo de múltiplos estados anormais e distúrbios orgânicos além de se propor como uma estratégia na medicina regenerativa em doenças e condições com poucas alternativas terapêuticas.

O termo medicina regenerativa faz referência ao conjunto de atividades que aplicam os princípios da engenharia biomédica e das ciências da saúde para a obtenção de substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e tecidos (SMITH, 2006). Nesse sentido, a terapia celular refere-se ao emprego de células para o tratamento de doenças, sendo que a mais antiga prática de terapia celular descrita é a transfusão do sangue total e de hemácias (SMITH, 2006).

No caso das células-tronco neurais (NSCs), são alvo de múltiplas pesquisas para repor células neurais perdidas ou disfuncionais e promover neuroproteção após lesões traumáticas da medula espinhal, doenças do desenvolvimento e neurodegenerativas (KIM ET AL, 2010; HEFFERAN MP et al 2012; PURVES *et al.*, 2012; AMEMORI ET AL, 2013; EMGÅRD M. 2014; SU, H. 2011; FELDMAN, 2014; GLASS, 2012; HORMOZDIARI et al., 2015).

Contudo, o desenvolvimento exitoso destas terapias depende do entendimento dos mecanismos moleculares, celulares e biológicos que controlam a neurogênese e as NSCs, ainda pouco compreendidos.

O trabalho está dividido em quatro capítulos, no primeiro capítulo se faz uma introdução e revisão da literatura em aspectos básicos do desenvolvimento do sistema nervoso central (CNS), a participação das células-tronco neurais (NSCs) e os processos

de proliferação, migração e diferenciação nos mamíferos e, por último, a descrição dos objetivos. O segundo e terceiro capítulo abordam desde o estudo teórico e experimental, os aspectos celulares dos nichos neurogênicos e as NSCs dos mamíferos adultos e a manipulação *in vitro* das NSCs e progenitores (NPCs) do camundongo adulto como modelo animal. Por fim o quarto capítulo traz uma discussão dos assuntos tratados além das considerações finais.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 A BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO E AS CÉLULAS-TRONCO

O contexto histórico em embriologia, biologia do desenvolvimento e células-tronco pode ser descrito em dois períodos. O primeiro período na transição entre a idade moderna e contemporânea, onde se destaca a criação da Teoria Celular, a formalização da embriologia como disciplina, os trabalhos de Weismann e Driesch e os achados de Haeckel, Boveri e Wilson em ecologia, pioneiros na ideia de célula-tronco.

O segundo período, no auge da idade contemporânea até a atualidade com o progresso sem precedente das ciências desde o descobrimento da célula-tronco hematopoiética por Till e McCulloch, a aparição da biologia do desenvolvimento como disciplina, a descoberta das áreas embrionárias junto ao conceito de indução de Spemann e os experimentos de Briggs, King e Gurdon em transferência nuclear. Estes avanços teriam sua conexão mais direta no experimento de clonagem de Campbell e a criação das células-tronco pluripotentes induzidas por Yamanaka e Takahashi.

1.2.1 A embriologia, a biologia do desenvolvimento e as células-tronco

O interesse dos homens nos fenômenos naturais, as ciências exatas e biológicas, vem desde os primórdios da civilização, mas foi só até o século XIX e XX que os estudos prosperaram.

Quais sucessos políticos, econômicos e socioculturais poderiam ter influenciado os cientistas da época? Qual a ligação entre embriologia, biologia do desenvolvimento e células-tronco?

Este contexto histórico pode ser dividido em dois períodos, um primeiro momento de transição entre a idade moderna e contemporânea, com o fim da revolução francesa e a aparição das sociedades industriais, as reformas políticas, sociais e econômicas; e um segundo período, no auge da idade contemporânea até a atualidade, com a consolidação geopolítica e econômica do mundo após as guerras mundiais, o que permitiu o progresso sem precedente das ciências (Figura 1).

O século das sociedades industriais e o surgimento da embriologia

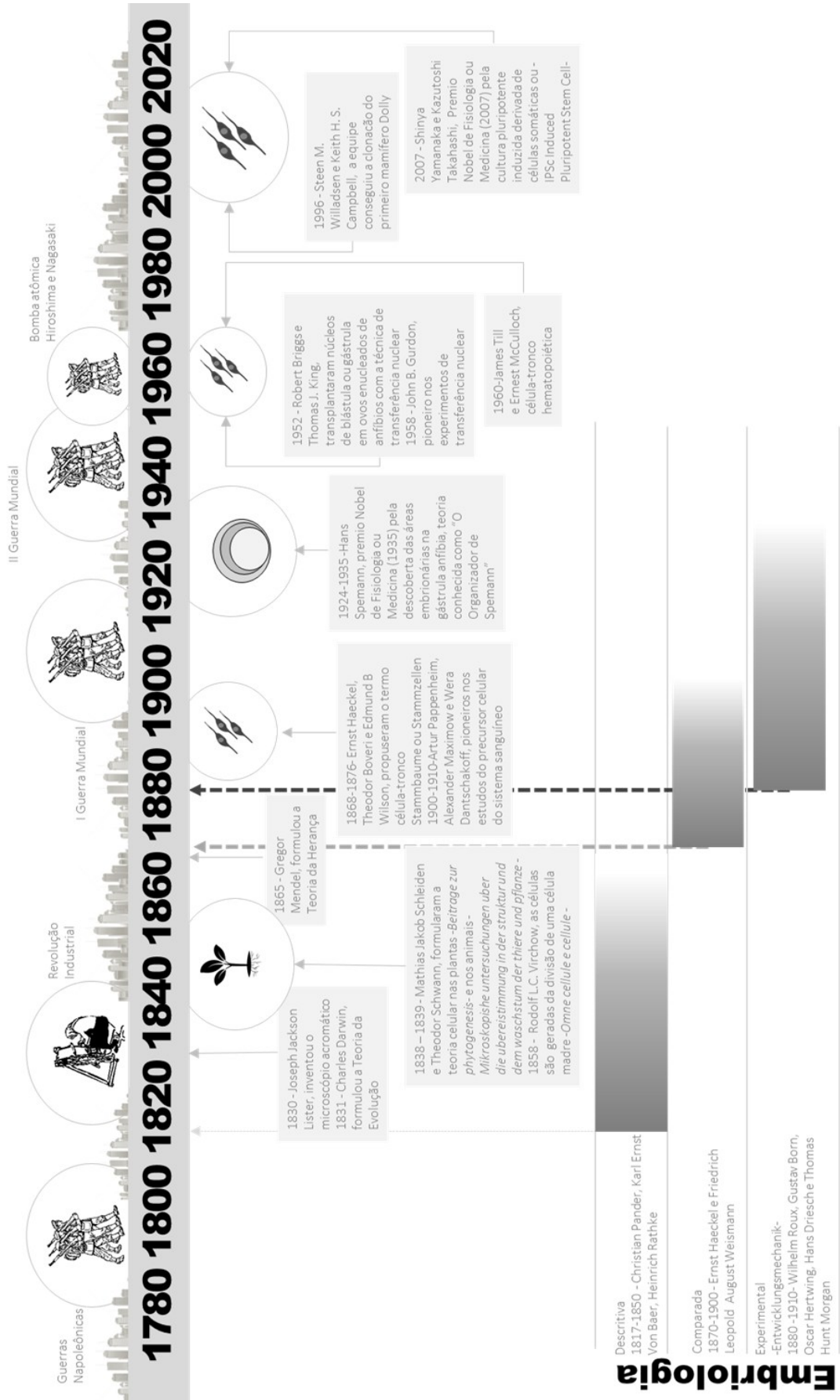
Na primeira parte do século XIX, depois da derrota da França nas Guerras Napoleônicas, o Império Britânico e seus aliados (Alemanha, Rússia, Japão, Estados Unidos) começaram o movimento da Revolução Industrial provocando a transição dos métodos de produção, e levando a reformas sociais e econômicas significativas¹. O novo estilo de produção gerou uma maior demanda de mão-de-obra, assim a população das cidades europeias dobrou e com ela a proliferação de doenças infecciosas e má nutrição^{2,3} (STARR, 1982; STECKEL, 1999).

FIGURA 1. Contexto histórico em embriologia, biologia do desenvolvimento e células-tronco. Diferentes sucessos políticos, econômicos e socioculturais marcaram o desenvolvimento das ciências biológicas, a embriologia, a biologia do desenvolvimento e as células-tronco. *Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.*

¹ 1760-1860 Durante a revolução industrial os métodos de produção se intensificaram após a criação de novas máquinas, como as primeiras máquinas a vapor e a invenção da locomotiva.

² Os hospitais eram os principais focos de contaminação, como instituições religiosas de caridade, recebiam doentes, idosos, órfãos e pessoas de baixos recursos.

³ 1830 A França sofreu múltiplas epidemias, entre elas cólera, febre tifoide e tuberculose.



O crescimento econômico promoveu cidadãos livres-pensadores e a situação sanitária o desenvolvimento de uma medicina científica, desligada do místico e artesanal, transformando as sociedades dominadas pela religião e aristocracia em aquelas dominadas pela ciência, indústria, comércio e profissionalização (BERGER, 1999).

Como resultado, para finais do século XIX, novas técnicas e descobrimentos geraram melhores práticas na manipulação dos alimentos, o tratamento de feridas e a execução dos procedimentos cirúrgicos, o qual significativamente diminuiu as taxas de mortalidade e os padrões de vida melhoraram (TWARD, 1997; BERGER, 1999) (Figura 2).

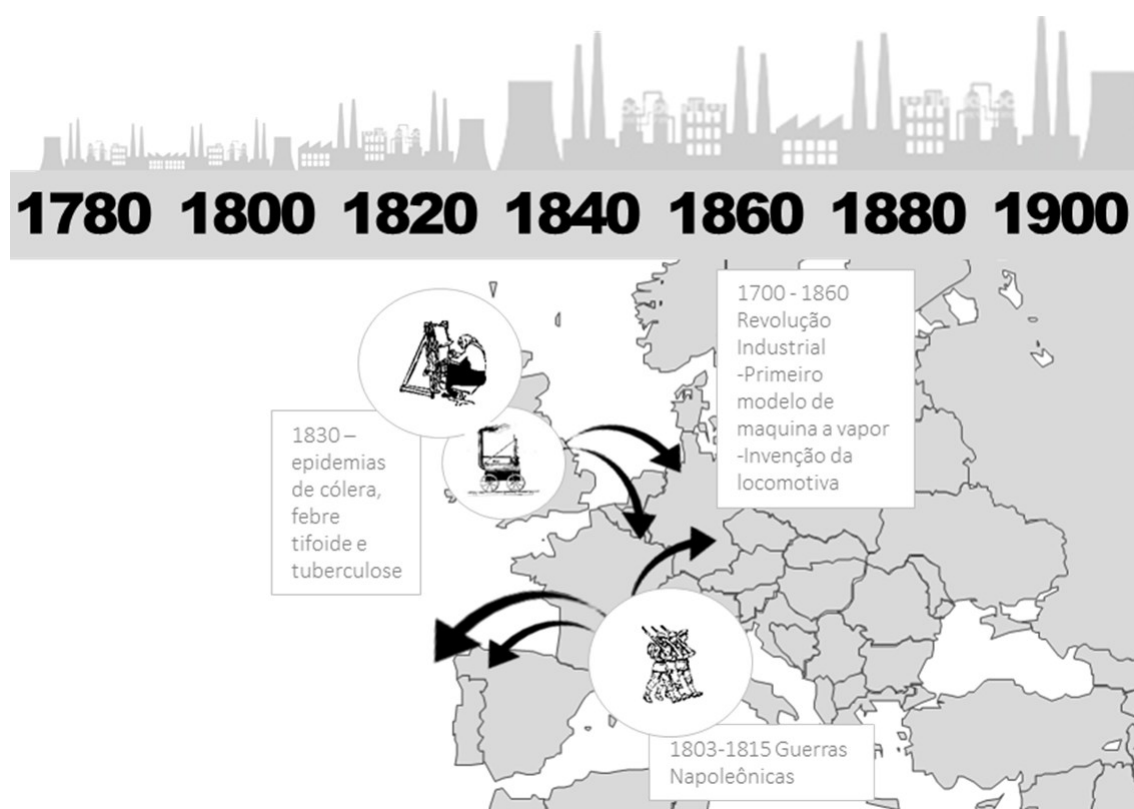


FIGURA 2. Século XIX-XX, as guerras napoleônicas e as sociedades industriais. *Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.*

Nas ciências biológicas, os pesquisadores desenvolveram teorias para explicar diversos fenômenos, sendo um tempo de expansão científica do conhecimento, desde a formulação da Teoria da Evolução de Darwin até a Teoria da Herança de Mendel (REZENDE, 2006).

Especificamente entre 1830 e 1858 uma série de estudos em organismos vegetais e animais deu origem à Teoria Celular, a qual propôs a célula como a unidade

estrutural e funcional de todos os seres vivos (REZENDE, 2006)⁴ (Figura 1). A Teoria Celular além de derrocar os dogmas religiosos da origem dos organismos, propiciou o consenso entre a comunidade científica de que a observação detalhada e múltipla dos organismos era o único caminho na compreensão dos processos biológicos, sendo possível identificar estruturas e processos homólogos entre vegetais e animais (CHURCHILL, 1991).

A popularização da Teoria Celular levou a que os estudos no desenvolvimento dos organismos tomassem força, formalizando-se o estudo da embriologia como ciência. A embriologia se alimentou da onda revolucionária levando a grandes transformações nos seus métodos de estudo, passando por uma fase descritiva, seguida de uma comparada até finalmente uma experimental, esta última também conhecida como “*Entwicklungsmechanik*” ou fisiologia do desenvolvimento⁵ (CHURCHILL, 1991; MAINSCHEIN, 1991; HARDIN, 1996) (Figura 1).

Nesta evolução se destacam os estudos de Friedrich L A Weismann, e Hans Driesch. Weismann, amplo seguidor da Teoria da Seleção Natural de Darwin, formulou uma série de conceitos ao redor da herança e o desenvolvimento. Usando ouriços do mar como modelo, teorizou que o corpo estava formado por dois tipos celulares, as células germinais e as células somáticas, sendo que a célula germinal seria o resultado da união do óvulo e o espermatozoide no plasma germinativo, capaz de produzir um organismo completo e de transmitir a herança.

O zigoto teria no seu interior, “determinantes” ou estruturas que futuramente produziram tecidos específicos. Assim, durante o segundo estágio de divisão celular do zigoto, as novas células apresentariam uma distribuição desigual destas determinantes, no que ele chamou o Modelo de Mosaico ou modelo de Determinação Nuclear. Assim, no Modelo de Mosaico cada nova célula do tipo somático apresenta no seu núcleo uma “determinante” para gerar um tecido ou estrutura específica (WEISMANN, 1893).

⁴Em 1830 Joseph Jackson Lister inventou o microscópio acromático, o que permitiu a melhor visualização dos objetos e com isto o surgimento da Teoria Celular.

⁵1817-1850 Embriologia descritiva (Christian Pander, Karl Ernst Von Baer, Heinrich Rathke).

1870-1900 Embriologia comparada (Ernst Haeckel e Friedrich Leopold August Weisman).

1880-1910 Embriologia experimental ou *Entwicklungsmechanik* (Wilhelm Roux, Gustav Born, Oscar Hertwing, Hans Driesch e Thomas Hunt Morgan).

No entanto, Hans Driesch, realizando manipulações do modelo animal de Weismann, demonstrou que as células no zigoto retêm todas as informações ou “determinantes”, sendo possível a partir de qualquer célula o desenvolvimento completo do organismo, apesar de remover ou reordenar suas estruturas. Em seu experimento separou um ovo de ouriço de mar na fase da segunda divisão celular, produzindo duas blástulas da metade do tamanho do original que chegaram até o estado larvário. Driesch concluiu que cada blastômero reteve as “determinantes” ou sua “totipotência⁶”. Adicionalmente, o experimento consolidou o efeito de regulação embrionária, que consiste na habilidade das células do embrião de desenvolver-se pela interação com outras células ou o ambiente (DRIESCH, 1908).

Paralelamente a palavra célula-tronco e sua definição apareciam pela primeira vez na literatura científica nos trabalhos pioneiros em ecologia e embriologia de Ernst Haeckel, Theodor Boveri e Edmund B Wilson (Figura 1). Entre 1868 e 1876, Haeckel também seguidor da Teoria da Seleção Natural de Darwin, desenhou em seus estudos de ecologia das populações “árvores filogenéticas” de diferentes organismos, que chamou *Stammbaume*⁷, para propor a existência de um organismo simples e unicelular do qual são gerados todos os organismos (HAECKEL, 1874). Posteriormente Haeckel aplicaria este conceito no ambiente celular, sendo chamada *Stammzellen* (célula-tronco) aquela célula com capacidade de gerar todos os tipos de células de um organismo (HAECKEL, 1876a, 1876b).

Por sua parte, Theodor Boveri em seus estudos das linhagens celulares em nematodeos, retomou os postulados de Haeckel, acrescentando que, unicamente as células no plasma germinal entre a etapa da fertilização e a formação da camada germinativa poderiam ser chamadas *Stammzellen* (BOVERI, 1892a, 1892b). Na literatura inglesa, Edmund B. Wilson popularizou o termo *stem cell* pela tradução e reconstrução dos achados de Haeckel e Boveri⁸(WILSON, 1896).

Na área médica, o interesse na fisiologia do sistema hematopoiético produziu questionamentos sobre a existência de um precursor em comum para os tipos celulares

⁶ Driesch descreve a totipotência como a habilidade da célula (o blastômero) de responder às necessidades “do todo” e se converter em qualquer parte que as condições do ambiente o demandarem.

⁷Do alemão *Stammbaum* (linhagem, filogenia, filogênese).

⁸No seu livro *The cell in development and inheritance*.

do sangue. Assim, a final do século XIX, Artur Pappenheim, Alexander Maximow e Wera Dantschakoff entre outros pesquisadores, adotaram o termo “célula-tronco” dos textos em embriologia para referir-se ao precursor celular do sistema hematopoiético (Figura 1). Este precursor representaria uma célula que originaria eritrócitos, granulócitos e linfócitos. As células propostas como os precursores foram descritas como grandes linfócitos polivalentes (PAPPENHEIM, 1908a, 1908b), linfócitos não diferenciados-não granulares (DANTSCHAKOFF, 1908) e linfócitos verdadeiros (MAXIMOW, 1909).

O auge das sociedades contemporâneas e das ciências

No século XX o crescimento econômico incentivou o nacionalismo e os embates políticos, ideológicos e militares, as disputas se intensificaram até chegar ao que se conhece como a I e II Guerra Mundiais.

Na Europa, as guerras deixaram mortes em massa, tanto de soldados quanto de cidadãos comuns. Os genocídios sem precedentes levaram ao atraso econômico e uma nova configuração geopolítica. Os Estados Unidos se consolidaram como uma nova potência mundial e ao final do século XX, múltiplas reformas econômicas, acordos e mudanças políticas marcaram o fim das guerras, permitindo grandes avanços em comunicação, transporte e saúde, e com isto o desenvolvimento sem precedentes das ciências⁹ (Figura 3).

Nesse cenário, os acontecimentos em Hiroshima e Nagasaki em 1945¹⁰, marcaram um momento transcendente para as ciências médicas. Após a bomba atômica, a massiva exposição da população às doses baixas de radiação levou a numerosos problemas metabólicos que consolidaram na área medica o ressurgimento da linha de pesquisa no sistema hematopoiético.

⁹ 1900-1980 Grandes invenções em tecnologia, transportes e comunicação, como o avião (Santos Dumond e irmãos Wright), a Teoria da Relatividade (Albert Einstein), o radar (Christian Hulsmeyer), a fibra ótica (Narinder Singh Kapany) e o computador moderno (Alan Turing) entre outros.

¹⁰ Os bombardeamentos atômicos de Hiroshima e Nagasaki foram realizados pelos Estados Unidos contra o Japão nos estágios finais da Segunda Guerra Mundial, nas chamadas Guerras do Pacífico em agosto de 7 a 9 de 1945. Os sobreviventes foram chamados *hibakusha*, que se traduz como “pessoa afetada pela explosão” (http://www.rerf.jp/intro/index_e.html).

Os estudos nos modelos animais revelaram que a morte após doses baixas de radiação foi o resultado da disfunção de vários processos biológicos; assim, a perda de leucócitos levou à infecção; a perda de plaquetas à falta de coagulação e a perda de glóbulos vermelhos à anemia fatal (WEISSMAN, 1997; DOMEN *et al.*, 2006).

De tal modo, quase duas décadas depois o debate sobre a existência de um precursor ou célula-tronco hematopoiética chegaria ao fim pelos trabalhos de James Till e Ernest McCulloch e colaboradores em 1960 (Figura 1). A equipe encontrou os componentes responsáveis pela geração e regeneração do sangue na medula óssea e promulgaram as teorias centrais sobre as células-tronco¹¹ (TILL *et* McCULLOCH, 1961).

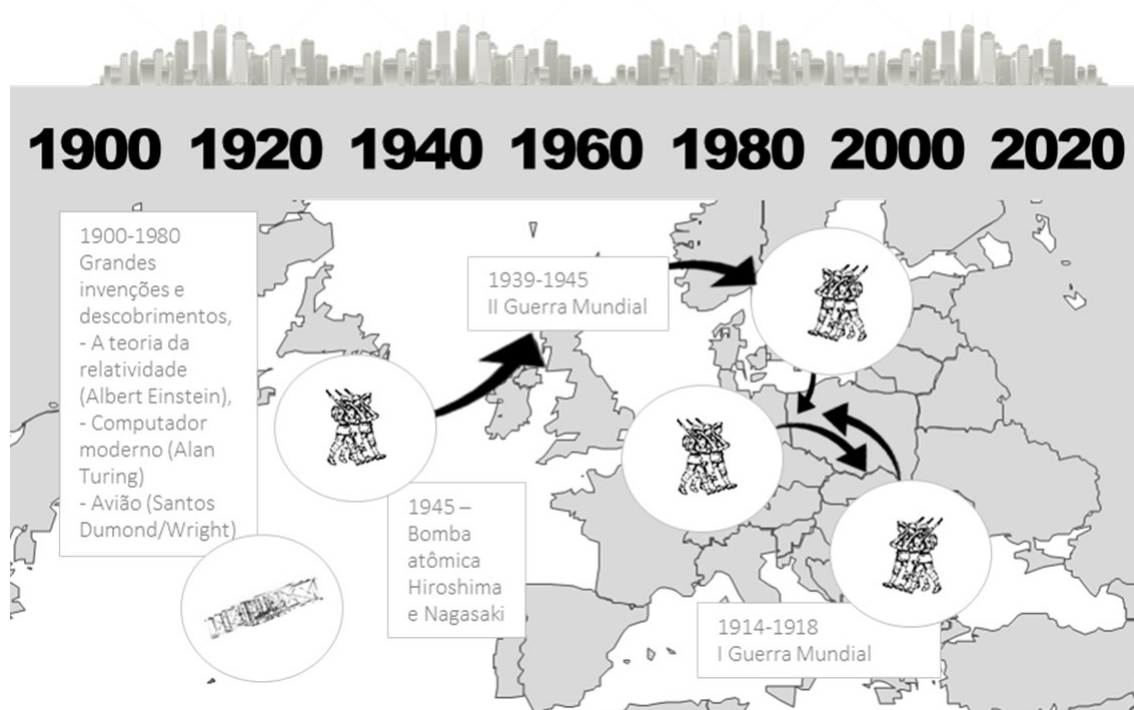


FIGURA 3. Século XX, a I e II Guerra Mundial. Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

Para finais de 1900, com o descobrimento das células-tronco hematopoiéticas a metodologia experimental ganhou importância, os cientistas enxergaram que sua aplicação permitia a manipulação de múltiplas condições ligadas ao desenvolvimento dos organismos, encontrando as respostas que poderiam ser impossíveis em outros contextos (CHURCHILL, 1991).

¹¹As células podem auto renovar-se e podem produzir células que geram todos os tipos celulares do sangue.

Paralelamente, a embriologia como disciplina evoluiu até se converter numa parte do que atualmente se conhece como biologia do desenvolvimento, campo da biologia que abrange desde os processos embrionários, até a regeneração e o envelhecimento dos organismos.

Assim, os estudos em anfíbios se popularizaram devido a seu tamanho e facilidade de obtenção. De tal modo, Hans Spemann em 1935 foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta das áreas embrionárias na gástrula anfíbia e o conceito de indução embrionária, na teoria conhecida como o Organizador de Spemann (SPEMANN *et* MANGOLD, 1924; OPPENHEIMER, 1991; SAHA, 1991; KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 3).

Spemann trabalhando com embriões de anfíbios, mostrou que a atividade organizadora se restringe a uma região do embrião denominada lábio dorsal do blastoporo, destinada a formar o mesoderma dorsal. No seu experimento, Spemann demonstrou o papel da região organizadora na formação do sistema nervoso transplantando pequenos fragmentos de tecido do lábio dorsal de um embrião doador pigmentado em um hospedeiro. Pelo transplante de células organizadoras do embrião doador pigmentado no hospedeiro não pigmentado Spemann e a sua equipe descobriram que células organizadoras transplantadas seguiam seu programa de desenvolvimento, gerando tecido mesodérmico da linha média, os somitos e a notocorda (SPEMANN *et* MANGOLD, 1924; KANDEL *et al.*, 2014).

Contudo, as células transplantadas também causaram uma impressionante mudança no destino das células vizinhas do embrião hospedeiro, que foram induzidas a formar um novo sistema nervoso. Estes achados permitiram concluir que embora cada área na gástrula é responsável pela formação do corpo embrionário, o destino das células e dos tecidos pode ser determinado pelos sinais recebidos na interação célula-célula (SPEMANN *et* MANGOLD, 1924; KANDEL *et al.*, 2014)

O modelo bem sucedido de indução embrionária de Spemann foi replicado posteriormente por Robert Briggs e Thomas J. King, os quais transplantaram núcleos de blástula ou gástrula em ovos enucleados de anfíbios resultando em embriões viáveis (BRIGGS *et* KING, 1952). Mas foi em 1958 quando John B. Gurdon retomando o trabalho em anfíbios de Briggs e King; decidiu aprimorar a metodologia de transplante para consolidar o que se conhece como experimentos em transferência nuclear em células

somáticas, sendo os estudos pioneiros na reprogramação de células adultas (GURDON *et al.*, 1958) (Figura 1). Sua importância seria visível com os estudos de Steen M. Willadsen e finalmente de Keith H. S. Campbell os quais desenvolvendo a metodologia de Gurdon, em 1996 comunicaram o nascimento da ovelha Dolly o primer mamífero clonado de células somáticas da glândula mamária (WILMUT *et al.*, 1997) (Figura 1).

Finalmente, e embora nos experimentos anteriores é notória a influência das teorias em embriologia e biologia do desenvolvimento no atual estado da arte nas células-tronco, a conexão mais atual se encontra nos trabalhos de Shinya Yamanaka e Kazutoshi Takahashi (Figura 1). Yamanaka e Takahashi baseados nos achados de John B. Gurdon de transferência nuclear, realizaram a transdução de genes do núcleo das células-tronco embrionárias em células somáticas adultas por meio de vetores virais¹². Após a transdução as células somáticas adultas apresentaram as características de autorenovação e pluripotência das células-tronco embrionárias¹³ (TAKAHASHI *et YAMANAKA*, 2006).

Pela descoberta dos fatores de transcrição e genes de pluripotência e as *IPSc*, Yamanaka e Gurdon ganharam o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 2007. Atualmente estas células são alvo de múltiplas pesquisas, como modelos *in vitro* de doenças, no teste de medicamentos e no estudo dos mecanismos de manipulação das linhagens celulares.

Conceitos gerais em células-tronco

Com o descobrimento das células-tronco hematopoiéticas, as outras linhagens de células-tronco e os experimentos de transferência nuclear em 2001 o NIH (*National Institute of Health*) preparou um relatório do estado da ciência em células-tronco.

Nesse relatório a célula-tronco é definida como uma célula com habilidade de se auto-replicar por períodos indefinidos durante a vida do organismo. Sobre as condições apropriadas, ou dados os sinais apropriados, as células-tronco podem produzir múltiplos tipos celulares, sendo que, as células-tronco tem o potencial para diferenciar-se em

¹²KLF4, C/MYC, SOX/2, NANOG, OCT4 e LIF28.

¹³As novas células foram chamadas células-tronco pluripotentes induzidas *IPSc Induced Pluripotent Stem cells*.

células maduras com morfologia característica e funções especializadas (NIH, 2001) (Quadro 1, Figura 4).

Quadro 1. Origem das células-tronco e seu potencial de diferenciação		
Tipo de célula-tronco	Origem	Potência
Células-tronco embrionárias	Células da massa celular interna do blastocisto	Pluripotentes produz todos os tecidos embrionários
Células-tronco adultas	Células das camadas germinativas	Multipotentes produz os tipos celulares da camada da qual se origina
Células-tronco pluripotentes induzidas	Células somáticas adultas reprogramadas com os genes KLF4, C/MYC, SOX/2, NANOG, OCT4 e LIF28	Pluripotentes produzir todos os tipos celulares, sendo equivalente as células-tronco embrionárias

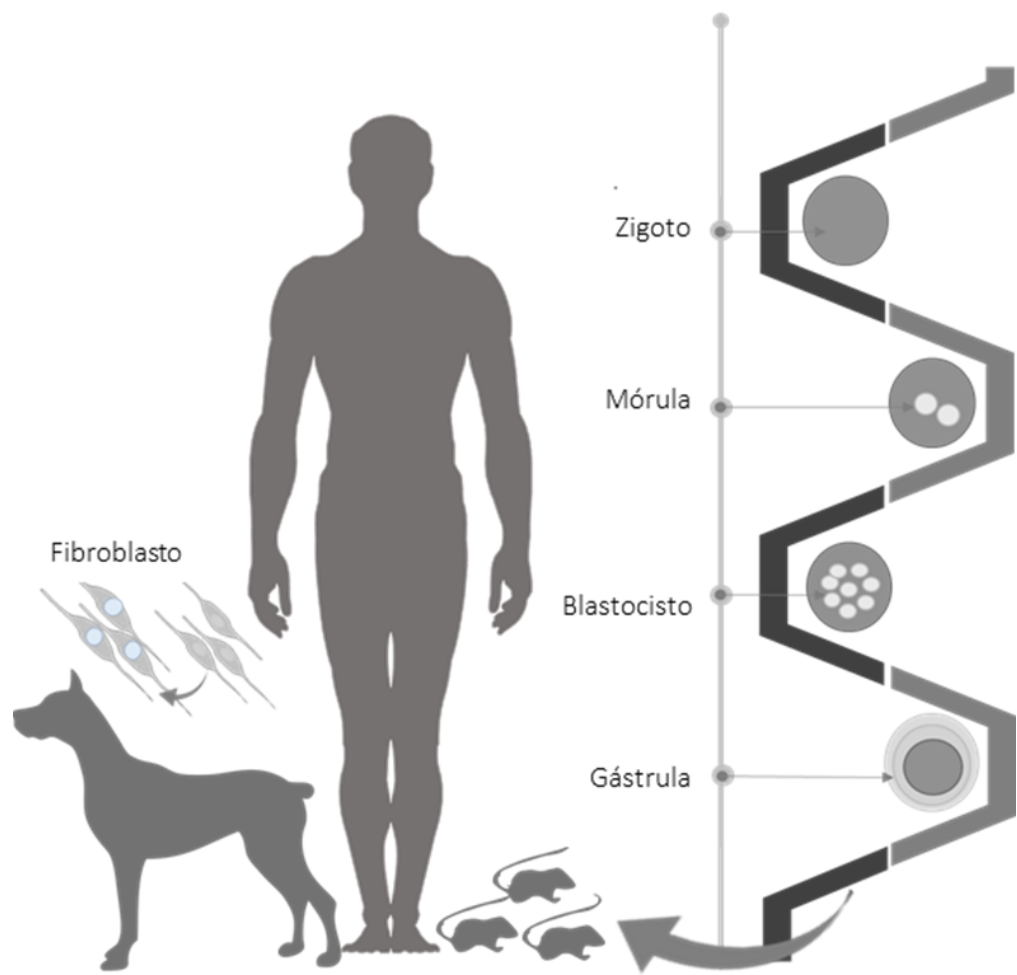


FIGURA 4. Origem das células-tronco e seu potencial de diferenciação. As células-tronco embrionárias correspondem às células da camada interna do blastocisto com potencial para produzir todos os tipos celulares. As células-tronco adultas se referem às células a partir da gastrulação, são multipotentes com capacidade de produzir células da camada germinativa correspondente. As células-tronco pluripotentes induzidas se referem às células somáticas adultas reprogramadas com potencial para produzir todos os tipos celulares. Por fim, o zigoto é a única célula com potencial para produzir todos os tipos celulares junto aos anexos embrionários (EVANS et KAUFMAN, 1981; TAKAHASHI et YAMANAKA, 2006). Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

1.2.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

Na formação do sistema nervoso as células-tronco, progenitores e células imaturas realizam os processos de proliferação, migração e diferenciação.

Estes processos são regulados por proteínas que agem como fatores indutores ou sinalizadores, como o ácido retinóico, FGF, BMPs, SHH, WNT e NOTCH.

A proliferação e diferenciação das células-tronco neurais (NSCs) envolve modos simétricos e assimétricos de divisão celular produzindo todos os tipos de células neurais e por conseguinte a formação das regiões primitivas do sistema nervoso.

Na migração, as NSCs, progenitores e neurônios seguem três principais programas, radial, tangencial e livre. Na migração radial, os neurônios movem-se ao longo das células da glia radial. Na migração tangencial, os neurônios utilizam os tratos dos axônios como guia.

1.2.2 Desenvolvimento do sistema nervoso

Os estudos no desenvolvimento do sistema nervoso dos organismos começaram no século XX. Múltiplos pesquisadores europeus descreveram as células neurais, entre eles Camilo Golgi e Santiago Ramón y Cajal. Apesar de achados antagônicos utilizando as técnicas de impregnação por prata¹⁴ estes dois pesquisadores, baseados no exame microscópico do tecido encefálico foram reconhecidos com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1906.

Para a época estes pesquisadores, particularmente Ramon y Cajal anunciaram que era praticamente impossível haver geração de neurônios novos no encéfalo adulto, no que décadas depois se chamaria o “dogma da neurogênese”. Atualmente é consenso que a formação do sistema nervoso requer a participação ativa das células-tronco, progenitores e células neurais.

Assim, na formação do sistema nervoso as células realizam três processos fundamentais, a proliferação, migração e diferenciação. Embora estes processos ocorram coordenadamente/simultaneamente, a continuação será feita uma descrição de cada um deles e os principais fatores indutores envolvidos.

A transição do ectoderma ao tubo neural

O desenvolvimento do sistema nervoso dos vertebrados tem seu ponto de partida na fase embrionária da gastrulação. A gastrulação é a etapa onde o embrião efetua a evaginação e divisão das células da camada interna do blastocisto para gerar as três camadas primitivas ou camadas germinais (DUPLIN *et al.*, 1995; PURVES, 2012; KANDEL *et al.*, 2014).

Com a divisão das camadas germinativas, as células da linha média do mesoderma se agregam para formar a notocorda, uma estrutura primitiva que define o eixo longitudinal do embrião e promove a segmentação e diferenciação do corpo embrionário. No caso do sistema nervoso, a notocorda é o principal centro organizador

¹⁴Golgi falava de uma estrutura em sincício, o que deu lugar à sua “teoria reticular”, Cajal se referia a estruturas separadas fisicamente, o que deu lugar à teoria ou “doutrina neuronal”

e influencia a diferenciação ou neurulação do ectoderma (DUPLIN *et al.*, 1995; PURVES, 2012; KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 5).

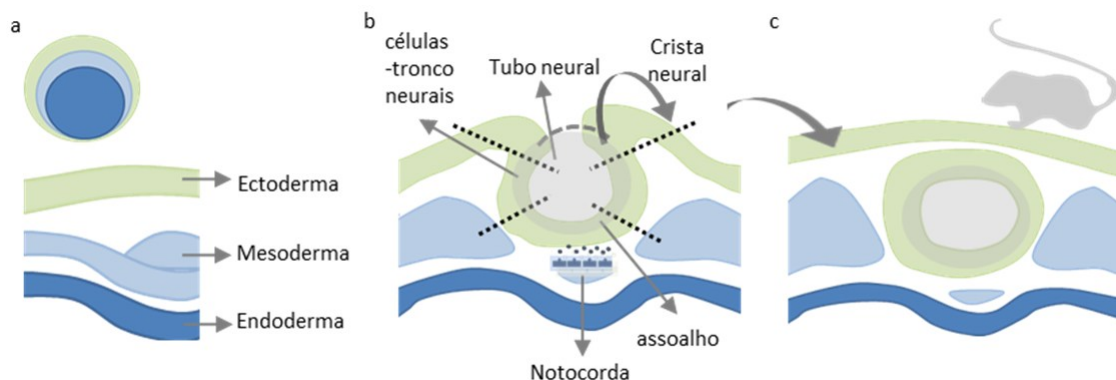


Figura 5. Transição das camadas germinativas ao tubo neural. Na gastrulação se produzem as três camadas germinativas, a camada mais externa é a ectoderma; a camada média o mesoderma; e a camada interna o endoderma (a). O endoderma originará os órgãos digestivos e respiratórios, o mesoderma a notocorda e posteriormente os músculos e o sistema vascular. Finalmente o ectoderma dará origem ao tubo neural e a pele. Com a divisão das camadas germinativas, as células da linha média do mesoderma se agregam para formar a notocorda (b,c) que induz a diferenciação ou neurulação do ectoderma para a formação do tubo neural. No tubo coexistem várias populações celulares; as células-tronco ou precursores neurais que geram progenitores neuronais e gliais; as células da linha média-ventral ou as células do assoalho, encarregadas de produzir fatores indutores para a manutenção dos precursores; e as células da crista neural ou precursores migratórios que formarão o sistema nervoso periférico e estruturas anexas neurosecretórias (DUPLIN *et al.*, 1995; PURVES, 2012; KANDEL *et al.*, 2014). Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

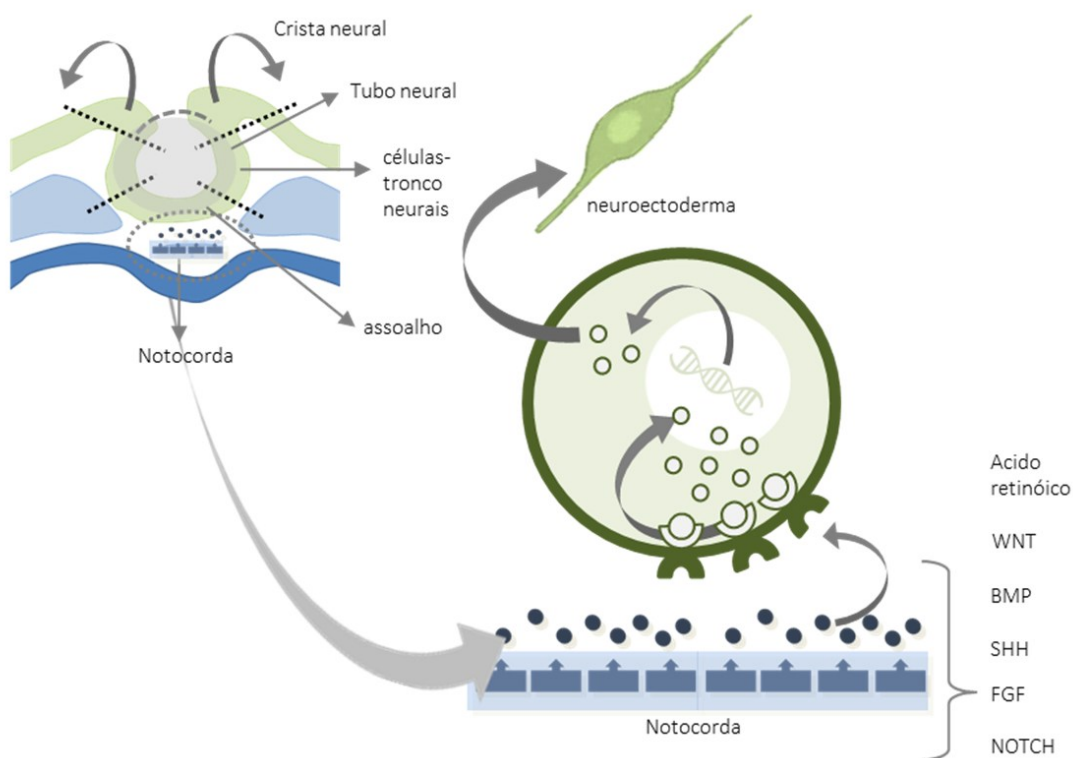


FIGURA 6. Participação da notocorda na formação do neuroectoderma. A notocorda libera proteínas que agem como fatores indutores ou sinalizadores sobre os receptores nas células do ectoderma. Quando ativados se desprende uma cascata de sinalização que leva a expressão de genes que produzem a diferenciação da célula ectodérmica a uma célula neural e com isto a formação da placa e depois o tubo neural (DUPLIN *et al.*, 1995; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014). Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

As células da notocorda liberam proteínas que agem como fatores indutores ou sinalizadores nas células do ectoderma. Alguns desses fatores difundem-se livremente

e exercem suas ações a certa distância, mas outros estão ligados à superfície celular e agem localmente através da interação com fatores de transcrição que induzem a expressão de genes. Com isto se induz a diferenciação e proliferação de uma célula ectodérmica em uma célula neural (DUPLIN *et al.*, 1995; RASH *et al.*, 2011; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014; KUMAR *et DUESTER*, 2014) (Figura 6).

Entre os fatores indutores liberados será descrito o papel do ácido retinóico, o FGF (*Fibroblastic Growth Factor*), as BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), as SHH (*Sonic Hedgehog*), os membros da família WNT e NOTCH.

Ácido retinóico

O ácido retinóico foi o primeiro fator indutor descoberto (PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014). As células apresentam receptores intracelulares específicos ou RAR_s . Os receptores RAR_s mais estudados são os RAR_α , RAR_β , e RAR_γ . Estes receptores ativam fatores de transcrição ou RAR_{Es} encarregados da indução neural (CUI *et al.*, 2003; KUMAR *et DUESTER*, 2014; WAI *et al.*, 2015) (Figura 7a).

A ligação do ácido retinóico aos RAR_s é importante na manutenção das células-tronco durante o desenvolvimento embrionário e a regeneração do tecido (WAI *et al.*, 2015). Especificamente, o sinal do ácido retinóico é necessário durante o estágio de pré-segmentação na formação da medula espinhal (GRANDEL *et al.*, 2002).

Fibroblastic Growth Factor (FGF)

Os receptores do FGF são do tipo tirosina-quinase e trabalham em cooperação com componentes da matriz extracelular. Após a união se ativam domínios intracelulares que desencadeiam a cascata de sinalização RAS/MAP quinases. Esta cascata modifica componentes do citoesqueleto e do citoplasma e assim altera a forma, motilidade e a expressão gênica influenciando a proliferação celular das NSCs (BEENKEN *et MOHAMMADI*, 2009; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 7b).

Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

As BMPs são proteínas sintetizadas pelas células da notocorda, membros da família TGF β (*Transforming Growth Factor Beta*). A sinalização das BMPs age no

antagonismo à indução neural, assim, sob a sua influência as células sofrem diferenciação epidérmica, e suprimem o potencial neural (KANDEL *et al.*, 2014).

As BMP (BMP₄, BMP₅, BMP₆, BMP₇) atuam por meio de receptores da classe da serina/treonina quinases nas células ectodérmicas e fosforilam SMADs. As SMADs são pequenas proteínas intracelulares que transduzem o sinal dos ligantes TGF β . Após a fosforilação os SMADs sofrem translocação ao núcleo e interagem com outras proteínas modulando a expressão gênica seja para diferenciação ou proliferação. A diversidade dos efeitos das BMPs se deve às diferentes atividades dos seus receptores, alguns promovem a proliferação e outros induzem a parada do ciclo celular e a diferenciação (KANDEL *et al.*, 2014, URBAN *et al.* GUILLEMONT, 2014) (Figura 7c).

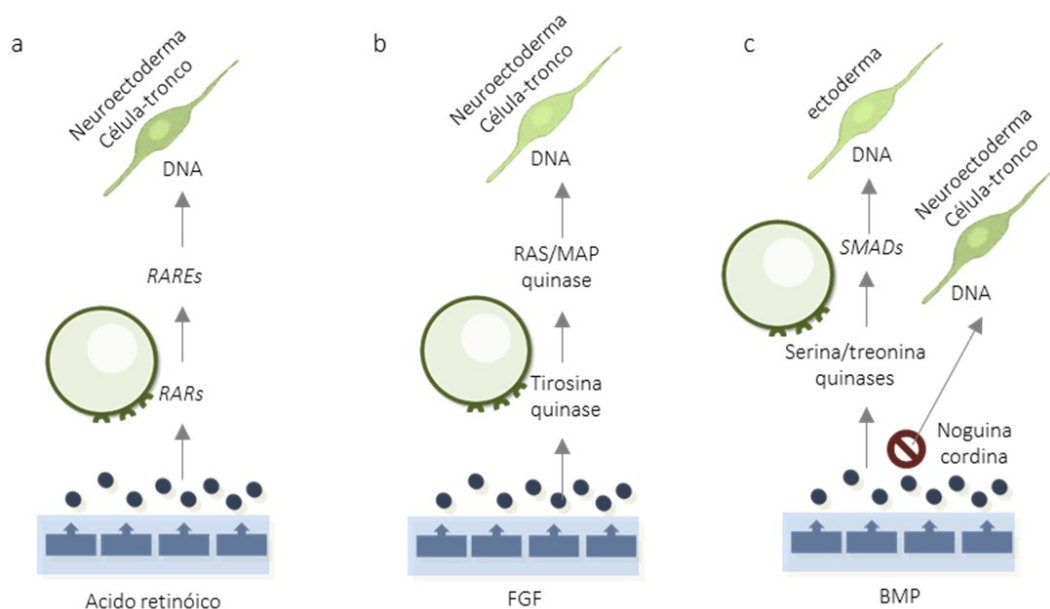


FIGURA 7. Participação dos fatores indutores na formação do neuroectoderma. Os fatores indutores apresentam vias de sinalização compartilhadas na formação do sistema nervoso primitivo. As células da notocorda e do assoalho no tubo neural expressam fatores indutores como (a) Ácido retinóico, (b) FGF e (c) BMPs. Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

Na indução neural da notocorda e dos centros organizadores se produz a liberação de fatores antagonistas das BMPs que agem sobre as células ectodérmicas na formação da placa neural (KANDEL *et al.*, 2014). Dentre os fatores antagonistas se identificam *noggin* e *chordin*; ambos se unem às BMPs extracelulares bloqueando o sinal, produzindo a indução e proliferação das NSCs (SMITH *et al.* HARLAND, 1992; SASAI *et al.*, 1995; BONAGUIDI *et al.*, 2008).

Outros fatores apresentam sinalização indireta, entre eles se descrevem o SHH e o WNT. Estes fatores serão descritos na proliferação por terem maior influência nesta etapa.

Proliferação das células-tronco e os progenitores

Após a formação do tubo neural as NSCs e progenitores proliferam rapidamente. A proliferação segue os princípios básicos da indução das células do neuroectoderma e envolve modos simétricos e assimétricos de divisão celular produzindo todos os tipos de células neurais, o que torna possível controlar a auto-renovação ou a diferenciação, e por conseguinte a formação das regiões primitivas do sistema nervoso (LEVISON *et al.*, 2006; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 9, Quadro 2).

Quadro 2. Tipos de regulação dos fatores indutores sobre as células-tronco neurais (NSCs) e progenitores	
Instrutivo	Influencia o resultado do processo de divisão e fazendo com que a célula-tronco adote um destino
Seletivo	Permite a sobrevivência e a maturação de apenas certas células descendentes

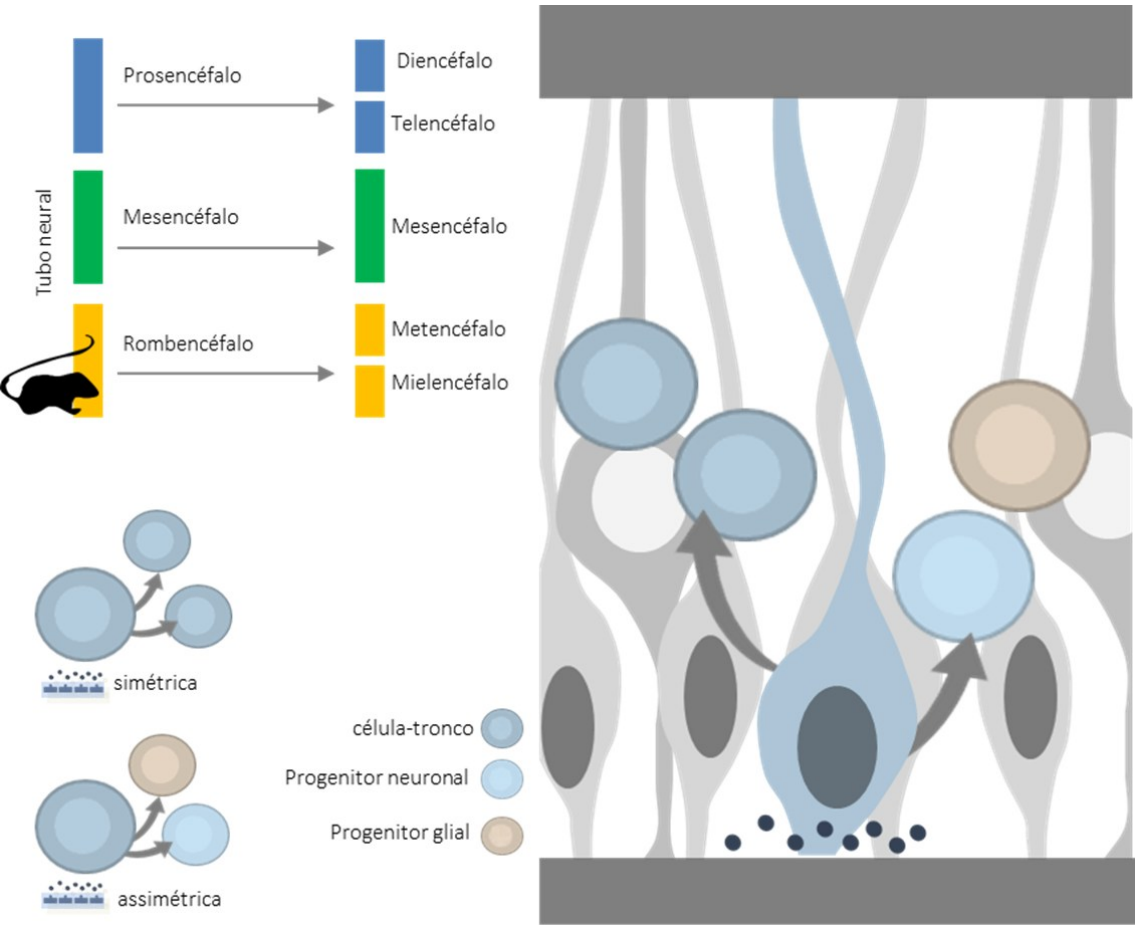


FIGURA 8. Formação do sistema nervoso primitivo. As células se organizam em unidades repetitivas chamadas neurômeros produzindo a segmentação do tubo com o que se estabelece a identidade regional do corpo. A segmentação do tubo apresenta dois estágios, o estágio primário produz três vesículas (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo) das quais há uma progressão para o estágio secundário de cinco vesículas (diencéfalo, telencéfalo, mesencefalo, metencefalo, mielencefalo). A segmentação do tubo é facilitada pela proliferação assimétrica e simétrica das células-tronco neurais. Na divisão assimétrica a célula-tronco produz uma célula indiferenciada, que corresponde a um progenitor neuronal ou glial, e outra que mantém suas propriedades como célula-tronco. Na divisão simétrica as células-tronco geram duas células-tronco (LEVISON *et al.*, 2006; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014). *Artwork by* Lina Maria Delgado-Garcia.

Assim, os fatores que participam da indução do neuroectoderma (ácido retinóico, FGF, BMP, WNT, SHH, NOTCH) também participam da proliferação das células-tronco.

WNT

No caso das proteínas WNT (WNT_{2a}, WNT_{2b}, WNT_{3a}, WNT_{5a}), a quantidade de atividade sinalizadora vai aumentando progressivamente no sentido caudal, sendo que participa ativamente na formação do hipocampo (PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014; URBAN *et al.*, 2014; DUNCAN *et al.*, 2015) (Figura 9a,c).

Diferentes receptores podem ativar a via de sinalização do WNT. Depois de unido aos receptores, WNT se degrada em um complexo de proteínas no citoplasma que impede a translocação da β -catenina no citoplasma. Na ausência de WNT a β -catenina é fosforilada no complexo β -catenina-axin-APC-GSK₃, assim, quando o sinal WNT é ativado, GSK₃ é inibido pela proteína DV₁ e a β -catenina é estabilizada e entra no núcleo para se associar com o fator de transcrição TCF/LEF produzindo a proliferação das NSCs (KANDEL *et al.*, 2014; DUNCAN *et al.*, 2015). A associação com este fator pode estar relacionada indiretamente com a ativação do fator de transcrição NEUROD₁, da família de fatores BHLH, o qual permite a expressão do gene NEUROD₁, que apresenta sítios de união a TCF/LEF (KANDEL *et al.*, 2014; DUNCAN *et al.*, 2015).

Sonic Hedgehog (SHH)

O SHH tem um papel central na formação do telencéfalo e o diencéfalo. Após a união aos receptores, o complexo SHH-receptor, influencia a translocação nuclear de fatores de transcrição GLI que modulam a expressão gênica. Assim, a ligação do SHH ao receptor PTC diminui a inibição da proteína SMO e assim, ativa uma via de sinalização intracelular que envolve proteínas-quinases, proteínas de transporte e proteínas GLI (PALMA *et al.*, 2003; PALMA *et al.*, 2005).

Um gradiente extracelular de proteínas SHH é convertido em um gradiente nuclear de proteínas GLI ativadoras. A razão entre proteínas GLI repressoras e GLI ativadoras em diferentes posições dorsoventrais determina quais genes são ativados. Os principais alvos das proteínas GLI são os genes que codificam fatores de transcrição do tipo homeo-box e do tipo BHLH (PALMA *et al.*, 2003; PALMA *et al.*, 2005; KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 9b,c). Adicionalmente o SHH atua através dos receptores de EGF e FGF na membrana celular das NSCs e progenitores (PALMA *et al.*, 2003; PALMA *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2013; KANDEL *et al.*, 2014).

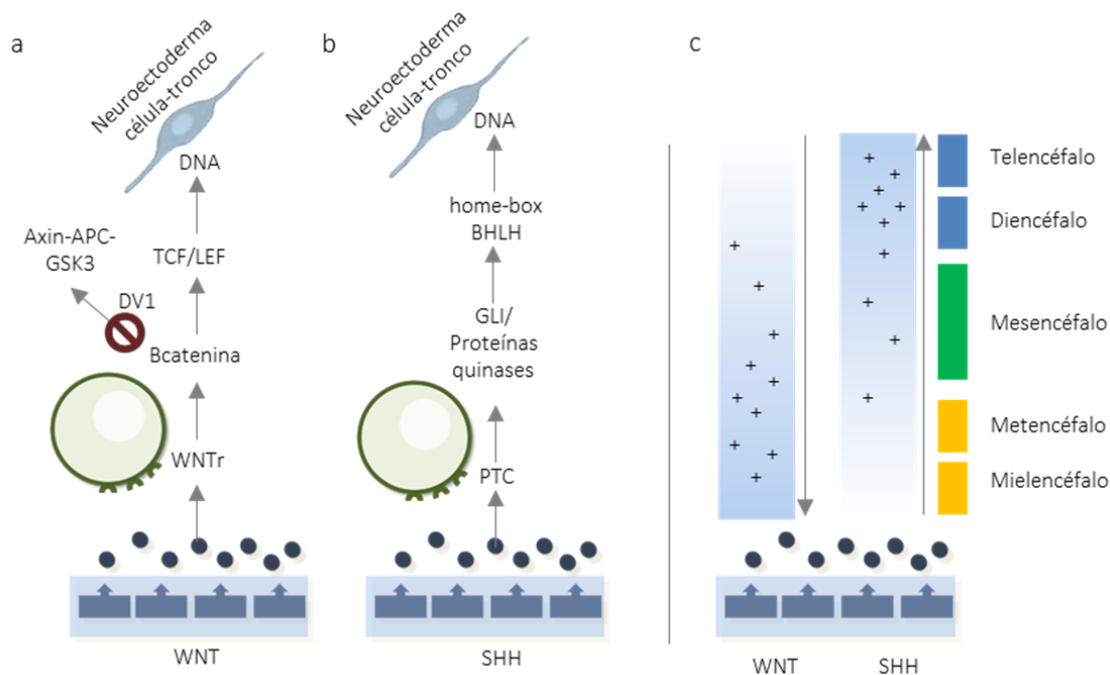


FIGURA 9. Participação dos fatores indutores na formação do sistema nervoso primitivo. As células expressam fatores indutores como (a) WNT e (b) SHH entre outros. As células são expostas a níveis crescentes ou decrescentes dos fatores indutores e, assim, adquirem um caráter regional. A atividade da WNT vai aumentando no sentido caudal. O SHH é importante na formação do telencéfalo e o diencefalo (c). *Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.*

Os programas de migração dos neurônios imaturos

Após a proliferação e diferenciação, a migração é um dos eventos mais importantes na formação do sistema nervoso, sendo que segue três principais programas, a migração radial, tangencial e livre.

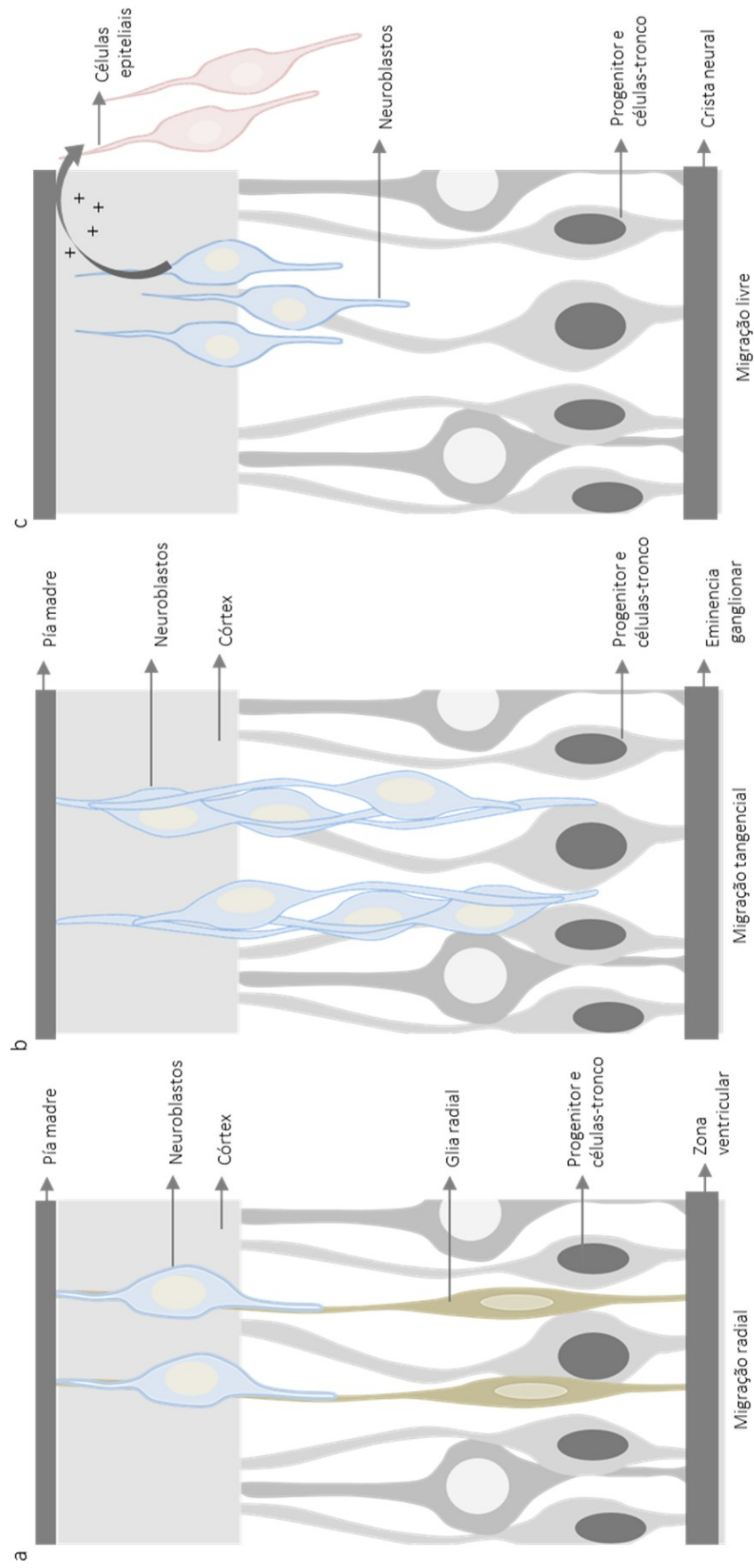


FIGURA 10. Tipos de migração dos neurônios no sistema nervoso. Na migração radial (a) os corpos da glia radial estão localizados próximos à superfície ventricular e originam fibras alongadas que atravessam a parede do cérebro. O processo principal dos neurônios imaturos ou neuroblastos se envolve ao redor do eixo da célula da glia radial. A glia radial apresenta receptores para adesão, como integrinas. Os neuroblastos se movimentam em resposta ao corpo basal que dirige seu núcleo. Assim, o corpo basal projeta um sistema de microtúbulos fornecendo o conduto para o movimento nuclear que dá o sentido da migração. Na migração tangencial (b) os tratos formados pelos axônios dos neurônios servem como uma plataforma para a migração. Os tratos de axônios conectam regiões de neurogênese com o neocórtex. Os neurônios imaturos ou neuroblastos ficam firmemente associados aos dos axônios dos neurônios no córtex. Na migração livre (c) as células da crista neural são transformadas de células epiteliais em células mesenquimais e se dissociam do tubo neural. Elas então migram para diversos locais ao longo do corpo. A migração livre requer modificações citoarquitônicas e de adesão celulares dadas por moléculas sinalizadoras como BMPs. Alterações na expressão de proteínas de adesão, em especial caderinas, integrinas, laminina e colágenos, permitem que as células da crista neural percam seus contatos de adesão com células do tubo neural (LEVISON *et al.*, 2006; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014) Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

Na migração radial, os neurônios movem-se ao longo das células da glia radial (Figura 10a). Acontece na zona ventricular e é importante no desenvolvimento do córtex de primatas, onde neurônios necessitam migrar longas distâncias a medida que o córtex se expande (LEVISON *et al.*, 2006; PURVES *et al.*, 2012).

Na migração tangencial, os neurônios utilizam os tratos dos axônios como guia (Figura 10b). A migração acontece nas eminências ganglionares média e lateral, sendo igualmente importantes no desenvolvimento do córtex, especialmente no telencéfalo ventral onde se devem seguir vias precisas de deslocamento (PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014).

Estes dois tipos de migração serão descritos mais especificamente no tópico de formação do córtex cerebral.

A migração livre ocorre no sistema nervoso periférico sem os tratos da glia radial ou dos axônios. As células que migram se originam das células-tronco da crista neural e podem seguir três caminhos, no primeiro as células migram dorsalmente e se diferenciam em neurônios sensoriais dos gânglios, no segundo caminho se aproximam à pele e dão origem aos melanócitos. Por último, no terceiro caminho, as células seguem uma via migratória mais medial-ventral e se desenvolvem como neurônios simpáticos do sistema nervoso autônomo e mesentérico (PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 10c).

O controle da proliferação e diferenciação das NSCs

O padrão inicial e controle da proliferação e diferenciação celular no tubo neural pode ser visto como uma série de interações dirigidas pelos fatores indutores sobre os fatores de transcrição o que determinam o destino das células. Assim, os desequilíbrios

na expressão dos fatores de transcrição podem ser rapidamente amplificados, comprometendo às células progenitoras com determinada identidade neural (KANDEL *et al.*, 2014).

Neurogenic locus notch homolog protein (NOTCH)

A ligação do NOTCH ao receptor DELTA resulta numa clivagem proteolítica (NICD) que entra no núcleo e forma o complexo NICD-RBPJK-MAML que age regulando a atividade dos fatores de transcrição BHLH (SCHOENHERR *et al.*, 1995; HIRATA *et al.*, 2002; PURVES *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014).

Assim, em um primeiro momento, durante o desenvolvimento embrionário, a ativação do sinal NOTCH induz a expressão de genes repressores do tipo BHLH como HES₁ que agem sobre genes pró-neurais como neurogenina₂, ASCL₁ e DLL₁, gerando a manutenção da linhagem de células-tronco e progenitores e inibição da diferenciação neuronal (IMAYOSHI *et al.*, 2010; IMAYOSHI *et al.*, 2013; KANDEL *et al.*, 2014).

Posteriormente, na formação das áreas primitivas do sistema nervoso, a geração e ou manutenção das células da glia radial se produz pela ativação de outros membros da família HES como HES₁ e HES₅ ativando a expressão do receptor ERBB (IMAYOSHI *et al.*, 2010; KANDEL *et al.*, 2014). Em estágios mais tardios do desenvolvimento, sinais NOTCH continuam ativando as proteínas HES, mas uma modificação das vias de resposta intracelular resulta na diferenciação em astrócitos. Nesse caso, as proteínas HES promovem a ativação do fator de transcrição, o STAT₃, que recruta o receptor serina/treonina quinase JAK₂, um potente indutor da diferenciação de astrócitos (KANDEL *et al.*, 2014). A geração de oligodendrócitos, segue em grande parte os princípios que regulam a produção de astrócitos. Sinais NOTCH regulam a expressão de dois fatores de transcrição BHLH, OLIG₁ e OLIG₂, os quais são essenciais na produção de oligodendrócitos (KANDEL *et al.*, 2014).

Por último, a geração de neurônios corticais requer que as células não sejam expostas aos sinais NOTCH. Esse processo ocorre por meio da expressão de NUMB, uma proteína citoplasmática que antagoniza a via de sinalização NOTCH (IMAYOSHI *et al.*, 2010; KANDEL *et al.*, 2014).

Assim, a inibição da sinalização NOTCH resulta na expressão de vários fatores de transcrição BHLH do tipo pro-neuronal como MASH₁, neurogenina₁, neurogenina₂ e NeuroD₁. Estas neurogeninas promovem a produção neuronal pela expressão do gene NEUROD₁, e bloqueiam a formação de astrócitos via inibição de JAK₂ e STAT₃ (KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 11).

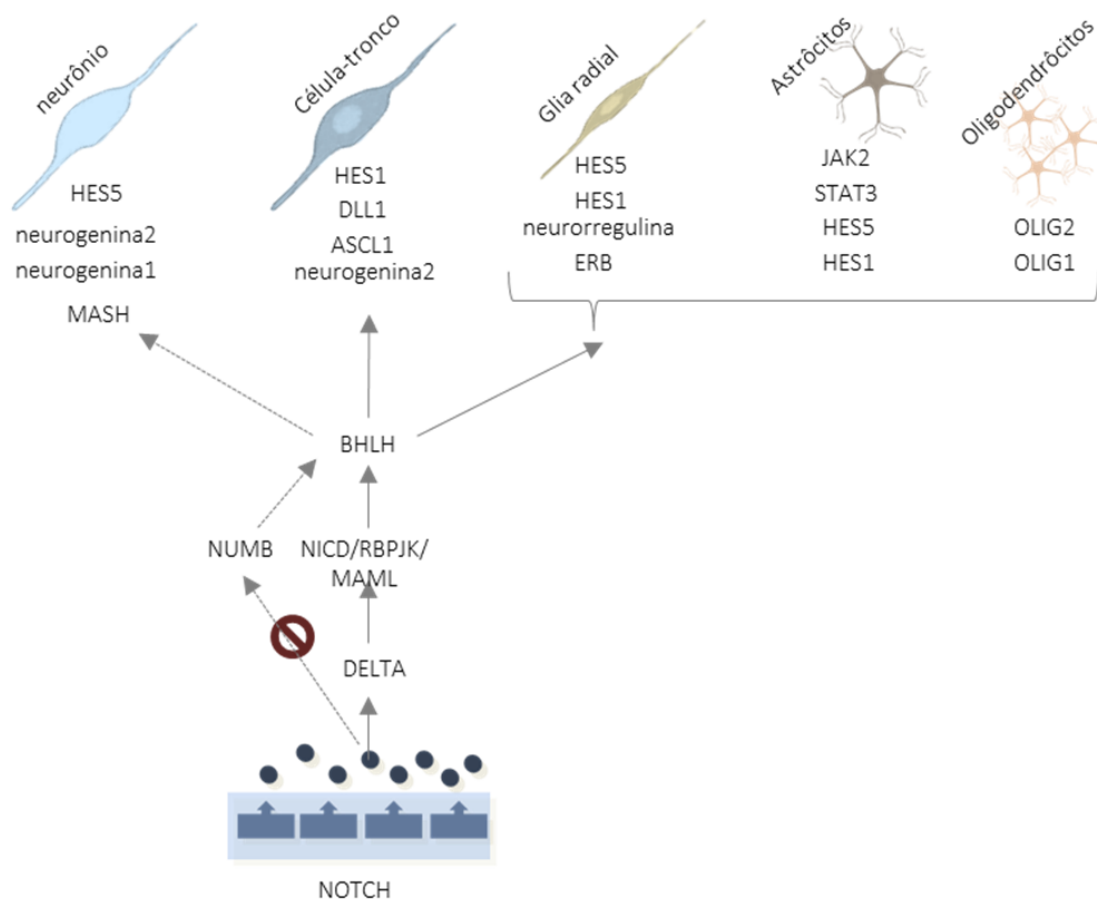


FIGURA 11. A diferenciação neural no sistema nervoso. NOTCH regula a expressão dos genes BHLH. Diferentes caminhos comprometem o destino das NSCs e progenitores seja para proliferação, produção de neurônios ou células da glia (glia radial, astrócitos e oligodendrócitos). Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

Além da sinalização NOTCH, várias outras vias de sinalização corroboram o programa molecular para definir a manutenção das células-tronco ou a diferenciação pós-mitótica.

Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF) e RE₁-Silencing Transcription Fator (REST)

Como mencionado anteriormente, estudos no desenvolvimento dos vertebrados, demonstram que a indução neural ocorre através de um sinal de repressão.

Nesse sentido, a expressão do sinal ocorre não pela presença de ativadores específicos, mas sim, pela ausência dos repressores, sendo este o caso das proteínas NRSF e REST.

NRSF é detectado em progenitores não diferenciados e células da glia radial, e age pela repressão de fatores neurogênicos BHLH e outros genes neuronais do tipo NRSE (*Neuron-Restrictive Silencer Element*) (SCHOENHERR *et al.* ANDERSON, 1995).

No caso da proteína REST, este fator silencia um conjunto de genes essenciais como RE₁ para a expressão neuronal, demonstrado em células indiferenciadas e não neuronais (CHONG ET AL, 1995).

SOX

Fatores de transcrição com homeo-domínios da classe SOX também tem um importante papel na manutenção de progenitores neurais e células da glia radial por bloquearem a atividade de proteínas neurogênicas BHLH. A diminuição da expressão de SOX₂ é um sinal regulador da transição entre células-tronco e progenitores. Assim, SOX₂ regula negativamente genes que promovem a proliferação dos precursores incluindo CICLINAD₁ (HUTTON *et al.* PEVNY, 2011; HAGEY *et al.* MUHR, 2014; KANDEL *et al.*, 2014).

Na Figura 12 se faz um sumário do desenvolvimento do sistema nervoso, com processos e a participação dos fatores indutores. Como mencionado, os processos ocorrem coordenadamente/simultaneamente e um fator pode estimular o regular vários processos.

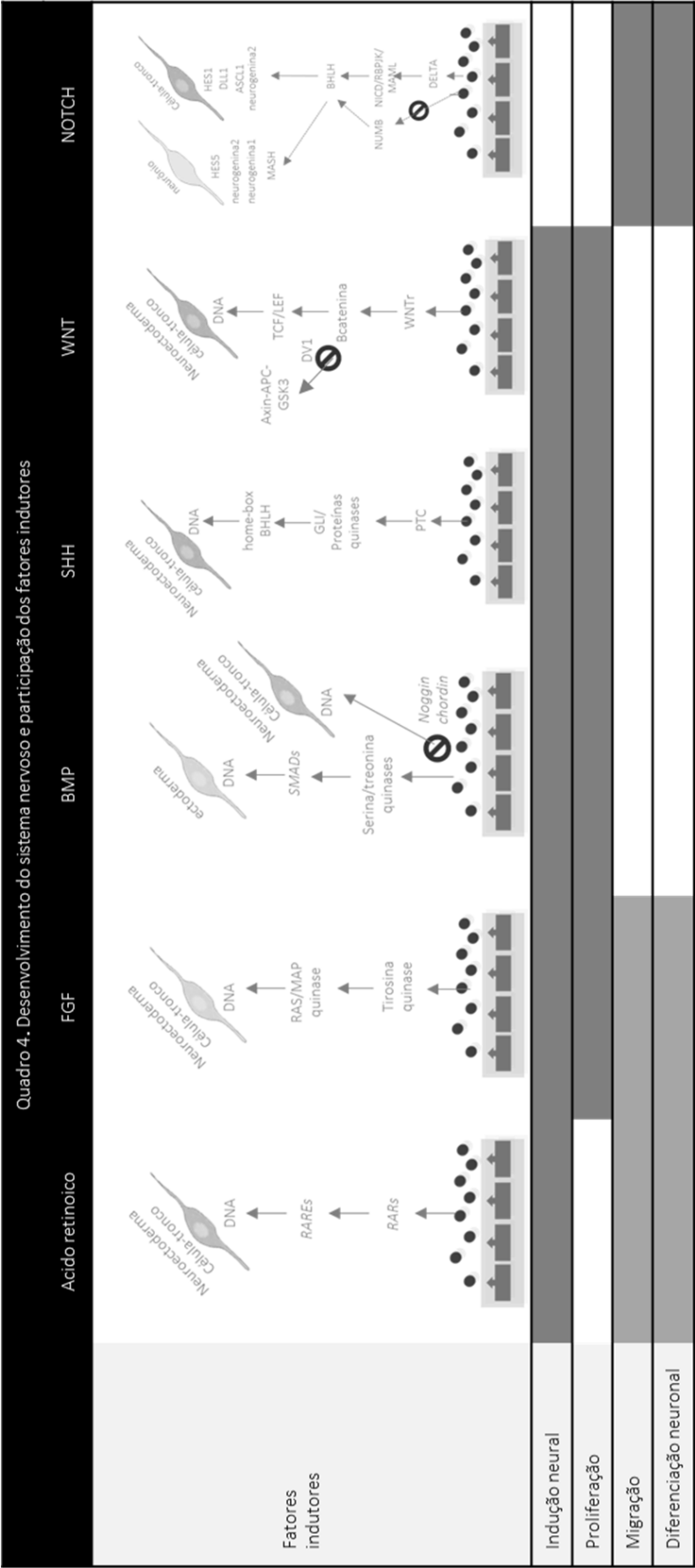


FIGURA 12. Desenvolvimento do sistema nervoso e participação dos fatores indutores (preto, participação direta; cinza, participação indireta). Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

1.2.3 A FORMAÇÃO DO CÓRTEX CEREBRAL

Estudos comparativos demonstram que existem diferenças no tamanho, forma, citoarquitetura, fenótipo e função do córtex cerebral das diferentes espécies animais. Estas mudanças não são unicamente morfológicas ou funcionais, mas também são propriedades que se presume serem relevantes para a inteligência.

A estruturação do córtex cerebral envolve o funcionamento dos processos de proliferação, migração e diferenciação no desenvolvimento do sistema nervoso.

A expressão de dois fatores de transcrição, PAX6 e EMX2 regula a formação do córtex. Estes fatores são expressos em gradientes complementares anteroposteriores na zona ventricular dirigindo a formação das áreas corticais.

Os neurônios imaturos ou neuroblastos seguem diferentes programas de migração até chegar a seu destino no córtex. A transposição dos modos de migração durante o desenvolvimento cortical é única nos mamíferos e se sugere como uma determinante na evolução do córtex.

Por último, neurônios corticais originam-se de duas fontes; neurônios excitatórios a partir da zona ventricular y subventricular cortical e interneurônios a partir da eminência ganglionar medial

1.2.3 A formação do córtex cerebral

Estudos comparativos demonstram que existem diferenças no tamanho, forma, citoarquitetura, fenótipo e função do córtex cerebral das diferentes espécies animais (DE LAHUNTA *et* GLASS, 2009; BORREL *et* CALEGARI, 2014; MONTIEL *et al.*, 2015; OHTAKA-MARUYAMA *et* OKADO, 2015).

Animais com cérebros complexos e com giros como primatas e carnívoros, usam uma porção relativamente pequena do seu córtex cerebral para o processamento de funções primárias e uma porção maior para funções cerebrais complexas. Em contraste, espécies com cérebros pequenos e mais simples, como roedores e marsupiais, usam a maioria do seu córtex para o processamento de funções primárias (BORREL *et* CALEGARI, 2014; MONTIEL *et al.*, 2015) (Figura 13).



FIGURA 13. Os tipos de cérebros nas espécies animais. (a,b) Répteis e aves apresentam cérebros pequenos e simples, (c,d) mamíferos apresentam cérebros maiores e complexos. *Artwork by* Lina Maria Delgado-Garcia.

Estas mudanças não são unicamente morfológicas ou funcionais, mas também são propriedades que se presume são relevantes para a inteligência; em especial o número de neurônios corticais e a velocidade de condução, fundamentais na capacidade de processamento das informações (ROTH ET DICKE, 2005)

Os tipos de córtex cerebral

O córtex cerebral está constituído por dois tipos de estruturas chamadas dependendo da sua origem filogenética, a mais antiga ou allocórtex, formado do arquicórtex e o paleocórtex, e a mais nova ou neocórtex.

O arquicórtex corresponde ao hipocampo enquanto que o paleocórtex ao sistema olfatório, este último composto dos bulbos olfatórios, os pedúnculos e o lobo piriforme do bulbo, que em conjunto formam o córtex olfatório. Finalmente, o neocórtex é a área mais recente e corresponde à maior parte do córtex cerebral nos mamíferos (DE LAHUNTA et GLASS, 2009).

Enquanto a SVZ adulta é vista como uma continuação da zona ventricular embrionária do telencéfalo do neocórtex, a SGZ do hipocampo se origina de células na zona ventricular do arquicórtex que migram até a fissura do hipocampo e se convertem na matriz secundária e terciária (URBAN ET GUILLEMONT, 2014).

Assim, com algumas diferenças ligadas à origem filogenética das espécies, cada estrutura apresenta um padrão laminar. Este padrão se desenvolve em três estágios principais, pré-placa, placa cortical, e finalmente, padrão laminar maduro. A conformação laminar implica que células que deixam de realizar o ciclo celular em estágios progressivamente posteriores migram distâncias mais longas, ultrapassando os neurônios nascidos anteriormente, até se estabelecerem em camadas mais superficiais para se diferenciar (KANDEL *et al.*, 2014).

Como resultado, a estruturação do córtex cerebral envolve o funcionamento dos processos de proliferação, migração e diferenciação no desenvolvimento do sistema nervoso (Figura 14).



FIGURA 14. Sinopses dos eventos na formação do neocórtex. Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

Proliferação e formação das regiões no neocórtex

Como mencionado, o córtex é a área mais recente e a mais extensa nos mamíferos. Vias encefálicas e regiões do córtex são estabelecidas por meio de programas genéticos durante o início do desenvolvimento, mas dependem posteriormente de sinais aferentes para o desenvolvimento e integração das funções anatômicas, fisiológicas e comportamentais especializadas.

No caso da formação do neocórtex, a estruturação de regiões específicas é produto da expressão de dois fatores de transcrição, PAX₆ e EMX₂. Os fatores são expressos em gradientes complementares anteroposteriores na zona ventricular dirigindo a formação das áreas. Os gradientes de PAX₆ e EMX₂ são estabelecidos pelo seu antagonismo e pela presença de FGF que promove PAX₆ nas áreas rostrais e reprime EMX₂. Sem EMX₂ há expansão do neocórtex rostral, as áreas motoras e somatosensoriais, sem PAX₆, há expansão das áreas auditivas e visuais (KANDEL *et al.*, 2014) (Figura 15).

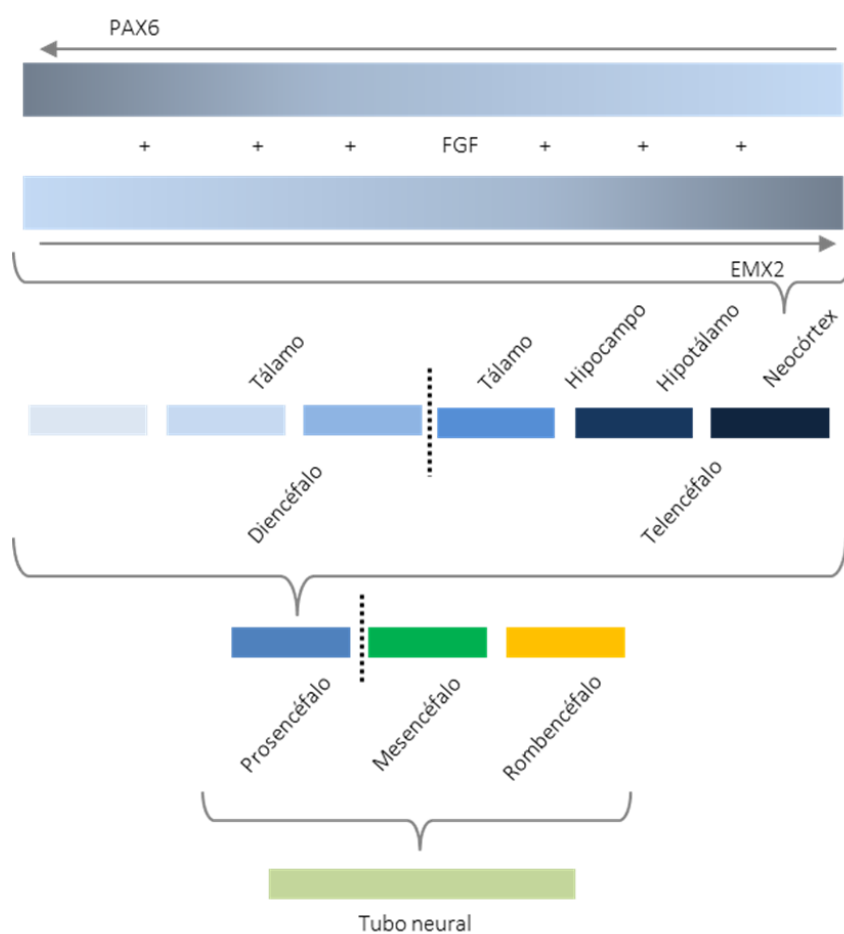


FIGURA 15. Fatores de transcrição no desenvolvimento do córtex. O prosencéfalo é inicialmente dividido ao longo de seu eixo em domínios organizadores denominados prosomeros. Os prosomeros um a três desenvolvem o diencéfalo, os prosomeros quatro a seis originam o diencéfalo e o telencéfalo. Dois fatores de transcrição PAX6 e EMX2 estabelecem vias encefálicas e regiões do neocórtex. Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia.

A migração e diferenciação dos neurônios

Os neurônios imaturos ou neuroblastos seguem diferentes programas de migração até chegar a seu destino no córtex. A transposição dos modos de migração durante o desenvolvimento cortical é única nos mamíferos e se sugere como uma determinante na evolução do córtex (OHTAKA-MARUYAMA *et al.*, 2015).

Os neurônios que usam a migração tangencial ou migração multipolar, apresentam movimentos direcionais arbitrários que seguem vias precisas do deslocamento e do estabelecimento. Isso pode ser facilmente observado no telencéfalo ventral o qual contém dois sítios principais de produção neuronal, as eminências ganglionar lateral e medial (KANDEL *et al.*, 2014; OHTAKA-MARUYAMA *et al.*, 2015). Os neurônios gerados nessa região são destinados a ocupar os núcleos da base do tálamo, o tálamo, o córtex cerebral, o hipocampo e o bulbo olfatório como interneurônios gabaérgicos (KANDEL *et al.*, 2014). Estudos demonstram que a migração tangencial se produz pela sinalização de fatores repulsivos, criando zonas de exclusão e canalização específicas. Entre estas moléculas se mencionam as semaforinas (SEMA_{3A} e SEMA_{3F}) e seus receptores NRP (NRP₁ e NRP₂) e plexina (HERNANDEZ-MIRANDA *ET AL.*, 2010; HERNANDEZ-MIRANDA *ET AL.*, 2011).

A migração radial ou locomoção unidirecional é usada pelos neurônios imaturos gerados na zona ventricular e subventricular. As NSCs e progenitores produzem neurônios imaturos ou neuroblastos que migram ao longo das fibras da glia radial antes de se estabelecerem na placa cortical como neurônios glutamatérgicos principalmente (KANDEL *et al.*, 2014; OHTAKA-MARUYAMA *et al.*, 2015). Em contraste, neurônios gerados na eminência ganglionar lateral migram em direção rostral e fornecem os interneurônios gabaérgicos granulares e periglomerulares do bulbo olfatório (KANDEL *et al.*, 2014).

Por tanto, neurônios corticais originam-se de duas fontes; neurônios excitatórios a partir da zona ventricular y subventricular cortical e interneurônios a partir da eminência ganglionar medial (KANDEL *et al.*, 2014).

Estes neurônios adquirem seu fenótipo pela expressão de fatores de transcrição. O aminoácido l-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, e o GABA é o principal inibitório. Ambos tipos de neurônios dependem dos fatores BHLH, os neurônios piramidais glutamatérgicos dependem dos fatores BHLH neurogenina₁, neurogenina₂ e MATH para sua diferenciação final, por sua parte, os neurônios inibitórios dependem de fatores como PTF_{1A} (KANDEL *et al.*, 2014; OHTAKA-MARUYAMA *et al.*, 2015).

A formação dos neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos é regulada pela sinalização WNT (TANG *et al.*, 2010). Células nos domínios prosencéfalo e mesencéfalo expressam OTX₂, enquanto células no domínio rombencéfalo expressam GBX₂. O ponto de transição entre as expressões de OTX₂ e GBX₂ está localizado na borda entre o mesencéfalo e o rombencéfalo (organizador ístmico) (TANG *et al.*, 2010; KANDEL *et al.*, 2014). Nessa borda, fatores de transcrição são expressos, em especial o Em₁. Esses fatores de transcrição, por sua vez, controlam a expressão de dois fatores sinalizadores, WNT₁ e FGF₈. WNT₁ está envolvida na proliferação celular no domínio mesencéfalo-rombencéfalo e na manutenção da expressão de FGF₈. A difusão de FGF₈ do organizador ístmico para o domínio mesencéfalo, marcado pela expressão de OTX₂, induz a diferenciação de neurônios dopaminérgicos, enquanto sua difusão para o domínio rombencéfalo, marcado pela expressão de GBX₂, dispara a diferenciação de neurônios serotoninérgicos (TANG *et al.*, 2010; KANDEL *et al.*, 2014). A expressão dos fatores nos neurônios produz a liberação dos neurotransmissores e o seu amadurecimento. Os neurônios amadurecem pelo crescimento de seus dendritos e iniciam a sinaptogênese para completar os circuitos neuronais (KANDEL *et al.*, 2014; OHTAKA-MARUYAMA *et al.*, 2015).

1.3 OBJETIVOS

1.3 OBJETIVO

Objetivo geral

Estudar as teorias do funcionamento dos nichos neurogênicos do sistema nervoso pós-natal de mamíferos adultos, a partir da biologia das NSCs e dos progenitores neurais - conjuntamente chamados de precursores neurais (NPCs), com ênfase na proliferação, migração e diferenciação, visando sua futura manipulação para fins terapêuticos.

Objetivos específicos

- Descrever as características dos nichos neurogênicos, a neurogênese adulta e as NSC do sistema nervoso pós-natal de mamíferos adultos.
- Descrever a morfologia e fenótipo da proliferação, migração e diferenciação *in vitro* das culturas primárias dos NPCs derivados dos nichos neurogênicos do encéfalo de camundongos.

CAPÍTULO II

2. ADULT BRAIN NEUROGENESIS, NEURAL STEM CELLS AND NEUROGENIC NICHES

2. ADULT BRAIN NEUROGENESIS, NEURAL STEM CELLS AND NEUROGENIC NICHES

No contexto da biologia do desenvolvimento, os estudos comparativos entre diferentes espécies tem proposto três tipos de regiões neurogênicas. Regiões que são constantes entre as diferentes espécies e que exibem neurogênese completa; regiões relativamente constantes entre diferentes espécies e que exibem diferentes graus de neurogênese; e as regiões que apresentam da neurogênese dependendo da espécie.

A neurogênese no cérebro adulto implica o controle coordenado da proliferação, migração e diferenciação das células-tronco neurais (NSCs) nos nichos neurogênicos para a produção de neurônios.

A atividade das NSCs é controlada pela combinação de uma ampla variedade de mecanismos intrínsecos como os inibidores do ciclo celular e extrínsecos como os fatores indutores. Os inibidores do ciclo celular (CKIs) são proteínas que inibem quinases, regulando o ciclo celular. Assim, a eliminação das proteínas CKIp57 permite a progressão do ciclo e a neurogênese.

Múltiplas vias de sinalização e fatores indutores regulam a atividade das NSCs durante o desenvolvimento embrionário e depois a sua manutenção nos nichos neurogênicos adultos. A ativação de NOTCH e WNT leva à manutenção da população de células-tronco neurais e neurogênese, ao passo que sua inativação induz a rápida diferenciação neuronal e a diminuição das NSCs. A sinalização das BMPs e SHH pode agir de maneiras opostas, a sinalização das BMPs inibe a diferenciação neuronal e promove gliogênese, enquanto a sinalização SHH aumenta a neurogênese e o número de NSCs.

Atualmente são descritos como nichos neurogênicos às regiões do sistema nervoso adulto com neurogênese completa ao longo da vida, possível pela presença das NSCs e um microambiente celular apropriado. Nos mamíferos existem pelo menos dois nichos, a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (SGZ) do giro denteado do hipocampo. Os neuroblastos da SVZ migram até o bulbo olfatório, onde se diferenciam em neurônios granulares e glomerulares. Os neuroblastos da SGZ alcançam a camada granular tornando-se neurônios granulares. Assim, os neuroblastos da SVZ e a SGZ são integrados em circuitos neurais preexistentes para a remodelação e manutenção de regiões com funções superiores do cérebro.

Trabalho submetido na revista “*International Journal of Stem Cell Research*”¹⁵
em 02/02/ 2016

Adult brain neurogenesis, neural stem cells and neurogenic niches

Lina Maria Delgado-Garcia; Rogerio Martins Amorim.

Department of Veterinary Clinics, College of Veterinary Medicine and Animal Science,
São Paulo State University, UNESP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa street,
Botucatu, SP, Brazil

*Corresponding author: Lina Maria Delgado Garcia, lina@fmvz.unesp.br

Abstract

During the late 60's, the experiments with brain lesions in rats, suggested the possibility of neurogenesis in the adult brain. Three decades later, the conceptual link between adult neurogenesis and stem cells was proposed. We now know that the adult mammalian brain may have the ability to regenerate through adult neural stem cells (NSCs). Here are briefly reviewed classical and current theories in adult neurogenesis, NSCs and neurogenic niches. Experiments in developmental biology have shown different neurogenic regions according to the capacity of neurogenesis and its presence in different species. Advances in the methodology such as optogenetics and gene reprogramming, allowing the manipulation of different conditions, will guide the discovery of new signaling pathways and interactions, to better understand some aspects recently discussed such as the variation of cell cycle length and the influence of disease conditions, cell heterogeneity and DNA changes. New discoveries in adult neurogenesis, NSCs and neurogenic niches and the developing of new technological tools should guide the NSCs-based therapy, such as gene reprogramming and the insertion of transposable elements (TEs) controlling flanking genes, causing a functional impact for different conditions.

¹⁵ Guideline disponíveis em http://clinmedjournals.org/author_guidelines.php

Keywords: cell cycle, neuroblasts, neurogenesis, signaling pathways, subgranular zone, subventricular zone.

Introduction

The cortex of lizards is a useful model to study and understand adult neurogenesis and regeneration mechanisms. Comparative studies in different species showed that lizards had an increase of the brain size with age, due to the proliferation of zinc-positive synapses and dendritic growth in the telencephalon [1,2]. In another set of experiments, induced neuronal degeneration triggered reactive neurogenesis and complete functional regeneration programs. In these experiments, the chemical lesion of the medial cortex produced the proliferation of the cells of the ependymal region and the subsequent migration and differentiation of neuroblasts up to the cortex for the complete regeneration of the zone. The neuroblasts progressively replaced dead neurons and new medial cortex was indistinguishable from a normal one [1,3,4].

Nevertheless, to accomplish the same feat on mammals, seemed an intricate issue. Progress in this matter had its starting point during the late 60's, when the experiments with brain lesions in rats, suggested the possibility of neurogenesis in the adult brain [5]. Three decades later, the conceptual link between adult neurogenesis and stem cells was proposed [6]. We now know that the adult mammalian brain may have the ability to regenerate through adult neural stem cells (NSCs). Here are briefly reviewed classical and current theories in adult neurogenesis, NSCs and neurogenic niches. Finally, are described NSCs-based therapies for spinal cord injury (SCI) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) disease.

Discovering adult brain neurogenesis

During the past 19th century to early 20th, neurogenesis was restricted to the early stages of embryonic development. The central evidence was the lack of neurons with mitotic activity after birth in the mammalian brain [7-9]. Later Altman proposed that the neuroblasts might arise from non-differentiated precursor cells, thus, neural precursor cells generate newborn cells that differentiate and add new neurons to the existing population in the adult mammalian brain. This was proposed after the experiments in rats reviewed between 1962 and 1977. In autoradiographic studies, he showed that the chemical lesion in the brain of the rat resulted in the proliferation of newborn cells

population of glia and some neuroblasts that were labeled with (H^3) thymidine, a cellular marker of proliferation [5,10-14].

After this publication, many experiments tried to find these results but reproducibility of the (H^3) thymidine experiments was not possible and the hypothesis of newborn neurons in the adult mammalian brain was controversial. First experiments with (H^3) thymidine in non-human primates described a slow glial cell proliferation but failed to confirm adult neurogenesis [15,16]. Absence of adult neurogenesis in humans was supported by the idea that the brain of primates may be uniquely specialized in lacking the capacity for neuronal production in the adult stage. Prolonged period of interaction with the environment would require a stable set of neurons to retain acquired experiences in their synaptic connectivity [16].

Experiments carried out for the study of the brain events that control learning in canaries found opposite conclusions. Nottebohm and collaborators used canaries as a model because of their ability of altering their songs; the process that he described was analogous to the acquisition of language in humans [17-19]. Descriptive studies of the brain of canaries showed a correlation between the complexity of the song and the size of specific forebrain regions controlling the songs, arguing that learned information required space for neurogenesis. Final acceptance of adult neurogenesis in mammals came after the evidence in late 90's of neuroblasts in the human brain. The experiments used postmortem tissue from the hippocampus of cancer patients who received bromodeoxyuridine (BrdU) marker, a thymidine analog that is incorporated into the DNA of dividing cells and can be detected immunohistochemically in the progeny. Tissue of all patients showed that the SGZ of the hippocampus contained BrdU positive nuclei cells with the typical morphology of granule cell neurons. The study concluded that human hippocampus retains the ability to generate new neurons throughout life [20].

Now it seems clear that neurogenesis in the adult brain implies the coordinate control of proliferation, migration and differentiation of NSCs in the neurogenic niches for the production of neurons and play an essential physiological role in memory and learning tasks, and neurodegenerative diseases, in conjunction with the beneficial effects of exercise and environmental enrichment in the neurogenic niches.

Through studies in animal models of neurodegenerative diseases such as Alzheimer, impaired neurogenesis and age-related cognitive decline on hippocampus were found. Behavioral experiments showed that aging was associated with structural alterations and functional deficits on hippocampus [21]. Also, physical activity may induce adult

hippocampal neurogenesis in aged mice [22,23] and the exposure to enriched environment induced plasticity of neuronal cells and neurogenesis [21,23-25].

Finally, new perspectives in normal health conditions and disease and the limits of adult neurogenesis in mammal species are now evaluated in the context of the comparative studies. Among rodents, non-human primates and carnivores it is observed an overall exponential decline in the quantity and function of neurogenesis and neurogenic niches; in species with longer life expectancies such as non-human primates and carnivores, neurogenesis and neurogenic niches were less abundant [2,26]. Thus, three groups of neurogenic regions with distinctive neurogenesis functions are proposed. Those regions that are constant between the different species and that display complete neurogenesis such as the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ); those regions relatively constant in different species and with different degrees of neurogenesis depending on the species such as the striatum and cortex; and those regions with the presence of neurogenesis depending on the species such as the cerebellum in rodents. Differences between regions and animal species correspond to different degrees and types of plasticity adapted to different tissue environments and functional demands [27-28].

Adult neural stem cells (NSCs) activity

Neurogenesis in the adult brain implies the coordinate control of proliferation, migration and differentiation of NSCs in the neurogenic niches for the production of neurons. NSCs activity and multipotency are controlled by the combination of a wide variety of intrinsic and extrinsic mechanisms in the neurogenic niche, such as cell cycle regulators and signaling pathways.

Cell cycle inhibitors (CKIs) are proteins that inhibit cyclin-dependent kinases, regulating the G1 stage of the cell cycle [29]. Experiments with the selected deletion of CKIs proteins in normal and disease conditions showed that CKIp21 and CKIp27 proteins are expressed in rapid neural progenitor cells whereas CKIp57 proteins in radial glial cells and NSCs [30,31]. Thus, deletion of CKIp57 proteins allowed cell cycle progression and neurogenesis, not only in young adult mice but also in aged mice [31]. *In vivo* experiments with the selective labeling of NSCs in mice embryos also showed that, these CKIp57 NSCs were slowly dividing populations of neural progenitor cells in the embryonic ganglionic eminence, that later became adult quiescent NSCs [32]. The studies conclude that adult quiescent NSCs slowed their cell cycle, and were set aside as a reserve pool early in brain development, when other NPCs were dividing rapidly to build the brain [31-33].

A wide variety of signaling pathways regulate NSCs activity during embryonic development and later their maintenance in the adult neurogenic niches [34-37]. NOTCH signaling pathway induces maintenance and differentiation of NSCs. Upon activation of NOTCH by its receptor DELTA, the NOTCH intracellular domain (NICD) is transferred to the nucleus where it forms a complex with the DNA binding protein RBPJK and the coactivator Mastermind-like (MAML) [38-39]. During embryonic development, inactivation of RBPJK leads to a decrease in cell proliferation because dividing NSCs prematurely differentiate into neuroblasts. In contrast, in neurogenic niches, inactivation of RBPJK leads to an increase in cell proliferation because slowly dividing or adult quiescent NSCs become rapidly transit-amplifying progenitor cells [38]. Thus, the NICD-RBPJK-MAML complex induces the expression of BHLH transcriptional repressors, such as HES1, HES5 and HES3. These HES factors bind to specific DNA elements repressing the expression of target proneuronal genes such as ASCL1/MASH1 and NEUROGENIN2, which activate the transmembrane protein NOTCH in neighboring cells inhibiting neuronal differentiation [38-41]. Inhibition of neighboring cells is called lateral inhibition, a cell interaction process that prevents simultaneous differentiation, thereby achieving its prolonged maintenance [38].

Recently it was discovered that the expression of BHLH transcriptional repressors have an oscillating activity in BHLH factors. These results were obtained by optogenetic approach experiments, which induced gene expression by blue light illumination control [41]. Sustained light illumination induced ASCL1 expression that promoted neuronal fate determination and inhibits its cell-cycle progression, whereas oscillatory light illumination induced ASCL1 oscillatory expression that maintains proliferating neural progenitor cells. Thus, the multipotent state correlates with oscillatory expression of several fate determination factors, whereas the differentiated state correlates with sustained expression of a single factor [38,39,41]. Taken together, these results indicate that the BHLH transcriptional repressor HES regulates the expression of the proneural factor ASCL1 in an oscillatory versus sustained activity, which in turn regulates the proliferation of NSCs and the subsequent processes of neuronal fate determination. Additionally, because of its influence in proliferation and fate determination and differentiation, ASCL1 is also a central component of direct reprogramming of mouse and human fibroblasts to induced neural stem cells, a promising approach for human disease modeling and regenerative medicine [39].

WNT signaling increase neurogenesis, by contrast, its blockage reduces neurogenesis *in vitro* and abolishes almost completely *in vivo* [42]. The molecular mechanism of canonical WNT signaling pathway causes accumulation of β -catenin in the cytoplasm and its translocation into the nucleus to activate transcription factors to the T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF) family. In addition, WNT pathway may be involved in the activation of NEUROD1 transcriptional factor. This protein is a member of BHLH transcriptional factors, which activate the NEUROD gene; NEUROD1 has overlapping DNA-binding site for SOX2 and TCF/LEF, thus, the activation of this gene implies activation of the canonical WNT pathway and removal of SOX2 repression. This signaling pathway was demonstrated in experiments in mice where WNT signaling expression, together with the removal of SOX2, triggered the expression of NEUROD1 [43]. In addition, WNT signaling directly induce proneuronal genes such as NEUROG2 and PROX1 in intermediate progenitors [37,44].

Sonic hedgehog (SHH) and Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) signaling act antagonistically through the modulation of EGF [45]. NSCs increase proliferation in response to higher than normal endogenous SHH levels. BMPs are part of the Transforming growth TGF families of proteins, during embryonic development, if ectodermal cells are exposed to BMPs, they assume an epidermal fate [36]. In the neurogenic niches, loss of BMPs signaling leads to an over proliferation of NSCs that ultimately depletes the population [37,46]. Activation of EGFR by EGF leads to the phosphorylation of SMAD1 in the linker region, silencing BMP signaling, whereas the EGFR activates SHH [46]. On the whole, activation of NOTCH and WNT signaling leads to maintenance of the neural stem cell population and neurogenesis, whereas inactivation of NOTCH induces rapid neuronal differentiation and depletes the NSCs population. In contrast, BMPs and SHH may act in opposite manners, BMP signaling inhibits neuronal differentiation and promotes gliogenesis, whereas endogenous SHH signaling enhances neurogenesis and the number of NSCs.

In addition to the mechanisms described above, epigenetic mechanisms such as DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs also influence NSCs activity [47]. Lately there is a discussion on epigenetic mechanisms related to the heterogeneity and the individual neuronal diversification in the brain, called transposable elements (TEs) [48]. There are two major classes of TEs, distinguished by their mechanism of transposition, DNA transposons, which move via cut-and-paste mechanism and are generally thought to be extinct in higher eukaryotes and RNA transposons or

retrotransposons, which move via a copy-and-paste mechanism using RNA [50]. Barbara McClintock, who discovered the TEs, and with these studies she won the Nobel Prize in Physiology and Medicine (1983) described two main functions, as insertional mutagens and as controlling elements that regulate the expression of nearby genes [49,50]. Retrotransposition-mediated events are not only confined to germ cells, but can produce somatic alterations in the brain and cancer; furthermore, it is not known whether transposon expression is a cause or a consequence of aging or of neurodegenerative disease [49]. Thus, almost half of mammalian genomes are comprised of retrotransposons, namely, Long-Interspersed Elements (LINE1s), which are the only known active and autonomous elements in the genome with the ability to mobilize and change locations in the genome [50]. *In vitro* experiments with adult rat NSCs showed that LINE-1 retrotransposed in neuronal precursors derived from the hippocampus. The resulting retrotransposition event altered the expression of neuronal genes, which, in turn, may influence neuronal cell fate [48].

Neurogenic niche microenvironment

As mentioned, neurogenic niches such as the SVZ and the SGZ are brain regions with complete neurogenesis throughout life, possible because of presence of NSCs and an appropriate cellular microenvironment to stimulate self-renewal and multipotency (FIGURE 1) [27,28,51].

The SVZ is the layer along the lateral ventricle. There are three main cell types in the SVZ neurogenic niche: neuroblasts (Type A cells), NSC-SVZ astrocytes (Type B cells) and rapidly dividing transit amplifying immature progenitors (Type C cells). Type B and C cells are precursor cells. Type B cells are the primary precursors or NSCs that divide to give rise to Type C cells or rapidly dividing transit amplifying cells or proliferating progenitors, which in turn generate migratory Type A cells or neuroblasts [52-57]. Neuroblasts of the SVZ join the network in the rostral migratory stream (RMS) to reach the olfactory bulb, where differentiate into granular and glomerular neurons [52-57]. In the olfactory bulb, primary sensory neurons project to glomeruli where they synapse onto mitral and tufted cells, which in turn relay information to the olfactory cortex, periglomerular neurons provide lateral inhibition between individual glomeruli, whereas granule cells provide lateral inhibition between mitral and tufted cells [47].

The SGZ is a germinal layer between the dentate gyrus and the hilus in the hippocampus. NSCs generate D1 cells, which divide to generate D2 cells or neuroblasts. D2 cells reach

the granule layer becoming D3 cells, which mature into new granule neurons [57-59]. Granule neurons synapses onto hilar basket interneurons, each of which inhibit mature dentate granule cells. Granule cells also synapse onto hilar mossy cells, which also innervate many mature dentate granule cells on the contralateral dentate gyrus [47].

NSCs cellular microenvironment includes, a basal lamina for cell anchoring, extracellular matrix, which modulates the adhesiveness and activity of signaling molecules, vasculature structures and a single layer of ependymal cells to support and capture proteins secreted by the choroid plexus into the cerebrospinal fluid [52-59]. Tenascin-C, collagen-1, heparin sulfate proteoglycans, chondroitin sulfate proteoglycans and integrins are part of basal lamina and extracellular matrix [35]. Signaling molecules modulate gene expression acting at different stages of the stem cell lineage. Different *in vivo* and *in vitro* experiments, primarily involving extirpation or transplantation of different portions of immature and mature nervous system recognized that neurogenesis depends on the signals of growth factors such as EGF, FGF, IGF1, TGF, VEGF and LIF to regulate cell cycle and differentiation [51-62]. EGF can support *in vitro* proliferation of immature glial and neuronal progenitors from the adult mouse SVZ [60]. FGF-2 is effective to support the survival and proliferation of embryonic and adult rat SGZ progenitors *in vitro* and has been identified *in vivo* [51]. *In vivo* and *in vitro* experiments showed LIF stimulates neuronal differentiation from explants of the spinal cord primordium cells and dissociated culture [61]. Thus, SVZ and SGZ neuroblasts are integrated into preexisting neural circuits for remodeling and play an important role in higher brain functions such as cognitive activities.

Conclusions and prospects for brain repair in spinal cord injury and amyotrophic lateral sclerosis

Neurogenesis in the adult brain, NSCs and neurogenic niches are issues discussed in several articles under different points of view. Since the discovery of adult neurogenesis and NSCs in mammals, experiments in developmental biology have showed different neurogenic regions according to the capacity of neurogenesis and its presence in different species. Now, it seems important to identify the population in these regions and the characteristics of its microenvironment. Other important points are the aspects of the intrinsic and extrinsic regulation of NSCs activity and the function of neurogenic niches in normal health conditions and disease. Advances in methodologies such as optogenetics and gene reprogramming, allow the manipulation of different conditions and will guide

the discovery of new signaling pathways and interactions, to better understand some aspects recently discussed such as the variation of cell cycle length and the influence of disease conditions, cell heterogeneity and DNA changes.

New discoveries in adult neurogenesis, NSCs and neurogenic niches and the developing of new technological tools should guide NSCs-based therapy, such as gene reprogramming and the insertion of transposable elements (TEs) controlling flanking genes, causing a functional impact for different conditions.

Spinal cord injury (SCI) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are two devastating motor and sensory central nervous system conditions with poor regenerative potential. SCI results in motor and sensory deficits secondary to disrupted neuronal circuits and their remyelination a challenging topic. NSCs-based therapies for SCI aim to stimulate resident NSCs or generate neuroblasts and also give neuroprotection, acting by reducing endogenous toxic substances, inhibiting inflammatory reactions and/or releasing growth factors and neurotrophic substances [63-64]. Clinical trials in large animal models such as dogs showed that NSCs transplantation is feasible and has therapeutic potential, producing functional improvement by long-term neurotrophic and neuroprotective effects in the neurogenic niche [65]. Clone 01 of human fetal NSCs derived from fetal spinal cord differentiated toward motor neuronal, astroglial and oligodendroglial phenotypes in the injured spinal cord and promoted functional recovery in the rat. In early and later stages, significant improvement in motor and sensory tests were mediated by the increased expression of neurotrophic factors, reduction of neurite growth-inhibitory substances, enhancement of the remyelination of the axons and the production of extracellular matrix permissive to regeneration [63].

ALS is a devastating neurodegenerative disorder in which the loss of upper and lower motor neurons produces progressive weakness and eventually death [66-68]. ALS is an inherited neurodegenerative disease mainly identified by SOD1 gene mutation, which produces progressive loss of motor function. In SOD1 transgenic models, application of NSCs grafts at multiple levels of spinal cord showed improvement of motor function, due to these results it was recently established the first phase I human-clinical trial. Results of the phase I showed that cervical transplantation of NSCs in the lumbar spinal cords of 12 ALS patients is feasible and well-tolerated, additional results showed that some cells differentiated into neurons, while others maintained their stem cells phenotype [68,69]. The fact that NSCs produce new elements that can integrate within some regions of the mature brain, replacing lost neurons in pre-existent neural circuits, appears extremely

fascinating in the perspective of regenerative therapeutic approaches. For the near future manipulation of NSCs after SCI and ALS for replacing lost elements seem very hard to be realized, neuroblasts themselves may not be useful to directly repair the brain, but the use of the intrinsic and extrinsic factors of their microenvironment to give neuroprotection seems a more handy approach.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LMDG and RMA prepared manuscript. All authors read and approved the final manuscript. *Corresponding author: LMDG

References

1. Lopez-Garcia C, Molowny A, Nacher J, Ponsoda X, Sancho-Bielsa F, Alonso-Llosa G.. The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration. *An Acad Bras Cienc.* 2002;74(1):85-104.
2. Grandel H, Brand M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev Genes Evol.* 2013;223(1-2):131-47.
3. Font E, García-Verdugo JM, Alcántara S, López-García C. Neuron regeneration reverses 3-acetylpyridine-induced cell loss in the cerebral cortex of adult lizards. *Brain Res.* 1991;551(1-2):230-5.
4. Molowny A, Nacher J, Lopez-Garcia C. Reactive neurogenesis during regeneration of the lesioned medial cerebral cortex of lizards. *Neuroscience.* 1995;68(3):823-36.
5. Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* 1962;135:1127-28.
6. Gage FH, Ray L, Fisher L. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 1995a; (18):159-92.
7. Ramon y Cajal, S. La fine structure des centres nerveux. *Prox Roy Soc Lond B.* 1894;55:444-68.
8. Ramon y Cajal, S. Leyes de la morfología y dinamismo de las células nerviosas. *Rev Trim Micrografica.* 1897;2:1-12.
9. Ramon y Cajal, S. Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados. Moya;Madrid. p. xx-xx, 1899
10. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124:319-35.
11. Altman J, Das Gd. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *Journal of Comparative Neurology.* 1966;126(3):337-389.
12. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference

- to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 1969a; 137:433-57.
13. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol*. 1969b;136:269-293.
 14. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the Adult Rat: Electron Microscopic Analysis of Light Radioautographs. *Science*. 1977; 197:1092-94.
 15. Rakic P. DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. *Ann N Y Acad Sci*. 1985a;457:193-211.
 16. Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science*. 1985b;227(4690):1054-56.
 17. Burd GD, Nottebohm F. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol*. 1985; 240(2):143-52.
 18. Nottebohm F. Neuronal replacement in adulthood. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;457:143-61.
 19. Paton JA, O'Loughlin BE, Nottebohm F. Cells Born in Adult Canary Forebrain are Local Interneurons *J Neurosci*. 1985;5(11):3088-93.
 20. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313-7.
 21. Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*. 2006;139(4):1173-85.
 22. Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging*. 2006;27(10):1505-13.
 23. Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci*. 2010;33(12):569-79.
 24. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996;16(6):2027-33.
 25. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. *J Neurosci*. 1998;18(9):3206-12.
 26. Amrein I, Isler K, Lipp HP. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci*. 2011;34(6):978-87.
 27. Bonfanti L, Peretto P. Adult neurogenesis in mammals--a theme with many variations. *Eur J Neurosci*. 2011;34(6):930-50.
 28. Bonfanti L. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals. *Front Neurosci*. 2016;10:44. doi: 10.3389/fnins.2016.00044.
 29. Mu Y, Lee SW, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2010; 20(4): 416-423.
 30. Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev*. 2005;19(6):756-67.
 31. Furutachi S, Matsumoto A, Nakayama K.I, Gotoh Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J*. 2013, 32(7):970-81

32. Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL, Alvarez-Buylla A. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1644-55.
33. Furutachi S, Miya H, Watanabe T, Kawai H, Yamasaki N, Harada Y, Imayoshi I, Nelson M, Nakayama KI, Hirabayashi Y, Gotoh Y. Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2015;18(5):657-65.
34. Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA. LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*. 2005;132:5503–14.
35. Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, Falciglia G, Gobeske KT, Czeisler C, Kessler JA. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2008; 28(37):9194-04.
36. Sun Y, Hu J, Zhou L, Pollard SM, Smith A. Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells. *J Cell Sci*. 2011;124(11):1867-77.
37. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:396.
38. Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci*. 2010;30(9):3489–98.
39. Imayoshi I, Shimojo H, Sakamoto M, Ohtsuka T, Kageyama R. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(12):2045-57
40. Shimojo H, Ohtsuka T, Kageyama R. Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Front Neurosci*. 2011;5:78. doi: 10.3389/fnins.2011.00078.
41. Kageyama R, Shimojo H, Imayoshi I. Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development. *Cell Tissue Res*. 2015 Jan;359(1):125-33.
42. Varela-Nallar L, Inestrosa NC. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:100. doi: 10.3389/fncel.2013.00100.
43. Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*. 2009;12(9):1097-105.
44. Duncan RN, Panahi S, Piotrowski T, Dorsky RI. Identification of Wnt Genes Expressed in Neural Progenitor Zones during Zebrafish Brain Development. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145810. doi: 10.1371/journal.pone.0145810.
45. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz I, Altaba A. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. 2005;132:335–344.
46. Palma V, Ruiz I, Altaba A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*. 2004; 131(2):337-45.
47. Ming GL, Song H: Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; 70(4):687–702
48. Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition *Nature*. 2005;435(7044):903-10.

- 49 Reilly MT, Faulkner GJ, Dubnau J, Ponomarev I, Gage FH. The Role of Transposable Elements in Health and Diseases of the Central Nervous System. *J Neurosci*. 2013 Nov 6;33(45):17577-86.
- 50 Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet*. 2011;12(9):615-27.
- 51 Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn H, Fisher G, Jaana L, Suhonen O, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1995b; 92(25):11879-883.
- 52 Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997, 17:5046-61.
- 53 Doetsch F, Caillé I., Lim DA., García-Verdugo JM. and Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 97(6): 703–16.
- 54 Lim DA, Alvarez-Buylla A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96,:7526-31.
- 55 Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol*. 1998; 36:234-48.
- 56 Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002; 22(3): 629–634.
- 57 Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet Dev*. 2003;13:543–50.
- 58 Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001 Sep 15;21(18):7153-60.
- 59 Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A.. Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *J Comp Neurol*. 2004;478(4):359-78.
- 60 Reynolds BA, Weiss S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Reports*. 1992; 255(5052):1707-09.
- 61 Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF, Murphy M. Leukemia Inhibitory Factor Promotes the Neuronal Development of Spinal Cord Precursors From the Neural. *J Neurosci Res*. 1992;33(3):476-84.
- 62 Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-Responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of adult rodent brain *Mol. Cell. Neurosci*. 1995;6:474–86
- 63 Amemori T, Romanyuk N, Jendelova P, Herynek V, Turnovcova K, Prochazka P, Kapcalova M, Cocks G, Price J, Sykova E. Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:68. doi: 10.1186/scrt219
- 64 Emgård M, Piao J, Aineskog H, Liu J, Calzarossa C, Odeberg J, Holmberg L, Samuelsson EB, Bezubik B, Vincent PH., Falci SP, Seiger Å. Åkesson E. Sundström E. Neuroprotective effects of human spinal cord-derived neural precursor cells after transplantation to the injured spinal cord. *Exp Neurol*. 2014; 253:138-145

- 65 Kim BG, Kang YM, Phi JH, Kim YH, Hwang DH, Choi JY, Ryu S, Elastal AE, Paek SH, Wang KC, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. *Cytotherapy*. 2010;12:841–45
- 66 Chen KS, Sakowski SA, Feldman EL. Intraspinal stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2016;79(3):342-53.
- 67 Goutman SA, Chen KS, Feldman EL. Recent Advances and the Future of Stem Cell Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):428-48.
- 68 Tadesse T, Gearing M, Senitzer D, Saxe D, Brat DJ, Bray R, Gebel H, Hill C, Boulis N, Riley J, Feldman E, Johe K, Hazel T, Polak M, Bordeau J, Federici T, Glass JD. Analysis of graft survival in a trial of stem cell transplant in ALS. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1(11):900-8.
- 69 Glass JD, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Kelly C, Feldman EL. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells*. 2012; 30(6):1144-51

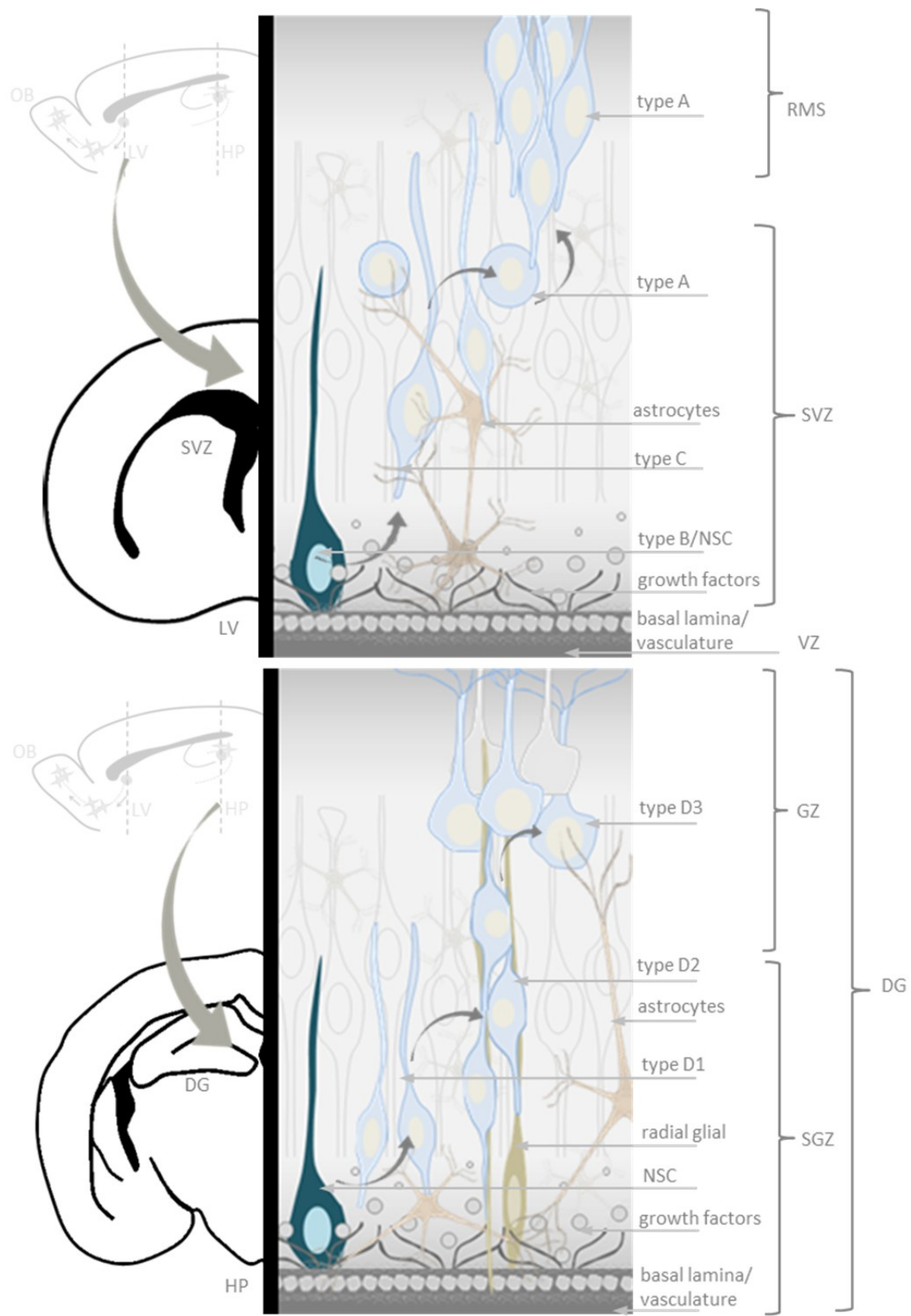


Figure 1. Neurogenic niches in the adult mammalian brain. The microenvironment of neural stem cell (NSCs) include a basal lamina, vasculature structures and support cells. The subventricular zone (SVZ) is the layer along the lateral ventricle. In the subventricular zone (SVZ) type B cells (NSCs-astrocytes) divide to give rise to type C cells (rapidly dividing transit amplifying immature progenitors), which in turn divide, forming a cluster that generates type A cells (neuroblasts). The SGZ is a germinal layer between the dentate gyrus and the hilus in the hippocampus. NSCs generate D1 cells (progenitors), which divide to generate D2 cells. D2 cells reach the granule layer becoming D3 cells (neuroblasts), which mature into new granule neurons. Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia inspired in neural stem cell niches models from the cited literature of the current review.

CAPÍTULO III

*3. Cellular aspects of in vitro proliferation,
migration and differentiation of adult
neural precursor cells from the
subventricular zone of mice*

3. CELLULAR ASPECTS OF IN VITRO PROLIFERATION, MIGRATION AND DIFFERENTIATION OF ADULT NEURAL PRECURSOR CELLS FROM THE SUBVENTRICULAR ZONE OF MICE

Os precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) cresceram como populações heterogêneas com características morfológicas e imunofenotípicas multipotentes. As neuroesferas foram positivas aos marcadores de NPCs presentes no embrião e no adulto como GFAP e nestin e o marcador de proliferação celular Ki67.

Após a diferenciação espontânea, as células realizaram movimentos migratórios e expressaram marcadores de células diferenciadas. A análise da morfologia mostrou que as células formaram caminhos migratórios chamados “*chained-like-pathways*”, que se assemelham com os programas migratórios das células imaturas nos nichos neurogênicos.

Além disso, devido à morfologia e à expressão de proteínas neuronais como DCX e gliais como GFAP, se considerou que as NPCs geraram três tipos de células, células diferenciadas gliais, células imaturas gliais e células imaturas neuronais, sendo generalizado o predomínio de células com marcação glial.

As culturas de NPCs da SVZ mimetizam os aspectos gerais da neurogênese, tais como a proliferação, migração e diferenciação.

Cellular aspects of *in vitro* proliferation, migration and differentiation of adult neural precursor cells from the subventricular zone of mice

Abstract

Background: The subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus are the two canonical neurogenic niches in the adult mammalian brain. In these regions, the cellular microenvironment promotes the proliferation, migration and differentiation of neural stem cells (NSC) to generate neuroblasts. Thus, neurogenesis in the SVZ provides neurons for the replacement of lost cells in the olfactory bulb (OB). Since neurogenesis and regeneration share the processes of proliferation, migration and differentiation, research in stem cells-based therapy aims to use NSCs and neural progenitors -in conjunction with neural precursor cells (NPCs)- to replace lost or dysfunctional cell types and/or provide neuroprotection in developmental, degenerative and traumatic conditions of the central nervous system (CNS). However, the successful development of these therapies depends on the understanding of the molecular, cellular and biological mechanisms that control neurogenesis and NSCs. For such purpose, the aim of this study was to describe some cellular aspects of *in vitro* proliferation, migration and differentiation of adult neural precursor cells (NPCs) from the subventricular zone (SVZ) of mice. Cells were isolated and expanded in culture medium with growth factors and next were spontaneously differentiated. *In vitro* proliferation, migration and differentiation were evaluated by confocal imaging analysis.

Findings: Neural precursor cells (NPCs) proliferation showed that cells grew as active heterogeneous cell populations with a multipotent progenitor fate. In the absence of

¹⁶*Guidelines* disponíveis em <http://cellregenerationjournal.biomedcentral.com/submission-guidelines>

growth factors, the morphology of NPCs and immature-like cells changed, cells migrated forming chained-cells pathways and spontaneously differentiated. Cells in differentiation had characteristic morphology and were positive to markers of immature-like neuronal cell, mature-like and/or immature-like glial cell.

Conclusions: NPCs effectively reproduce the process of proliferation, migration and differentiation to neurogenesis. However, *in vitro* differentiation promoted a glial fate.

Key words: neural progenitor cells, neural stem cells, neurogenesis, neurogenic niches, neuroblasts, neurons.

Background

The subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus are the two canonical neurogenic niches in the adult mammalian brain. In these regions, the cellular microenvironment promotes the proliferation, migration and differentiation of neural stem cells (NSCs) to generate newborn neurons or neuroblasts. Anatomically, the neurogenic niche of the SVZ presents four main cell types, neuroblasts (Type A cells), NSCs-Astrocytes (Type B cells), rapid amplifying immature progenitors (Type C cells) and ependymal cells. Type B cells divide to give rise to Type C cells, which in turn divide forming clusters of Type A cells. Newborn neurons of the SVZ join the network in the rostral migratory stream (RMS) and migrate up to the olfactory bulb (OB) where differentiate into granular and glomerular neurons [1, 2, 3, 4, 5]. Thus, neurogenesis in the SVZ provides neurons for the replacement of lost cells in the OB [5].

Since neurogenesis and regeneration share the processes of proliferation, migration and differentiation, research in stem cells-based therapy aims to use NSCs and neural progenitors -in conjunction with neural precursor cells (NPCs)- to replace lost or dysfunctional cell types and/or provide neuroprotection in developmental, degenerative and traumatic conditions of the central nervous system (CNS) [6,7,8,9,10,11,12]. However, the successful development of these therapies depends on the understanding of the molecular, cellular and biological mechanisms that control neurogenesis and NSCs. For such propose, the aim of this study was to describe some cellular aspects of *in vitro*

proliferation, migration and differentiation of adult neural precursor cells (NPCs) from the subventricular zone (SVZ) of mice.

Materials and methods

Isolation and expansion of adult neural precursor cells (NPCs) from the subventricular zone (SVZ)

Three weeks mice (P21) were humanely euthanized in accordance with the guidelines for the use of animals in research, Ethics Committee, College of Veterinary Medicine and Animal Sciences of Botucatu, São Paulo State University, Brazil (No. 90-2015). Brain was removed, placed into a balanced salt solution, and lateral ventricles dissected. Tissues were digested in 0,05% trypsin-EDTA in a 37°C water bath for 5 minutes, and then, enzymatic digestion was stopped with addition of BFS (Hyclone). Tissue was triturated to a single cell suspension with successively smaller diameter pipettes and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes, filtered in a sterile mesh (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and re-suspended in DMEM/F12 medium. Cells were plated at a concentration of 2×10^4 cell/cm² on T75 polyHema (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) coated culture flasks in free serum medium consisting of DMEM/F12 (Gibco, San Francisco, USA) with 2% B27 (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1% L-glutamine (Gibco, San Francisco, USA), 1% penicillin/amphotericin (Gibco), 0,02% amikacin (Gibco), supplemented with 20 ng/mL basic bFGF (R&D Systems, Minneapolis, EUA), 20 ng/mL EGF (Sigma) and 2% heparin (Sigma). SVZ-NPCs were maintained at 37°C in humidified 5% CO₂ tissue culture incubators and were fed every three or five days, changing half of the medium and adding growth factors. After three passages, SVZ-NPCs were spontaneously differentiated by plating on 24-well coated chamber culture with coverslips coated with poly-L-lisine (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in the absence of growth factors in feeding medium during one week [13,14,15].

Immunocytochemistry

The primary antibodies used were mouse anti-nestin, 1:500 dilution; rabbit anti-GFAP, 1:100 dilution, rabbit anti-KI67; 1:500 dilution and guinea pig anti-DCX; 1:500 dilution. Secondary fluorescent antibodies used were Alexa fluor 594, goat anti-rabbit IgG, 1:1000 dilution; Alexa fluor 488, goat anti-mouse, 1:500 dilution; Alexa fluor 488, goat anti-rat, 1:500 dilution (Invitrogen, USA), nuclei were stained with DAPI (1:10000). Cells were

rinsed in PBS, fixed for 20 minutes in 4% PFA (Sigma), rinsed three times with PBS, blocked in 5% BFS (Gibco) with 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 1 hour, and then incubated with primary antibody in 1% BFS with 0.02% Triton X-100 overnight at 4°C. After three PBS washes, the secondary antibody was applied for 1 hour at room temperature. Finally were washed three times with PBS before mounting with FluoromountG (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). Positive staining was confirmed by the negative secondary antibody staining, to exclude the possibility of cross-reactivity.

Imaging and image analysis

A minimum of 10 fields for each marker was photographed using Olympus FV1000 scanning confocal inverted microscope (OLYMPUS AMERICA INC, Corporate Parkway, Center Valley, Penn, USA). Image analysis was performed using ImageJ software (1.49v; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Single cell analysis for markers expression was calculated using normalized fluorescence. First, regions of interest (ROI) were drawn around cells and were determined area (A), mean gray value (GV) and the integrated intensity (IntD). Next, background (BK) fluorescence was measured by drawing a ROI in an area around the cells of interest and determined A_{bk} , GV_{bk} and $IntD_{bk}$. Normalized fluorescence was calculated as $A - (IntD \times GV_{bk})$. The percentage of positively stained cells or Ki67+ cells fraction analysis was calculated as $(DAPIKi67 \text{ stained cells} \times 100) / \text{total number of DAPI stained cells}$. Images were reconstructed and digitized with Adobe Photoshop®.

Migration analysis

The migration analysis was adapted from the methodology described by Sholl (1953) [16]. On digitalized pictures of the neurospheres, were drawn ten concentric circles of gradually increasing radius with a distance of 20 μm . Cell migration score was estimated by counting the number of concentric circles from the edge of the neurospheres that the cells reached after one week of migration. Three scores were chosen, 0 (no cells migrating from the neurospheres), 5 (cells reached until five concentric circles) and 10 (cells reached until ten concentric circles or more).

Population parameters and statistics

Data were analyzed using GraphPad Prism 5. Results of normalized fluorescence were expressed as mean and standard deviation ($\pm$ S.D.). Results of proliferation analysis and cell migration score were expressed as relative frequency.

Results and Discussion

Neural precursor cells (NPCs) from the subventricular zone (SVZ) isolated from P21 mice were expanded into culture medium with growth factors according to the methods of Palmer et al, (1996) and Reynolds and Weiss, (1997). After three passages, cells grew as heterogeneous aggregate populations of free-floating neurospheres.

To determine the fate of the neurospheres, *in vitro* cell populations were tested with immunophenotypical markers of NPCs. Neurospheres were positive to protein markers of NPCs such as glial fibrillary acid protein (GFAP) and nestin (Fig.1A). Quantitative analysis of the NPCs markers by normalized fluorescence showed more GFAP than nestin (Fig. 1B). Since the initial discovery of neurogenesis and the existence of NSCs, multiple protein markers are tested for the recognition of NPCs and newborn cells. The identification of the cells in the culture is crucial to reveal the total capacity displayed by the cells. Therefore there is not a definitive marker for NSCs and NPCs and many lineage markers such as GFAP, nestin, SOX, CD133 and CD15 are employed to analyze the cultures [1,2,3,4,5,17,18,19,20,21,22]. Here, we used GFAP and nestin double staining, because they are intermediate filament proteins expressed by many types of cells during development of the nervous system. While numerous cell types such as astrocytes, ependymal cells and NPCs express GFAP, nestin expression are transient and may not persist in the mature nervous system, been more restricted to NPCs of the subgranular zone of the hippocampus [23,24,25,26,27].

In the neurogenic niches, NSCs display self-renewal and multipotency to generate neurons. To determine the proliferative capacity of the neurospheres, cell populations were tested with the proliferative marker Ki67. Ki67 or MK67 is a nuclear protein present during all active phases of the cell cycle and absent in resting cells [28,29,30,31]. Ki67 positive cell fraction analysis showed that majority of the cells in the neurospheres expressed the proliferative marker (Fig. 1C, 1D). In the adult brain, incidence of self-renewal, multipotency and cell cycle are regulated by the same factors of their embryonic counterpart. Extrinsic factors as retinoic acid, FGF, WNT, SHH and BMP family proteins

interact with cell cycle regulators and epigenetic factors. Those proteins act by two signaling pathways, one instructive, influencing the fate of the newborn cell, and the other selective, allowing its maintenance and maturation [32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]. The expression of NPCs and proliferative markers demonstrated that the adult NPCs isolated grew as active heterogeneous cell populations with a multipotent progenitor fate in response to the conditioned medium with growth factors.

As mentioned, active NSCs in the SVZ generate precursor cells, which in turn generate newborn neurons that migrate to the OB. In order to analyze *in vitro* SVZ-NPCs migration activity, neurospheres were allowed to migrate and differentiated in the absence of growth factors during one week. Morphology of the migration from the neurospheres showed that NPCs and immature cells migrate forming chained-cells pathways (Fig.2A, 2B). Migration analysis was adapted from the methodology described by Sholl (1953). This analysis has been used in other experiments allowing the categorization of the cell migration [43]. Migration analysis showed that neurospheres had a medium migration score, reaching between four and five concentric circles (Fig.2A,2C). We inferred that *in vitro* NPCs and immature cells conserve their programs of migration forming chained-cells pathways, similar to the radial or tangential migration program. In the developing brain, newborn neurons or neuroblasts use different migration programs until their final destination. Neuroblasts use tangential or multipolar migration from the ganglionic eminence up to the thalamus, cortex, hippocampus and OB and radial migration from the ventricular and SVZ to the cortex [44]. Transposition of both, tangential and radial migration could be seen as an evolutionary feature that provides complexity to the mammalian cortex [42]. Neuroblasts who migrate to the cortex are guided by repulsive activity that creates an exclusion zone, leading to the formation of migratory routes up to the cortex [41,43,44]. In contrast, neuroblasts from the SVZ are chained by astrocytes that secrete chemoattractive factors, enhancing the migration throughout the RMS up to the OB [1,2,3,4,5,47].

In the OB, newborn cells differentiate into granular and glomerular neurons. In the OB, primary sensory neurons project to glomeruli where they synapse in mitral and tufted cells, which relay information to the olfactory cortex. Granular and glomerular new neurons provide a strong lateral inhibition to the local circuitry, contributing to information processing [48]. In order to examine the possible terminal fate and differentiation of SVZ-NPCs and immature cells, neurospheres differentiated were immunophenotyped with NPCs and immature cell markers. Cells in the neurospheres

expressed both proteins, the NPCs GFAP and the immature cell marker DCX (Fig. 3A). Normalized fluorescence analysis showed variable GFAP and DCX expression (Fig. 3B). DCX is a microtubule-associated protein expressed by differentiated neuronal precursor cells and immature neurons in embryonic and adult cortical structures. In the developing brain, DCX protein is important for neuronal migration, expressed by the cells on the RMS [49]. In some cases, GFAP and DCX cells had a characteristic morphology as either NPCs, differentiated neuronal precursor cells or immature-like cells. Immature-like GFAP cells were small, round or bipolar and stained diffusely, mature-like GFAP cells had a filamentous staining pattern and multiple processes. Immature-like DCX cells were bipolar or unipolar with variable size (Fig. 3C). Same morphology has been mentioned characteristic of *in vitro* cultures of SVZ-NPCs [2,17,50]. We inferred that some immature-like cells in the absence of growth factors effectively differentiated to a more commitment fate, as an immature-like neuronal or a mature-like and immature-like glial cell, been more present the glial cell fate.

In the embryonic and adult neurogenic niche, a little imbalance on the initial concentrations of transcriptional factors for neuronal or glia fate is rapidly amplified and just one of them is expressed, promoting final migration and differentiation of NPCs. One of the most studied factors is the NOTCH family and its interaction with BHLH genes [43,51,52,53,54]. In general, NOTCH activation induces the expression of neuronal repressor genes such as HES₁, leading to differentiation to NSCs and NPCs, generation of radial glia and astrocytes has the same pathway but an additional gene, HES₅, which represses neural fate and promotes glial cells. Thus, the neuronal fate requires antagonism of the NOTCH pathway, which leads to the expression of BHLH neural genes MASH₁, neurogenine₁ and neurogenine₂ [53,54].

In conclusion, adult NPCs from the subventricular zone (SVZ) grew as active heterogeneous cell populations with a multipotent progenitor fate, in response to the conditioned medium with growth factors. In the absence of growth factors, NPCs and immature-like cells migrate forming chained-cells pathways and spontaneously differentiated and expressed proteins of immature-like neuronal or a mature-like and immature-like glial cell. In neurogenic niches, an appropriate cellular microenvironment promotes proliferation, migration and differentiation of NSC to generate newborn neurons or neuroblasts. How much this process may be manipulated *in vitro* for the final generation of specific neuronal phenotype without changes in NSCs properties represents a promising approach. Our results suggest that NPCs effectively reproduce the process

of proliferation, migration and differentiation to neurogenesis. However, *in vitro* differentiation seems to be negatively influenced promoting a change to a glial and/or quiescent fate.

Abbreviations

SVZ subventricular zone
 NPCs neural precursor cells
 SGZ subgranular zone
 NSCs neural stem cells
 RMS rostral migratory stream
 OB olfactory bulb
 CNS central nervous system
 EGF epidermal growth factor
 bFGF basic fibroblastic growth factor
 IGF insulin growth factor
 TGF tumoral growth factor
 VEGF vascular endothelial growth factor
 GFAP glial fibrillary acid protein
 SHH sonic hedgehog
 BMP bone morphogenetic protein
 DCX doublecortin
 BHLH basic helix loop helix
 MASH₁ mammalian achaete-scute homologous

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Acknowledgement

We thank to Maria Elisa Calcagnotto for her comments and suggestions. Special thanks The Centro de Microscopia Eletrônica (CME) - UFRGS, Brazil for technical assistance.

References

1. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997, 17:5046-61
2. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM. and Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97(6): 703–16

3. Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol.* 1998; 36:234-48
4. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002; 22(3): 629–634
5. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet Dev.* 2003;13:543–50
6. Kim BG, Kang YM, Phi JH, Kim YH, Hwang DH, Choi JY, Ryu S, Elastal AE, Paek SH, Wang KC, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. *Cytherapy.* 2010;12:841–45
7. Su H, Zhang W, Yang X, Qin D, Sang Y, Wu C, Wong WM, Yuan Q, Xu L, Shen P, Hazel T, Johe K, Koliatsos VE. Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats. *Neuroscience Letter.* 2011; 494 (3):222-26
8. Glass JD, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Kelly C, Feldman EL. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells.* 2012; 30(6):1144-51
9. Hefferan MP, Galik J, Kakinohana O, Sekerkova G, Santucci C, Marsala S, Navarro R, Hruska-Plochan M, Johe K, Feldman E, Cleveland DW, Marsala M. Human Neural Stem Cell Replacement Therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis by Spinal Transplantation. *PLoS ONE.* 2012; 7(8): e42614. doi:10.1371/journal.pone.0042614
10. Amemori T, Romanyuk N, Jendelova P, Herynek V, Turnovcova K, Prochazka P, Kapcalova M, Cocks G, Price J, Sykova E. Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:68. doi: 10.1186/scrt219
11. Emgård M, Piao J, Aineskog H, Liu J, Calzarossa C, Odeberg J, Holmberg L, Samuelsson EB, Bezubik B, Vincent PH, Falcì SP, Seiger Å, Åkesson E, Sundström E. Neuroprotective effects of human spinal cord-derived neural precursor cells after transplantation to the injured spinal cord. *Exp Neurol.* 2014; 253:138-145
12. Feldman EL, Boulis NM, Hur J, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Bordeau J, Sakowski SA, Glass JD. Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes. *Ann Neurol.* 2014;75(3):363-73
13. Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-Responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of adult rodent brain *Mol. Cell. Neurosci.* 1995;6:474–86
14. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Develop Biol.* 1996;175(1):1–13
15. Reynolds BA, Weiss S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Reports.* 1992; 255(5052):1707-09
16. Sholl D. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy.* 1953; 87(4):387–406
17. Gage FH, Ray L, Fisher L. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 1995a; (18):159-92

18. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn H, Fisher G, Jaana L, Suhonen O, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995b; 92(25):11879-883
19. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MI, Masek M, Phan TY, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(26):14720-725
20. Capela A, Temple S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as non-ependymal. *Neuron.* 2002, 35:865-75.
21. Capela A, Temple S. LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev. Biol.* 2006;291:300–13.
22. Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, Jacobsen SE, Nuber UA. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(12):5727-36
23. Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci.* 1978; 35(1):147-55
24. Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Research.* 1980;200(1):13–21
25. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Res.* 2000;25(9-10):1439-51
26. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* 2005; 20(2):665–71
27. Guérette D, Khan PA, Savard PE, Vincent M. Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. *BMC Evol. Biol.* 2007; 7(164) doi: 10.1186/1471-2148-7-164
28. Schonk DM, Kuipers HJ, Van Drunen E, Van Dalen CH, Geurts Van Kessel AH, Verheijen R, Ramaekers FC. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. Genet.* 1989;83(3):297–99
29. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000;182(3):311–22
30. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* 2006; 206(3):624–35
31. Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* 2007; 40(3):422–30
32. Smith WC, Harland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell.* 1992,70(5):829-40
33. Furuta Y, Piston DW, Hogan BL. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development.* 1997; 124(11):2203–12
34. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 2000;28:713–26.

35. Palma V, Ruiz I, Altaba A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*. 2004; 131(2):337-45
36. Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA. LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*. 2005;132:5503–14
37. Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, Falciglia G, Gobeske KT, Czeisler C, Kessler JA. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2008; 28(37):9194-04
38. Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*. 2011; 145(7): 1142–55
39. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz I, Altaba A. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. 2005;132:335–344
40. Furutachi S, Matsumoto A, Nakayama K.I, Gotoh Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J*. 2013, 32(7):970-81
41. Duncan RN, Panahi S, Piotrowski T, Dorsky RI. Identification of Wnt Genes Expressed in Neural Progenitor Zones during Zebrafish Brain Development. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145810. doi: 10.1371/journal.pone.0145810
42. Furutachi S, Miya H, Watanabe T, Kawai H, Yamasaki N, Harada Y, Imayoshi I, Nelson M, Nakayama KI, Hirabayashi Y, Gotoh Y. Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2015;18(5):657-65
43. Hernandez-Miranda LR, Cariboni A, Faux C, Ruhrberg C, Hyung Cho J, Cloutier JF, Eickholt BJ, Parnavelas JG, Andrews WD. Robo1 Regulates Semaphorin Signaling to Guide the Migration of Cortical Interneurons through the Ventral Forebrain. *J Neurosci*. 2011; 31(16):6174-87
44. Ohtaka-Maruyama C, Okado H. Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. *Front Neurosci*. 2015; 9:447. doi: 10.3389/fnins.2015.00447
45. Marín O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:441-83
46. Hernandez-Miranda LR, Parnavelas JG, Chiara F. Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. *ASN Neuro*. 2010;2(2):e00031
47. Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, Roysam B, Shen Q, Temple S. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):163-73
48. Ming GL, Song H: Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; 70(4):687–702
49. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn Cm, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2003;467(1):1-10
50. Walton RM, Wolfe JH. In vitro growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. *J Neurosci Methods*. 2008; 169(1):58–167

51. Schoenherr CJ. Anderson DJ. NRSF: A coordinate repressor of neuron-specific genes expressed in CNS neural progenitors cells. In: Gage FH. Ray J. Fisher LJ. Isolation, Characterization, and use of Stem Cells from the CNS. Annual Review of Neuroscience; 1995. p.9-28
52. Hirata H. Yoshiura S. Ohtsuka T. Bessho Y. Harada T. Yoshikawa K. Kageyama R. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. Science. 2002;298(5594):840-43
53. Imayoshi I. Sakamoto M. Yamaguchi M. Mori K. Kageyama R. Essential roles of notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. J Neurosci. 2010;30(9):3489–98
54. Imayoshi I. Shimojo H. Sakamoto M. Ohtsuka T. Kageyama R. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. Cell Mol Life Sci. 2013;70(12):2045-57

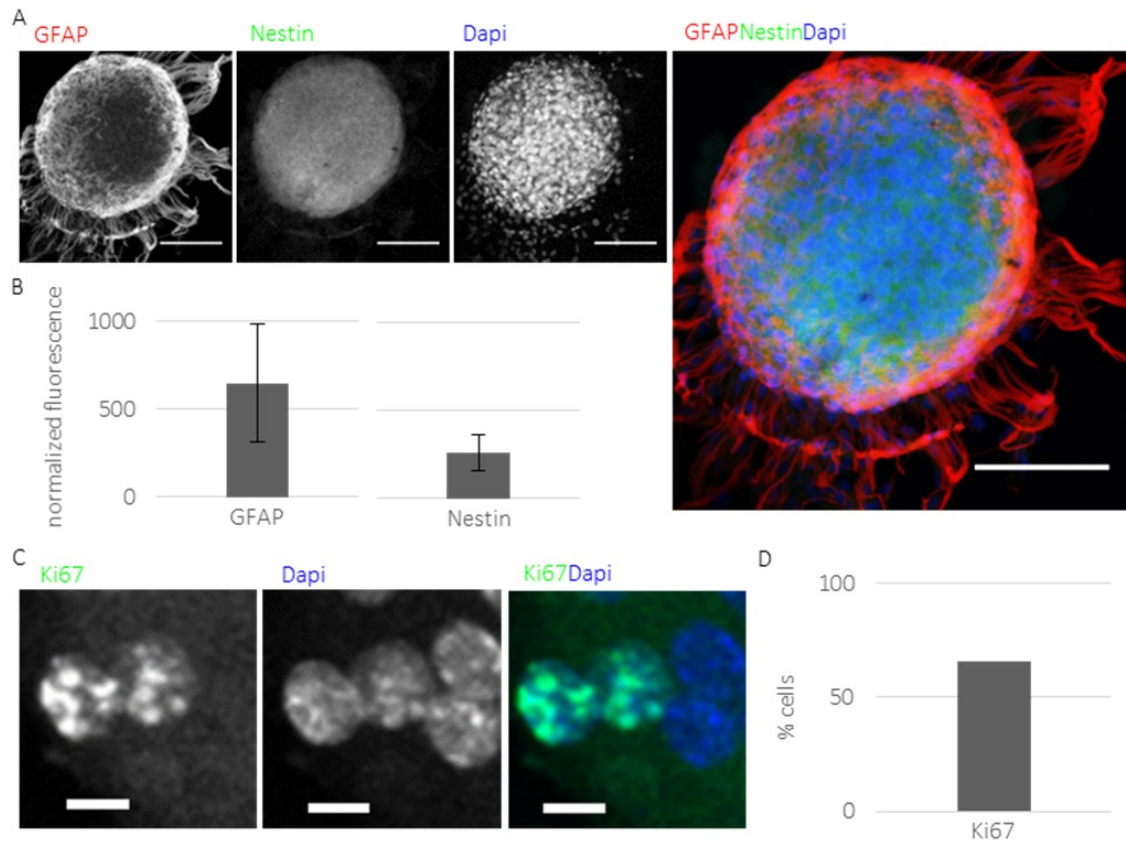


Figure 1. Adult subventricular zone neural precursor cells SVZ-NPCs neurospheres population fate and proliferation. (A) Morphology and GFAP and nestin expression of adult subventricular zone neural precursor cells (SVZ-NPCs) neurospheres, representative images. (B) GFAP and nestin quantitative analyses. Normalized fluorescence or the integrated fluorescence intensities were plotted according to the NPCs markers. Normalized fluorescence of a cell was measured at the average bright plane of a z series. Cells expressed more GFAP (n=30). (C,D) Ki67 quantitative analysis and expression. The positive cell fractions were plotted according to the proliferative marker. Majority of cells expressed Ki67 protein (n=30). Error bars denote standard deviation. Nuclei were counterstained with DAPI. Calibration bar 20 μ m (A), 10 μ m (C).

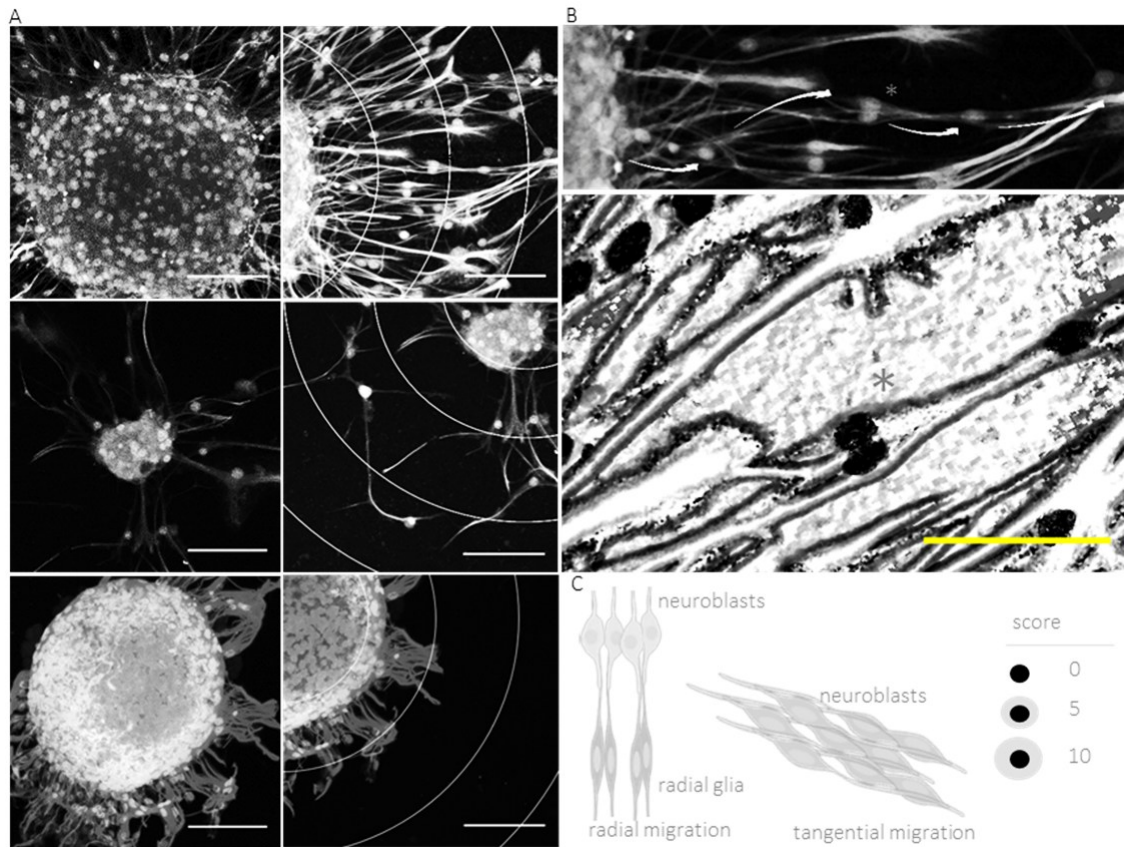


Figure 2. Adult subventricular zone neural precursor cells SVZ-NPCs neurospheres conserve their migration program. (A,B) Morphology of SVZ-NPCs migration and migration diagram, representative images. (B) Immature cells form chained-cells pathways. (C) Migration diagram score by Sholl analysis and migrational program in the brain. Migration score was estimated by counting the number of concentric circles that the cells reached after one week of migration. Calibration bar, 20 μ m.

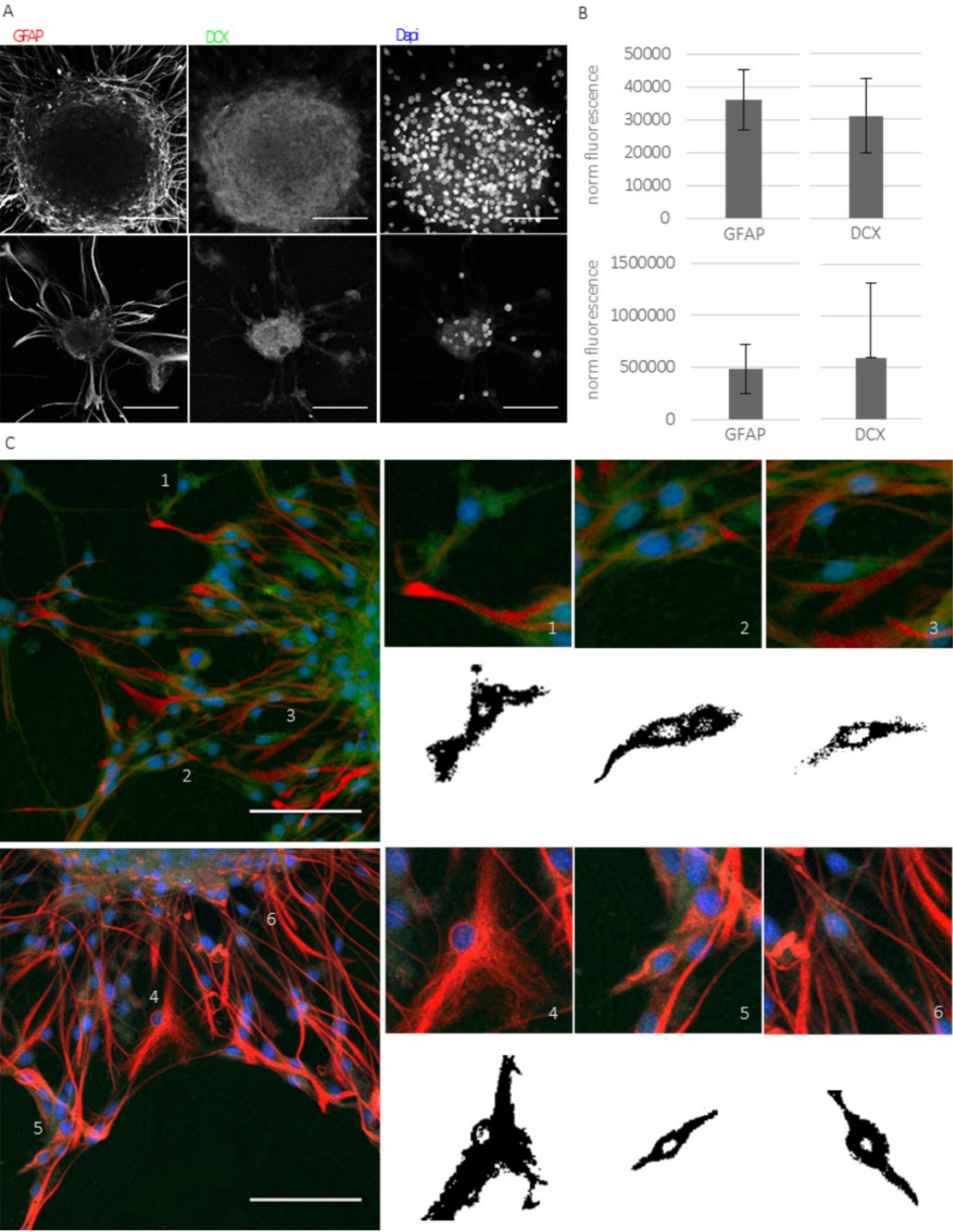


Figure 3. Adult subventricular zone neural precursor cells SVZ-NPCs differentiation as a neuronal immature-like or glial mature-like and immature-like cell. (A) NPCs and undifferentiated cell markers expression, representative images. Adult SVZ-NPCs were positive for the markers GFAP and DCX. (B) Normalized fluorescence or the integrated fluorescence intensities were plotted according to NPCs and undifferentiated cell markers. Integrated fluorescence intensity of a cell was measured at the average bright plane of a z series (n=60). (C) Morphology of DCX and GFAP positive cells, representative images. (1, 2, 3) Immature-like DCX cells; (4) immature-like GFAP cell; (5, 6) mature-like GFAP cell. Nuclei were counterstained with DAPI. Error bars denote standard deviation. Nuclei were counterstained with DAPI. Bar, 20 μm .

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSSÃO

4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 DISCUSSÃO

4.1 DISCUSSÃO

Os estudos em células-tronco e regeneração se remontam aos primeiros experimentos com ouriços do mar e ovos de anfíbios no século passado. Desde então grande parte dos seus descobrimentos derivam de uma visão integrativa que permite a ligação dos avanços científicos e tecnológicos de diferentes disciplinas, desde as ciências básicas como biologia e bioquímica, passando por embriologia, fisiologia, biologia do desenvolvimento, ecologia e mais recentemente as ciências médicas e aplicadas.

Na pesquisa em medicina e terapia regenerativa para doenças neurológicas, as células-tronco são alvo de múltiplas pesquisas para repor células neurais perdidas ou disfuncionais e promover neuroproteção em condições com pouco potencial regenerativo. Assim, este trabalho fez uma revisão das teorias atuais no funcionamento dos nichos neurogênicos e as células-tronco (NSCs) com ênfase na proliferação, migração e diferenciação, processos fundamentais para a neurogênese durante o desenvolvimento embrionário e ainda no cérebro adulto. Adicionalmente o estudo inclui a descrição dos aspectos celulares morfológicos e imunofenotípicos da cultura *in vitro* dos precursores neurais (NPCs) dos nichos neurogênicos do camundongo com interesse na neurogênese e sua manipulação para fins terapêuticos.

Os nichos neurogênicos no cérebro adulto

No contexto da biologia do desenvolvimento, diferentes estudos têm demonstrado que existem diferenças morfológicas e funcionais na formação e manutenção do córtex entre as espécies animais. Assim, no caso da neurogênese adulta, atualmente os estudos tem proposto três tipos de regiões com neurogêneses ou regiões neurogênicas nos mamíferos; 1) as regiões que são constantes entre as diferentes espécies e que exibem neurogênese completa; 2) as regiões relativamente constantes entre diferentes espécies e que apresentam diferentes graus de neurogênese; e 3) as regiões com presença da neurogênese dependendo da espécie (GRANDEL et BRAND, 2013; BONFANTINI et PERETTO, 2011; BONFANTINI et al., 2016) (Figura 20).

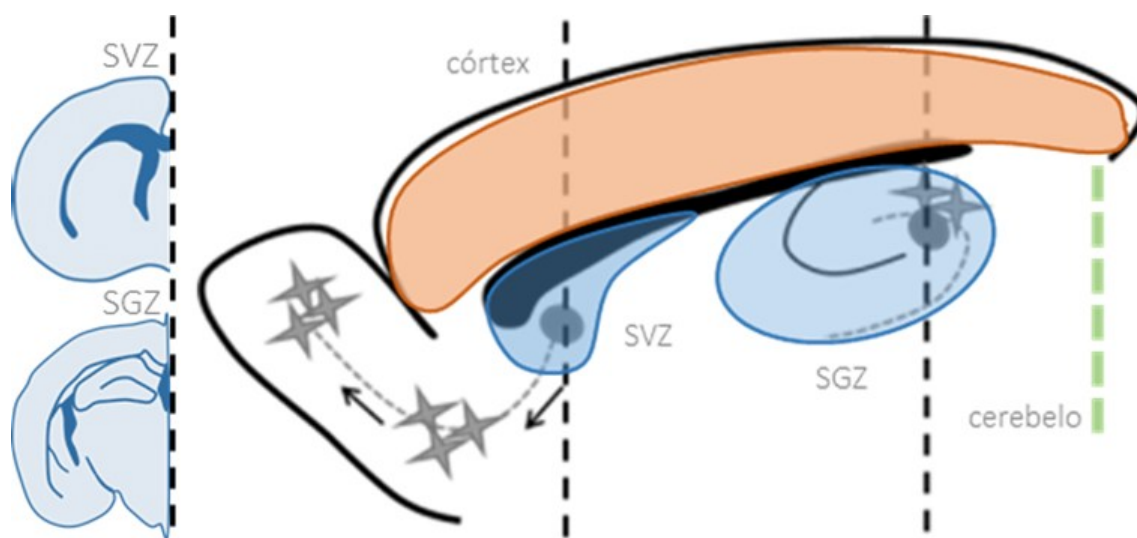


FIGURA 20. Tipos de regiões neurogênicas no cérebro adulto. Regiões constantes entre as diferentes espécies e que exibem neurogênese completa (SVZ e SGZ); regiões relativamente constantes entre diferentes espécies e com diferentes graus de neurogênese (córtex e estriado); e as regiões com a presença da neurogênese dependendo da espécie (cerebelo) (GRANDEL et BRAND, 2013; BONFANTINI et al., 2011; BONFANTINI et al., 2016). *Artwork by Lina Maria Delgado-Garcia*

Em pequenos animais, das três regiões descritas, a maioria dos estudos em neurogênese e progenitores neurais se centram nas regiões com neurogênese completa, assim, no caso do cão, na literatura se encontram numerosos trabalhos de isolamento, caracterização e avaliação do microambiente e os NPCs da zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (SGZ) do giro denteado do hipocampo (MALIK et al, 2012; LIM et al, 2012; WALTON et WOLFE, 2008; WALTON et al, 2013; LOWE et al, 2015) sendo que, só um trabalho descreve o isolamento de NPCs do cerebelo (WALTON et al, 2013); uma região de neurogênese limitada dependendo da espécie, característica compartilhada com os roedores e ainda em estudo nos humanos, sendo as outras áreas pouco exploradas.

Portanto, atualmente são descritos como nichos neurogênicos às regiões do sistema nervoso adulto com neurogênese completa ao longo da vida, possível pela presença das NSCs e um microambiente celular apropriado (BONFANTINI et PERETTO, 2011; BONFANTINI et al., 2016). Nos mamíferos existem pelo menos dois nichos neurogênicos, sendo que este trabalho abordou o estudo teórico e experimental da neurogênese na zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (SGZ) do giro denteado do hipocampo. Regiões nas quais os neuroblastos interagem em circuitos neuronais pré-existent, participando em funções superiores como as atividades cognitivas. No nicho neurogênico, os neuroblastos da SVZ migram pelo canal

migratório rostral (RMS) até o bulbo olfatório (OB) onde se diferenciam em neurônios granulares e glomerulares; e por sua parte, os neuroblastos da SGZ migram até a camada granular onde se diferenciam em neurônios granulares (GAGE et al., 1995; DOETSCH et al., 1997; GARCIA-VERDUGO et al., 1998; DOETSCH et al., 1999; LIM et ALVAREZ-BUYLLA, 1999; GAGE, 2000; ALVAREZ-BUYLLA et GARCIA-VERDUGO, 2002; DOETSCH, 2003).

A neurogênese e a atividade das NSCs nos mamíferos adultos

Como mencionado, a neurogênese no cérebro adulto implica o controle coordenado da proliferação, migração e diferenciação das NSCs nos nichos neurogênicos para a produção de neurônios; possível unicamente pela interação com uma ampla variedade de mecanismos intrínsecos e extrínsecos. Não obstante, existem diferenças e semelhanças no comportamento das NSCs durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente no nicho neurogênico adulto.

O principal aspecto desse comportamento se relaciona com o nível de atividade das NSCs, o que faz com que a atividade de proliferação, migração e diferenciação das NSCs nos nichos neurogênicos seja muito menos efetiva comparada com a atividade durante a fase do tubo neural, diferença que pode ser devida a mecanismos intrínsecos e extrínsecos ou fatores indutores.

Em princípio se identifica a forte influência de mecanismos intrínsecos como os inibidores do ciclo celular (CKIs) os quais agem tanto em células progenitoras (CKIp21 e CKIp27) como em células da glia radial e NSCs (CKIp57) (FUENTEALBA et al., 2015; FURUTACHI et al., 2013, 2015). Assim, a eliminação das proteínas CKIp57 permitiu a rápida progressão do ciclo celular e a neurogênese (FURUTACHI et al., 2013), sendo que as NSCs-CKIp57 correspondem a populações de células progenitoras neurais de divisão lenta na eminência ganglionar embrionária que mais tarde se tornam NSCs quiescentes no adulto (FUENTEALBA et al., 2015; FURUTACHI et al., 2015).

Outro mecanismo importante são os fatores indutores e as vias de sinalização extrínsecas que regulam a atividade de proliferação e diferenciação das NSCs durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente nos nichos neurogênicos (SCHOENHERR et ANDERSON, 1995; LEVISON et GOLDMAN, 2006; PURVES et al., 2012; KANDEL et al., 2014).

Neste contexto, no cérebro adulto, os estudos revisados demonstram que os fatores indutores e suas vias de sinalização apresentam atividades de sinergismo e antagonismo. Assim, a ativação de NOTCH e WNT leva à manutenção da população de NSCs e a neurogênese, ao passo que a inativação de NOTCH induz a rápida diferenciação neuronal e a diminuição da população dos NPCs (KUWABARA et al, 2009; IMAYOSHI et al, 2010; SHIMOJO et al, 2011; IMAYOSHI et al, 2013; VARELA-NALLAR et al, 2013; KAGEYAMA et al, 2015; KAGEYAMA et al, 2015).

Por sua parte, a sinalização das BMPs e SHH pode agir de maneiras opostas; a sinalização das BMPs inibe a diferenciação neuronal e promove gliogênese, enquanto a sinalização SHH aumenta a neurogênese e o número de NSCs. Este antagonismo é exercido através da modulação do EGF, sendo que a ativação dos receptores para EGF inibe indiretamente a sinalização dos BMPs em quanto ativa a sinalização de SHH (PALMA et al., 2004; PALMA et al., 2005).

Estes achados sugerem que a manipulação combinada de mecanismos intrínsecos e extrínsecos, pode ser importante no direcionamento das terapias em regeneração celular em condições com pouco potencial neurogênico como as doenças neurodegenerativas.

A proliferação, migração e diferenciação in vitro dos NPCs

Para finalizar, se descreveu o protocolo para isolamento e cultivo de NPCs dos nichos neurogênicos adultos no camundongo. O protocolo segue a metodologia de Reynolds et Weiss (1997) e Reynolds et Rietze (2005) e constitui-se do isolamento, dissociação, purificação, contagem e cultivo primário em meio de cultivo com EGF e FGF como fatores de crescimento (ver Anexo 1). O protocolo tem como base o enriquecimento do meio de cultivo com fatores de crescimento, o que pretende reproduzir o microambiente celular dos nichos neurogênicos embrionários (REYNOLDS et WEISS, 1996, 1997; RICHARDS et al, 1992; PALMER et al, 1995; REYNOLDS et RIETZA, 2005). Dados estes resultados, este protocolo foi usado para o isolamento dos NPCs da SVZ e da SGZ de camundongos adultos (DELGADO-GARCIA et al, 2015a, 2015b) e atualmente está sendo adaptado para o isolamento dos NPCs dos nichos neurogênicos no cão para fins terapêuticos.

Os NPCs isolados cresceram como populações heterogêneas com características morfológicas e imunofenotípicas multipotentes. Após a diferenciação espontânea, as células realizaram movimentos migratórios e expressaram marcadores de células diferenciadas. Devido à morfologia das células em diferenciação e à expressão de proteínas neuronais e gliais, se considerou que as NPCs geraram três tipos de células, células diferenciadas gliais, células imaturas gliais e células imaturas neuronais, sendo generalizado o predomínio de células com marcação glial. Adicionalmente, na comparação da diferenciação de NPCs da SVZ e a SGZ se encontrou morfologia e expressão de marcadores equivalente a NPCs e células imaturas, sendo que a SVZ poderia ser mais efetiva na produção de células imaturas (anexo 2).

Estes achados indicam que as culturas mimetizam os aspectos gerais anteriormente descritos da neurogênese, como a proliferação, migração e diferenciação. A morfologia, fenótipo e marcação proliferativa descritas das neuroesferas podem ser comparadas com a proliferação estimulada pelos fatores indutores. Assim, no desenvolvimento embrionário a proliferação e diferenciação das NSCs envolve modos simétricos e assimétricos de divisão celular produzindo todos os tipos de células neurais e por conseguinte a formação das regiões primitivas do sistema nervoso (LEVISON et GOLDMAN, 2006; PURVES et al., 2012; KANDEL et al., 2014).

Na sequência, a análise da migração e diferenciação descreveram características dos programas de migração e diferenciação das NSCs, progenitores e células imaturas nos nichos neurogênicos. Assim na migração radial, os neurônios movem-se ao longo das células da glia radial e na migração tangencial, os neurônios utilizam os tratos dos axônios como guia (CALEGARI et WASKOK, 2014; WALKER et KEMPERMANN, 2014; LEVISON et GOLDMAN, 2006; PURVES et al, 2012; KANDEL et al, 2014; OHTAKA-MARUYAMA et OKADO, 2015).

Em conjunto, sendo que a neurogênese e a regeneração compartilham os mesmos processos, estas células seriam viáveis para o tratamento de condições com pouco potencial regenerativo.

4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proliferação, migração e diferenciação, são processos fundamentais para a neurogênese durante o desenvolvimento embrionário e ainda no cérebro adulto.

Os nichos neurogênicos são regiões do sistema nervoso adulto com neurogênese completa pela presença das NSCs e um microambiente celular apropriado. Nos mamíferos existem pelo menos dois nichos, a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (SGZ) do giro denteado do hipocampo.

Os estudos revisados demonstram que existem diferenças e semelhanças no comportamento das NSCs durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente no nicho neurogênico adulto. O principal aspecto desse comportamento se relaciona com o nível de atividade das NSCs, o que faz com que a atividade de proliferação, migração e diferenciação das NSCs nos nichos neurogênicos seja muito menos efetiva comparada com a atividade no tubo neural, diferença que pode ser devido aos mecanismos intrínsecos e extrínsecos ou fatores indutores.

Para finalizar, neste estudo também se descreveu o protocolo para isolamento e cultivo de NPCs dos nichos neurogênicos adultos no camundongo. O protocolo se compõe do isolamento, dissociação, purificação, contagem e cultivo primário. Os NPCs isolados cresceram como populações heterogêneas com características morfológicas e imunofenotípicas multipotentes. Após a diferenciação espontânea, as células realizaram movimentos migratórios e expressaram marcadores de células diferenciadas. Devido à morfologia das células em diferenciação e à expressão de proteínas neuronais e gliais, se considerou que as NPCs geraram três tipos de células, células diferenciadas gliais, células imaturas gliais e células imaturas neuronais, sendo generalizado o predomínio de células com marcação glial. Em conjunto, as culturas mimetizam os aspectos gerais da neurogênese, tais como a proliferação, migração e diferenciação.

Estes achados são importantes para direcionar o destino da medicina regenerativa com células-tronco no tratamento de injúrias, doenças do desenvolvimento e doenças neurodegenerativas, além de se propor como uma ferramenta no entendimento do funcionamento do cérebro nos mamíferos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABROUS, D.N.; KOEHL, M.; MOAL, M. Adult Neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiological Reviews**. v.85, n.2, p.523-569, 2005

ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? . **Science**. v.135, p.1127–1128, 1962

ALTMAN, J. DAS, G.D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to **postnatal neurogenesis in some brain regions**. *Journal of Comparative Neurology*. v. 126, n.3, p. 337-389, 1966

ALVAREZ-BUYLLA, A. GARCIA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **Journal of Neuroscience**. v.22, n.3, p.629-634, 2002

AMEMORI, T. ROMANYUK, N. JENDELOVA, P. HERYNEK, V. TURNOVCOVA, K. PROCHAZKA, P. KAPCALOVA, M. COCKS, G. PRICE, J. SYKOVA, E. Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. **Stem Cell Research Therapy**. V.4, n.3, p.68, 2013.

BARKER, R. BEAUFORT, I. Scientific and ethical issues related to stem cell research and intervention in neurodegenerative disorders of the brain. **Progress in Neurobiology**. v.110, p.63-73, 2013

BEENKEN, A. MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nature Reviews**. v8, p 235-253, 2009

BERGER, D. A. Ancient times through the 19th century. In: BERGER, D. A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory. History of the lab. -----: **MLO-ONLINE**. 1999, chap 1, p. 1-8

BRIGGS, R. KING, T.J. transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.38, p. 455-463, 1952

BONAGUIDI, M.A. PENG, C. MCGUIRE, T. FALCIGLIA, G. GOBESKE, K.T. CZEISLER, C. KESSLER, J.A. Noggin Expands Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 37, p. 9194 –9204, 2008

BONFANTI, L. PERETTO, P. Adult neurogenesis in mammals -a theme with many variations. **European Journal of Neuroscience**. v.34, n. 6, p.930-50, 2011.

BONFANTI L. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals. **Frontiers on Neuroscience**. v.10, n.44, p. doi: 10.3389/fnins.2016.00044, 2016

BORRELL A, V. CALEGARI, F. Review article Mechanisms of brain evolution: Regulation of neural progenitor cell diversity and cell cycle length. **Neuroscience Research**. v.86, p.14–24, 2014

CAHAN D. The institutional revolution in German physics, 1865–1914. In: **HISTORICAL STUDIES IN THE PHYSICAL SCIENCES**. -----:-----, chap. 15, 1984, p. 1–65

CHONG, J.A. TAPIA-RAMIREZ, J. KIM, S. TOLEDO-ARAL, J.J. ZHENG, Y. BOUTROS, M.C. ALTSHULLER, Y.M. FROHMAN, M.A. KRANER, S.D. MANDEL, G. REST: A Mammalian Silencer Protein That Restricts Sodium Channel Gene Expression to Neurons. **Cell**. v. 80, p. 949-957, 1995

CHURCHILL, F. The rise of classical descriptive embryology. In: GILBERT, S.F. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY. A conceptual History of Modern Embryology**. New York: Plenum Press, 1991, chap. 1, p.1-23

CUI, J. MICHAILLE, J.J. JIANG, W. ZILE, M.H. Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. **Developmental Biology**. v.260, n.2, p. 496-511, 2003

DANTSCHAKOFF, W. **Anat. Hefte.**, v.37, p. 472–589, 1908

DE LAHUNTA, A GLASS, E. **VETERINARY NEUROANATOMY AND CLINICAL NEUROLOGY**. 3Ed. Saunders Elsevier Inc. 2009, chap. 3, p. 23-53

DELGADO-GARCIA, L.M. MAZZONETTO, P.C. GALINDO, L.T. AMORIM, R.M. PORCIONATTO, M. Neural stem cell sources in the mouse brain. In: **9th WORLD CONGRESS INTERNATIONAL BRAIN RESEARCH ORGANIZATION IBRO**, 2015, Rio de Janeiro. Final Program, Rio de Janeiro:IBRO, 2015. p. 147

DELGADO-GARCIA, L.M. MAZZONETTO, P.C. GALINDO, L.T. PORCIONATTO, M. AMORIM, R.M. Progenitores neurais para terapia celular em transtornos do desenvolvimento. **RESUMENES DE LAS XXXIII JORNADAS JÓVENES INVESTIGADORES DE LA ASOCIACION DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO**. 1Ed. La Plata:Universidad Nacional de La Plata, 2015. p. 262

DOETSCH, F. A niche for adult neural stem cells. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 13, p. 543–550, 2003

DOETSCH, F. CAILLE, I. LIM, D.A. GARCIA-VERDUGO, J.M. ALVAREZ-BUYLLA, A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. **Cell**. Vol. 97, 703–716, 1999

DOETSCH F. GARCIA-VERDUGO J.M. ALVAREZ-BUYLLA A. Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. **The Journal of Neuroscience**. v.17, n.13, pp.5046–5061, 1997

DOMEN, J. WAGERS, A. WEISSMAN, I. L. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. In: **NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH-DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.** Regenerative Medicine. 2006, chap 2, p. 14-28

DRIESCH, H. **THE SCIENCE AND PHILOSOPHY OF THE ORGANISM.** Ed. The Gifford Lectures delivered before University of Aberdeen. London, 1907, chap. 4, p. 359-374

DUITTOZ, A.H; HEVOR, T. Primary culture of neural precursors from the ovine central nervous system (CNS). *Journal of Neuroscience Methods.* v.107, p.131–140, 2001

DUNCAN, R.N. PANAHI, S. PIOTROWSKI, T. DORSKY, RI. Identification of Wnt Genes Expressed in Neural Progenitor Zones during Zebrafish Brain Development. **PLoS One.** v. 29, n.10, p 1-13, 2015

DUPIN, E. ZILLER, C. LE DOUARIN. Segregation of cell lineage in the avian neural crest..In: GAGE, F.H; RAY, J.; FISHER, L.J. Isolation, Characterization, and use of Stem Cells from the CNS. **Annual Review of Neuroscience.** v.18, n.7, p.29-42, 1995

ERIKSSON, P.S; PERFILIEVA, E; BJORK-ERIKSSON, T; ALBORN, A.M; NORDBORG, C; PETERSON, D.A; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine.** v.4, p.1313–1317, 1998

EVANS, M.J. KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* v.292, p.154-156, 1981

FRIEDENSTEIN, AJ. PIATETZKY-SHAPIRO, II. PETRAKOVA, KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology.** v. 16, n.3, p. 381-390, 1966

FUENTEALBA, LC. ROMPANI, SB. PARRAGUEZ, JI. OBERNIER, K. ROMERO, R. CEPKO, CL. ALVAREZ-BUYLLA, A. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. **Cell.** v. 161, n.7, p.1644-1655, 2015

FURUTACHI S, MATSUMOTO A, NAKAYAMA K.I, GOTOH Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. **The EMBO Journal.** v.32, n.7, p.970-81, 2013

FURUTACHI S. MIYA H. WATANABE T. KAWAI H. YAMASAKI N. HARADA Y. IMAYOSHI I. NELSON M. NAKAYAMA K.I. HIRABAYASHI Y. GOTOH Y. Slowly dividing neural progenitors are of embryonic origin of adult neural stem cells. **Nature Neuroscience.** p.1-11, 2015

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science.** v. 287, n. 5457, p. 1433–1438, 2000.

GAGE, F.H; RAY, J.; FISHER, L.J. Isolation, Characterization, and use of Stem Cells from the CNS. **Annual Review of Neuroscience.** v.18, n.7, p.159-192, 1995

GARCIA-VERDUGO, J.M. DOETSCH, F. WICHTERLE, H. LIM, D.A. ALVAREZ-BUYLLA, A. Architecture and Cell Types of the Adult Subventricular Zone: In Search of the Stem Cells. **Journal of Neurobiology**. v. 36, p. 234–248, 1998

GASCÓN, S. MURENU, E. MASSERDOTTI, G. ORTEGA, F. RUSSO, G.L. PETRIK, D. DESHPANDE, A. HEINRICH, C. KAROW, M. ROBERTSON, S.P. SCHROEDER, T. BECKERS, J. IRMLER, M. BERNDT, C. ANGELI, J.P. CONRAD, M. BERNINGER, B. GÖTZ, M. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. **Cell Stem Cell**. v. -----, n. -----, p. -----, 2015

GRANDEL, H. LUN, K. RAUCH, G.J. RHINN, M. PIOTROWSKI, T. HOUART, C. SORDINO, P., KÜCHLER, A.M. SCHULTE-MERKER, S. GEISLER, R. HOLDER, N. WILSON, S.W. BRAND, M. Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. **Development**. v. 129, n.12, p.2851-2865, 2002

GRANDEL, H. BRAND, M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. **Development Genes and Evolution**. v.223, n. 1-2, p.131-147, 2003

GURDON, J. B. ELSDALE, T.R. FISCHBERG, M. Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. **Nature**. v. 182, p. 64-65, 1958

HAECKEL, E. **ANTHROPOGENIE**. Leipzig:Ed. Engelmann, 1874, p. -----

HAECKEL, E. **THE EVOLUTION OF MAN. ANTHROPOGENIE**. Akron: 3rd Ed Werner Company. 1876a, p. -----

HAECKEL, E. 1876b. **THE HISTORY OF CREATION NATURLICHE SCHOPFUNGSGESCHICHTE**. 3ed, New York: Ed. Werner Company. 1876b, p. -----

HAGEY, D.W. MUHR, J. Sox2 Acts in a Dose-Dependent Fashion to Regulate Proliferation of Cortical Progenitors. **Cell Reports**. v.9, n.5, p.1908–1920, 2014

HARDIN, J. The cellular basis of sea urchin gastrulation. In: PEDERSEN, R.A. SCHATTE, G.P. **CURRENT TOPICS IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY**. San Diego: Academic Press Inc, 1996, vol.33, chap.4, p.161-163

HEFFERAN, M.P. GALIK, J. KAKINOHANA, O. SEKERKOVA, G. SANTUCCI, C. MARSALA, S. NAVARRO, R. HRUSKA-PLOCHAN, M. JOHE, K. FELDMAN, E. CLEVELAND, D.W. MARSALA, M. Human neural stem cell replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis by spinal transplantation. **PloS One**. V.7, n. 8, p. , 2012

HERNANDEZ-MIRANDA, L.R. CARIBONI, A. FAUX, C. RUHRBERG, C. CHO, J.H. CLOUTIER, J. EICKHOLT, B.J. PARNAVELAS, J.G. ANDREWS, W.D. Robo1 Regulates Semaphorin Signaling to Guide the Migration of Cortical Interneurons through the Ventral Forebrain. **The Journal of Neuroscience**. v.31, n.16, p. 6174–6187, 2011

HERNANDEZ-MIRANDA, L.R. PARNAVELAS, J.G. CHIARA, F. Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. **ASN NEURO**. v.2, n.2, p. 76-86, 2010

HIRATA, H. YOSHIURA, S. OHTSUKA, T. BESSHO, Y. HARADA, T. YOSHIKAWA, K. KAGEYAMA, R. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. **Science**. v. 298, n.5594, p.840-843, 2002

HORMOZDIARI, F. PENN, O. BORENSTEIN, E. EICHLER, E. E. The discovery of integrated gene networks for autism and related disorders. **Genome Research**. v. 25, p. 142-152, 2015.

HUTTON, S.R. PEVNY, L.H. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. **Developmental Biology**. v.352, n.1, p. 40-47, 2011

IMAYOSHI, I SAKAMOTO, M YAMAGUCHI, M MORI, K KAGEYAMA, R Essential Roles of Notch Signaling in Maintenance of Neural Stem Cells in Developing and Adult Brains. **Journal of Neuroscience**. v.30, n.9, p. 3489-3498, 2010

IMAYOSHI, I. SHIMOJO, H. SAKAMOTO, M. OHTSUKA, T. KAGEYAMA, R. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. **Cellular and Molecular Life Science**. v.70, n.12, p.2045-2057, 2013

KAGEYAMA R, SHIMOJO H, IMAYOSHI I. Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development. **Cellular and Tissue Research**. v.359, n.1, p.125-133, 2015

KANDEL, E; SCHWARTZ JH; JESSELL, TM; SIEGELBAUM, SA; HUDSPETH, AJ. O Desenvolvimento e o surgimento do comportamento. **PRINCÍPIOS DE NEUROCIÊNCIAS**. 5Ed. Porto Alegre. Ed. MacGraw Hill. 2014, chap. 8, p. 1011-1054

KIM, B.G. KANG, Y.M. PHI, J.H. KIM, Y.H. HWANG, D.H. CHOI, J.Y. RYU, S. ELASTAL, A.E. PAEK, S.H. WANG, K.C. LEE, S.H. KIM, S.U. YOON, B.W. Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. **Cytotherapy**. V.12, n.6, p. 841-845. 2010

KUMAR, S. DUESTER, G. Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing FGF8 transcription. **Development**. v. 141 n. 15, p. 2972-2977, 2014

KUWABARA T, HSIEH J, MUOTRI A, YEO G, WARASHINA M, LIE DC, MOORE L, NAKASHIMA K, ASASHIMA M, GAGE FH. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**. v.12, n.9, p. 1097-1105, 2009

LEVISON, S.W. GOLDMAN, J.E. Cellular heterogeneity of the neonatal SVZ and its contributions to forebrain neurogenesis and gliogenesis. In: LEVISON, S.W. **MAMMALIAN SUBVENTRICULAR ZONES: THEIR ROLES IN BRAIN DEVELOPMENT, CELL REPLACEMENT, AND DISEASE**. New York:Springer, 2006, chap.1, p.1-29

LIM, D.A., TRAMONTIN,A.D. ,TREVEJO,J.M. ,HERRERA,D.G GARCÍA-VERDUGO, J.M., ALVAREZ-BUYLLA,A. Noggin antagonizes BMP signaling to create niche for adult neurogenesis. **Neuron**. v.28, p.713–726, 2000

LIM, JH. KOH, S. OLBY, NJ. PIEDRAHITA, J. MARIANI, CL. Isolation and characterization of neural progenitor cells from adult canine brains. **American Journal of Veterinary Research**. v.73, n.12, p.1963-1968, 2012.

LOWE, A. DALTON, M. SIDHU, K. SACHDEY, P. REYNOLDS, B. VALENZUELA, M. Neurogenesis and precursor cell differences in the dorsal and ventral adult canine hippocampus. **Neuroscience Letter**. v.593, p.107-113, 2015.

LUSKIN, M.B. ZIGOVA, T. BETARBET,R. SOTERES, B.J. Characterization of neuronal progenitor cells of the neonatal forebrain. In: GAGE, F.H; RAY, J.; FISHER, L.J. ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND USE OF STEM CELLS FROM THE CNS. **Annual Review of Neuroscience**. v.18, n.7, p.67-86, 1995

MAEBLE, A. Ambiguous Cells: The Emergence of the Stem Cell Concept in the Nineteenth and Twentieth Centuries. **Notes and Records of the Royal Society**. v. 65, n.4, p.359–378, 2011

MAINSCHIN, J. The Origins of Entwicklungsmechanik. In: GILBERT, S.F. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY. A CONCEPTUAL HISTORY OF MODERN EMBRYOLOGY**. New York: Plenum Press, 1991, chap. 3, p.43-59

MALIK, SZ. LEWIS, M. ISAACS, A. HASKINS, M. VAN WINKLE,T. VITE,CH. WATSON, DJ. Identification of the rostral migratory stream in the canine and feline brain. **Plos One**. v.7, n.5, p.xx-xx, 2012.

MARIE, S.K.N. OBA-SHINJO, S.M. Celulas-tronco no sistema nervoso central: Potencial terapêutico. In: ZAGO, M. A. **CÉLULAS–TRONCO, A NOVA FRONTEIRA DA MEDICINA**. São Paulo: Editora Atheneus, 2006, chap. 11, p.145-157

MAXIMOW, A. ----- . **Anat. Anz**. s.32, p. 65–72, 1908

MILWARD, E.A; LUNDBERG, C.G; GE, B; , LIPSITZ, D; ZHAO, M; DUNCAN, I.D. Isolation and transplantation of multipotential populations of epidermal growth factor responsive, neural progenitor cells from the canine brain. **Journal of Neuroscience Research**. v.50, p.862–871, 1997

MONTIEL, J.F. VASISTHA, N.A. GARCIA-MORENO, F. MOLNÁR, Z. From sauropsids to mammals and back: New approaches to comparative cortical development. **Journal of Comparative Neurology**. v.524, n.3, p.630-645, 2016

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH-DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. US. 2001. p. 1-3

NOTTEBOHM, F. Neuronal replacement in adulthood. **Annals of the New York Academics of Science**. v.457, p.143–161, 1985

OHTAKA-MARUYAMA, C. OKADO, H. Molecular pathways underlying projection neuron production and migration during cerebral cortical development. **Frontiers in Neuroscience**. v.9, n.447, p.1-24, 2015

OPPENHEIMER, J. Curt Herbst's contributions to the concept of embryonic induction. In: GILBERT, S.F. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY. A CONCEPTUAL HISTORY OF MODERN EMBRYOLOGY**. New York: Plenum Press, 1991, chap. 4, p.63-89

PAGANO, S.F; IMPAGNATIELLO, F; GIRELLI, M; COVA, L; GRIONI, E; ONOFRI, M; CAVALLARO, M; ETTERI, S; VITELLO, FRANCESCO; GIOMBINI, S; SOLERO, C; PARATI, E. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. **Stem Cells**.v.18, p. 295–300, 2000

PALMA, V. LIM, D.A. DAHMANE, N. SÁNCHEZ, P. BRIONNE, T.C. HERZBERG, C.D. GITTON, Y. CARLETON, A. ALVAREZ-BUYLLA, A. RUIZ, I. ALTABA, A. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. **Development**. v.132, n.2, p. 335-344, 2005

PALMA, V. RUIZ, I. ALTABA, A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. **Development**. v.131, n.2, p.337-345, 2004

PALMER, T.D. RAY, J. GAGE, F.H. FGF-2-Responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of adult rodent brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v.6, p. 474-486, 1995

PALMER, T.D; TAKAHASHI, J; GAGE, F.H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v.8, p. 389–404, 1997

PAPPENHEIM, A. ----- **Fol. Haematol**. v.5, p. 511–524, 1908a

PAPPENHEIM, A. ----- **Fol. Haematol**. v.6, p. 217–242, 1908b

PURVES, D; AUGUSTINE, G.J; FITZPATRICK, D; HALL, W.C; LAMANTIA, A.S; MCNAMARA, J.O; WHITE, S. STUDYING THE NERVOUS SYSTEMS OF HUMANS AND OTHER ANIMALS. In: ----- **Neuroscience**. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2012, chap. 1, p 1-26

RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION. Japan – US Research Organization.
[Http://www.rerf.jp/intro/index_e.html](http://www.rerf.jp/intro/index_e.html)

RAMALHO-SANTOS, M. WILLENBRING, H. On the origin of the term “stem cell” **Cell. Stem Cell**. v.1, p.35–38, 2007

RAMON Y CAJAL, S; DEFELIPE, J; JONES, EG; MAY, RM. Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system. **History of Neuroscience**. New York:Oxford University press. 1991, p. -----

RASH, B.G. LIM, D.H. BREUNIG, J.J. VACCARINO, F.M. Fgf signaling expands embryonic cortical surface area by regulating notch-dependent neurogenesis. **Journal of Neuroscience**. v. 31, n. 43, p.15604-15617, 2011

REYNOLDS BA, WEISS S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. **Developmental Biology**. 175:1–13, 1996

REYNOLDS, BA. WEISS, S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. **Reports**. p.1707-1709, 1997

REYNOLDS BA, RIETZE RL. Neural stem cells and neurospheres—re-evaluating the relationship. **Nature Methods**. v.2, p. 333–336, 2005

REZENDE, L. **CHRONOLOGY OF SCIENCES**. New York: Facts on File, 2006, chap. 5, p. 141-196

ROTH, G. DICKE, U. Evolution of the brain and intelligence. **Trends in Cognitive Sciences**. v.9, n.5, p.250–257, 2005

RICHARDS, L.J. KILPATRICK, T. J. BARTLETT, P.F. MURPHY, M. Leukemia Inhibitory Factor Promotes the Neuronal Development of Spinal Cord Precursors From the Neural Tube. **Journal of Neuroscience Research**. v. 33, p.476-484, 1992

SAHA, M. Spemann seen through a lens. In: GILBERT, S.F. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY**. New York: Plenum Press. 1991, chap. 5, p.91-108

SASAI, Y. LU, B. STEINBEISSER, H. DE ROBERTIS, E.M. Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. **Nature**. v.376, n.6538, p.333-336, 1995

SCHOENHERR, C.J. ANDERSON, D.J. NRSF: A coordinate repressor of neuron-specific genes expressed in CNS neural progenitors cells. In: GAGE, F.H; RAY, J.; FISHER, L.J. Isolation, Characterization, and use of Stem Cells from the CNS. **Annual Review of Neuroscience**. v.18, n.7, p.9-28, 1995

SHIMOJO, H. OHTSUKA, T. KAGEYAMA, R. Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. **Frontiers on Neuroscience**. v.5, n.78, doi: 10.3389/fnins.2011.00078, 2011

SMITH, A. A glossary for stem-cell biology. **Nature**. v. 441, p. 1060, 2006

SMITH, W.C. HARLAND, R.M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. **Cell**. v. 70, n.5, p. 829-840, 1992

SPEMANN H, MANGOLD H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. **Roux's Archiv fur Entwicklungsmechanik**. Mech. v.100, p. 599–638, 1924

STARR P. **THE SOCIAL TRANSFORMATION OF AMERICAN MEDICINE**. New York: Basic Books Inc. 1982. p. -----

STECKEL, R. H. Working paper series Health and nutrition in the preindustrial era: Insights from a millennium of average heights in Northern Europe. Working Paper 8542 **National Bureau of Economic Research**. p. -----, 2001

STECKEL, R.H. NBER Working paper series on historical factors in long run growth industrialization and health in historical perspective. Historical Paper 118. **National Bureau of Economic Research**. p -----, 1999

SUN, Y. HU, J. ZHOU, L. POLLARD, S.M. SMITH, A. Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells. **Journal of Cell Science**. v.124, n.11, p.1867-1877, 2011

TAKAHASHI, K. YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**. v.126, n.4, p.663–676, 2006

TANG, M. VILLAESCUSA, J.C. LUO, S.X. GUITARTE, C. LEI, S. MIYAMOTO, Y. TAKETO, M.M. ARENAS, E. HUANG, E.J. Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. **Journal of Neuroscience**. v.7, n.30, s.27, p.9280-9291, 2010

TILL, J.E. MCCULLOUGH, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Research**. v.14, p. 213-222, 1961

TWAROG, S. Heights and Living Standards in Germany, 1850-1939: The Case of Wurttemberg. In: STECKEL, R.H. FLOUD, R. HEALTH AND WELFARE DURING INDUSTRIALIZATION. **National Bureau of Economic Research**. p. 285-330, 1997

URBÁN, N. GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v.8, n.396, p.1-19, 2014

VARELA-NALLAR, L. INESTROSA, NC. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. **Frontiers on Cellular Neuroscience**. v.7, n.100, doi: 10.3389/fncel.2013.00100, 2013

WAI, H.A. KAWAKAMI, K. WADA, H. MÜLLER, F. VERNALLIS, A.B. BROWN, G. JOHNSON, W.E. The development and growth of tissues derived from cranial neural crest and primitive mesoderm is dependent on the ligation status of retinoic acid receptor γ : evidence that retinoic acid receptor γ functions to maintain stem/progenitor cells in the absence of retinoic acid. **Stem Cells and Development**. v.15, n.24, s.4, p. 507-519, 2015

WALKER, T. KEMPERMANN, G. Cellular and functional aspects of adult neurogenesis. In: CALEGARI, F. WASKOK, C. Stem cells: From basic research to therapy. **TISSUE HOMEOSTASIS**

AND REGENERATION DURING ADULTHOOD, APPLICATIONS, LEGISLATION AND ETHICS -----

: CRC Press. 2014, part.1, p. 21-65

WALTON, R.M. Postnatal Neurogenesis: Of mice, men and macaques. **Veterinary Pathology**. v.49, p 155-165, 2012

WALTON, RM. PARMENTIER, T. WOLFE, JH. Postnatal neural precursor cell regions in the rostral subventricular zone, hippocampal subgranular zone and cerebellum of the dog (*Canis lupus familiaris*). **Histochemistry Cell Biology**. v.139, n. 3, p. 415-429, 2013.

WALTON, R.M. WOLFE, J.H. In vitro growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. **Journal of Neuroscience Methods**. v.169, p.158–167, 2008

WEISMANN, A. **THE GERM-PLASM A THEORY OF HEREDITY**. New York: Ed. Scholarly Publishing. 1893, chap. 1, p. 37-91

WEISSMAN, I. L. Stem cells: The lessons from hematopoieses. In: GAGE, F.H. CHRISTEN, Y. **ISOLATION, CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF CNS STEM CELLS**. Heidelberg: Ed. Springer, 1997, chap. 1, p. 1-8

WILMUT, I. SCHNIEKE, A.E. MCWHIR, J. KIND, A.J. CAMPBELL, K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. v. 385, p. 810-813, 1997

ZAGO, M. A. Terapia celular, transplantes de células, de tecidos ou de órgãos. In: -----
-. **CÉLULAS–TRONCO, A NOVA FRONTEIRA DA MEDICINA**. São Paulo: Ed. Atheneus, 2006, chap. 8, p.109-113

ANEXO

1. Protocolo para o isolamento e cultivo de precursores (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ)
2. Diferenciação dos precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ)

1. PROTOCOLO PARA O ISOLAMENTO E CULTIVO DE PRECURSORES (NPCS) DA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ) E A ZONA SUBGRANULAR (SGZ)

1. Protocolo para o isolamento e cultivo de precursores (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ)¹⁷

O protocolo abaixo descreve o isolamento, dissociação, purificação, contagem e cultivo primário segundo o método de Reynolds et Weiss, (1997) e Reynolds et Rietze, (2005) (Figura 21).

Os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ da UNESP de Botucatu; de acordo com as diretrizes do Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal (No 90-2015).

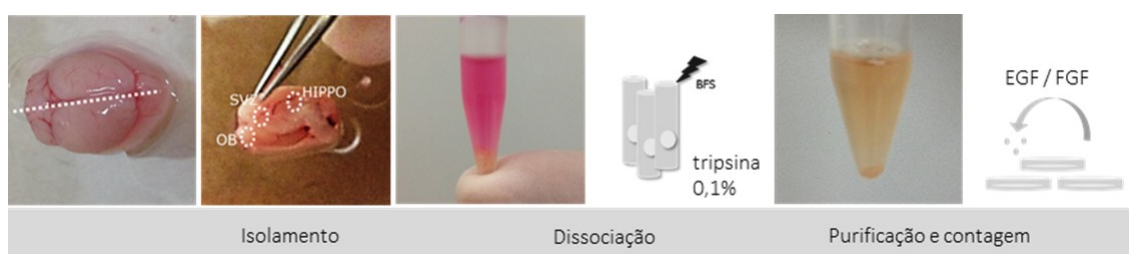


Figura 21. Diagrama da sequência de isolamento e cultivo dos precursores neurais (NPCs) de camundongos.

Material

- Tesouras cirúrgicas
- Pinças para dissecação
- Lâmina de bisturi
- Etanol 70%
- Placa de Petri 35 mm
- Microtubo 1,5 ml
- Tubo Falcon 15 ml
- Tripsina 0,1%
- Soro Fetal Bovino
- Filtro estéril 70 um
- Meio para cultivo DMEM/F12 alta glicose
- Meio completo (DMEM/F12 alta glicose, 1% L-glutamina, 2% suplemento B27, 1% penicilina/anfotericina, 0,01% amicacina, 5ng/ml heparina e 20ng/ml EGF Fator de Crescimento Epidermal /bFGF Fator de Crescimento Fibroblástico Básico)
- Placa de cultura T75 recoberta com *Poly-Hema*
- Centrífuga

¹⁷ Protocolo adaptado de Delgado-Garcia et al, (2015a, 2015b)

- Câmara de Neubauer
- Câmara de fluxo laminar
- Microscópio

Preparação

1. Os elementos de disseção (tesouras, pinças e lâmina de bisturi) foram esterilizados em etanol 70% durante 20 minutos.

Isolamento

2. Foram usados 4 camundongos por cultivo, de faixa etária imatura P21 (dia pós-natal 21), sem distinção de sexo.
3. Após eutanásia, os encéfalos foram dissecados e acondicionados em placas de Petri contendo DMEM/F12 alta glicose.
4. Em uma nova placa foi realizada a separação da SVZ e a SGZ. Para isso, os hemisférios foram separados e com auxílio de uma lâmina de bisturi e de pinças a zona subventricular e o hipocampo dissecados. Cada amostra foi armazenada em microtubo contendo 1 ml de DMEM/F12 e levada para a câmara de fluxo laminar.

Dissociação

5. Para a dissociação cada amostra foi transferida a tubo de 15 ml.
6. O meio foi retirado e adicionado 1 ml de tripsina 0,1%, as amostras foram incubadas em banho-maria durante 5 minuto a 37°C.
7. Após esse período, a ação enzimática da tripsina foi inativada com a adição de 1 ml de Soro Fetal Bovino.
8. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos.
9. Posteriormente, o sobrenadante de cada amostra foi removido e adicionado 1 ml DMEM/F12 para ser novamente homogeneizado por trituração sucessiva com ponteiros de 1000 µl e 200 µl até obter uma suspensão simples.

Purificação

10. Para a retirada do tecido fibroso na intenção de evitar a contaminação do cultivo, as amostras foram purificadas com filtro estéril de 70 μm .

Contagem

11. De cada amostra foi separada uma alíquota de 10 μl para contagem em câmara de Neubauer usando a formula, células/ml= $X \times 10^4 \times K$, onde X é a média da contagem nos quatro quadrantes e K é o fator de diluição= 10.

Cultivo primário

12. Cada amostra foi suspendida em 10 ml de médio completo e transferida em concentração de 2×10^4 células/ cm^2 em placa de cultura T75 recoberta com *Poly-Hema*. Uma semana depois foram acrescentados 5 ml de médio completo, e posteriormente, a cada três ou quatro dias, foi trocada a metade do médio de cultivo até obter a formação de neuroesferas. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, 95% umidade e 5% de CO_2 .

Resultados esperados

Foram isoladas populações de células da SVZ e SGZ de camundongos P21. Durante as primeiras 24 horas (1 *Dia In Vitro* DIV) se observou grande quantidade de morte celular.

Após uma semana de cultivo (5-7DIV) foram observados em todos os cultivos dois tipos principais de células, células individuais com contornos regulares e refringentes e células organizadas em neuroesferas ou massas celulares circulares, de tamanhos variáveis e superfície irregular, ambas não aderente à superfície do frasco (Figura 21a).

Após quatro semanas de cultivo (25-30DIV) se observam neuroesferas em suspensão entre 50- 80 μm de diâmetro em ambos cultivos (Figura 21, tabela 1). A

comparação entre as medias do diâmetro mostrou que as neuroesferas da SVZ são de maior tamanho (tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva do diâmetro das neuroesferas

Diâmetro (um)	n	Media	SD	Mediana	p (<0,05)
SVZ	108	62,78	14,72	58,11	***
SGZ	84	52,97	14,97	48,06	

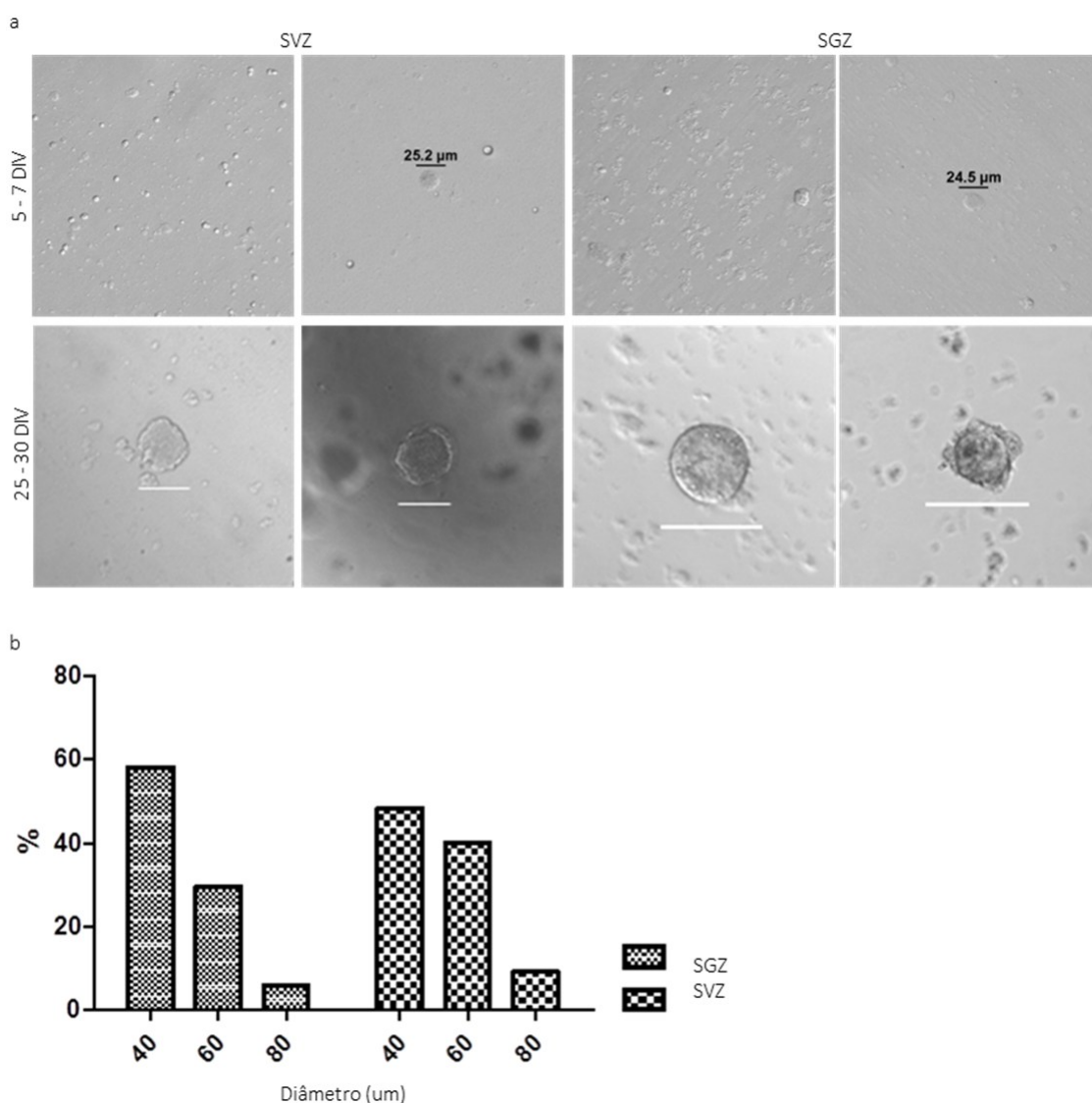


Figura 22. Morfologia dos cultivos dos precursores neurais (NPCs) de camundongos. (a) Células individuais com contornos regulares e refringentes e células organizadas em neuroesferas (5-7 DIV), após quatro semanas se observam neuroesferas entre 50 – 80 um de diâmetro (25-30 DIV). (b) Análises de frequência do diâmetro das neuroesferas da SVZ e SGZ. Barra 100 μ m

2. DIFERENCIAÇÃO DOS PRECURSORES NEURAIIS (NPCS) DA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ) E A ZONA SUBGRANULAR (SGZ)

2. Diferenciação dos precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ)

Foram comparados alguns aspectos celulares da diferenciação espontânea *in vitro* da SVZ e a SGZ de camundongos. Usando o protocolo para isolamento e cultivo dos NPCs, as células foram isoladas e cultivadas, após uma semana foram diferenciadas em meio de cultivo sem fatores de crescimento. A diferenciação foi avaliada pela análise da morfologia e a marcação por imunofluorescência. Foram usados marcadores para NPCs e células neuronais imaturas (Quadro 3).

Quadro 3. Anticorpos no experimento de diferenciação de precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ)		
Anticorpo	Diluição	Descrição
<i>rabbit anti-GFAP</i>	1:1000	NPCs e astrôcitos
<i>guinea pig anti rat-DCX</i>	1:500	Neuroblasto migratório
<i>Alexa fluor 594, goat anti-rabbit IgG</i>	1:1000	Anticorpo secundário
<i>Alexa fluor 488, goat anti-rat</i>	1:500	Anticorpo secundário
<i>Dapi</i>	1:10000	Marcador de núcleo

Resultados

As células tiveram morfologia característica para NPCs (GFAP) e células neuronais imaturas ou neuroblastos (DCX). As células imaturas GFAP foram pequenas, redondeadas ou bipolares e com padrão de marcação difuso, já as células GFAP maduras tiveram um padrão filamentoso e com múltiplos processos. Células neuronais imaturas DCX foram de tamanho variável, bipolares ou unipolares (Figura 22a).

As células da SVZ e a SGZ tiveram marcação positiva para proteínas de NPCs como GFAP e de células neuronais imaturas como DCX. Na análise da fluorescência normalizada, se encontrou marcação variável de GFAP e DCX nas populações avaliadas (n=4; em cada população se mediu a fluorescência normalizada de 25-30 células) (Figura 22b, Tabela 2, 3).

Devido às grandes diferenças dos valores de fluorescência normalizada para as marcações entre as células em uma mesma população, não se encontrou uma diferença na comparação entre as medias nos valores dos marcadores. Embora, se sugere uma

tendência de valores maiores de fluorescência normalizada da marcação DCX em células da SVZ (Tabela 4). Os resultados demonstram que a diferenciação *in vitro* é similar para SVZ e SGZ, embora a SVZ poderia ter uma melhor resposta *in vitro* para produção de células neuronais imaturas DCX.

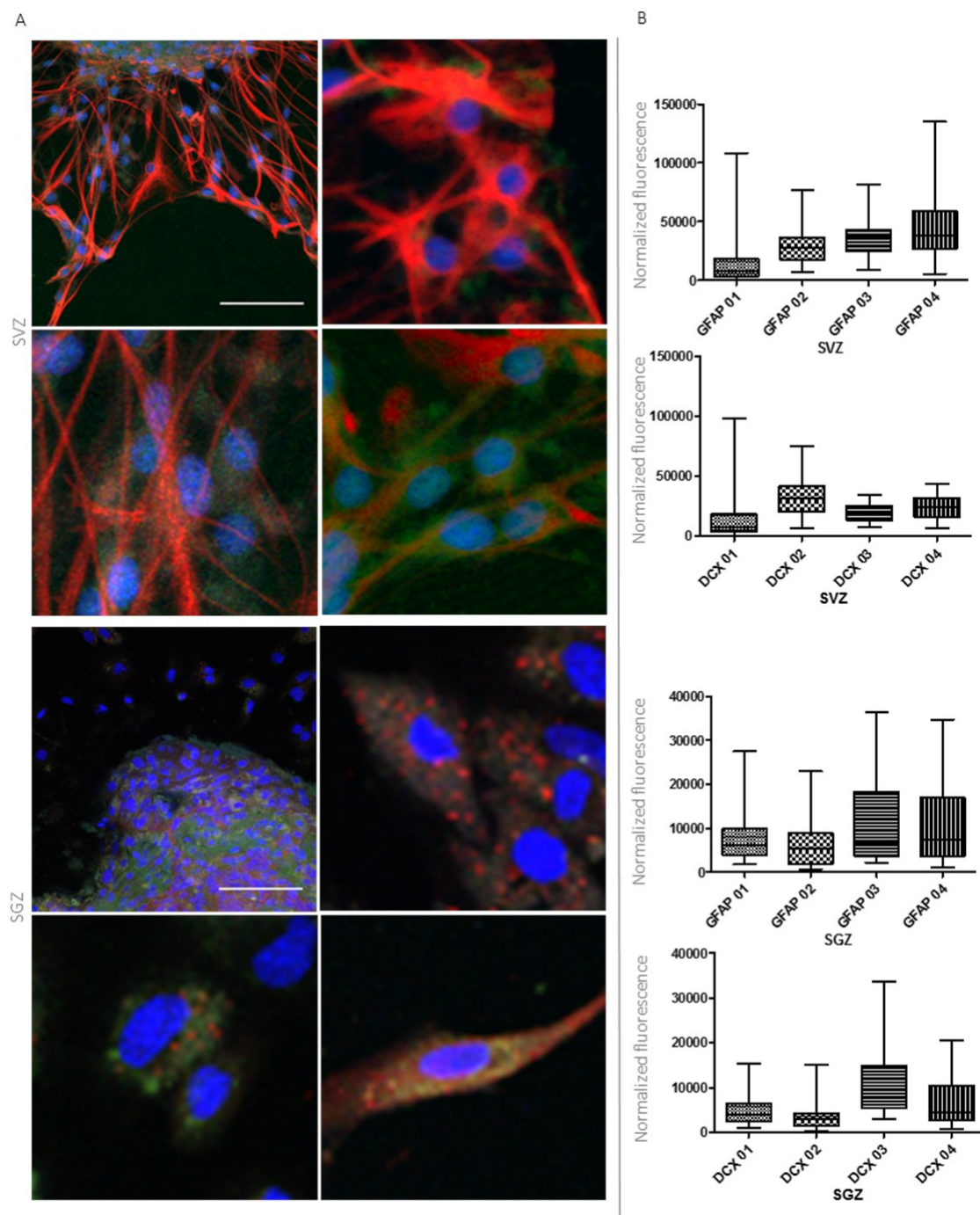


Figura 22. Diferenciação dos precursores neurais (NPCs) da zona subventricular (SVZ) e a zona subgranular (SGZ). (a) Expressão de GFAP e DCX, imagens representativas. As neuroesferas tiveram marcação positiva para GFAP e DCX. Células GFAP imaturas são pequenas, redondeadas e com marcação difusa. Células GFAP maduras apresentam um padrão de marcação filamentoso e com múltiplos processos. Células DCX imaturas tiveram forma unipolar ou bipolar. (b) Os gráficos da fluorescência normalizada ou intensidade da fluorescência integrada foram construídos de acordo aos marcadores para NPCs e células imaturas em quatro populações (n=4). A fluorescência normalizada de uma célula foi medida segundo o plano médio de brilho da série Z. Existiu uma

proporção similar de marcação para NPCs (GFAP) e células imaturas (DCX). Em cada população foram medidas de 25 a 30 células. As barras de erro denotam a SD. O núcleo foi marcado com DAPI. Barra 20µm.

Tabela 2. Estatística descritiva da fluorescência normalizada dos marcadores para diferenciação de precursores neurais (NPCs) e células imaturas da zona subventricular (SVZ)

Fluorescência normalizada		N1	N2	N3	N4
GFAP	n	30	30	30	30
	Media	13169	28722	35848	48973
	Mediana	7301	27317	37374	37981
	SD	15361	15160	16632	32565
DCX	n	30	30	30	30
	Media	14748	32541	19481	23715
	Mediana	7788	31170	18746	23894
	SD	1665	1426	1414	1795

Tabela 3. Estatística descritiva da fluorescência normalizada dos marcadores para diferenciação de precursores neurais (NPCs) e células imaturas da zona subgranular (SGZ)

Fluorescência normalizada		N1	N2	N3	N4
GFAP	n	30	30	30	30
	Media	7553	23363	10662	9992
	Mediana	5304	20590	6588	7241
	SD	580,4	1483	1805	1586
DCX	n	30	30	30	30
	Media	6552	22691	10887	6478
	Mediana	4620	20225	7997	4418
	SD	5786	16815	1356	954,8

Tabela 4. Estatística descritiva da fluorescência normalizada dos marcadores para diferenciação de precursores neurais (NPCs) e células imaturas

Fluorescência normalizada		n	Media	SD	Mediana	p (<0,05)
SVZ						
	GFAP	120	31678	14920	32285	ND
	DCX	120	22621	7560	21598	
SGZ						
	GFAP	120	12893	7107	10327	ND
	DCX	120	11652	7643	8720	

ND No differences