

CÉLULAS ESTAMINAIS NO CÉREBRO ADULTO DE MAMÍFERO

Pedro Miguel Castro*, Tiago Coelho**, J. Soares Fortunato***

Resumo

O sistema nervoso adulto dos mamíferos, ao contrário do resto dos órgãos do organismo tem sido considerado único na sua aparente incapacidade em repor os neurónios que são lesados. Contudo, em certas regiões do cérebro a neurogénese ocorre no período pós-natal e continua pela idade adulta.

Estudos de precursores neurais, isolados do cérebro embrionário, indicam que muitos subgrupos de células sofrem mitose e subsequente diferenciação em neurónios e glia in vitro. Diversas substâncias, como Factores de Crescimento e substratos moleculares, são essenciais para estes processos e também para a restrição de linhagens e diferenciação terminal dessas células.

Existe forte evidência de que células multipotenciais (células estaminais) e células de linhagens restritas (neuroblastos e glioblastos) residem no cérebro adulto de mamífero e que podem ser mantidas ou induzidas para se dividirem e diferenciarem em resposta a muitos factores. Esses locais têm sido apontados como sendo o subepêndima adja-

cente aos ventrículos laterais e a fásia denteada do hipocampo.

Palavras-chave: *Células estaminais cerebrais; Regeneração neuronal; Diferenciação das células estaminais; Factores de regulação.*

INTRODUÇÃO

O organismo humano está em constante mudança. As células diferenciadas não são perenes: acabam por morrer, mas admite-se que muitas são substituídas.

Na defesa contra o desgaste celular, o organismo desenvolveu dois esquemas: (1) divisão mitótica de populações celulares estáveis e (2) divisão de células indiferenciadas – células estaminais – analogamente à genese celular. No primeiro caso, as "células-filhas" são genó e fenotipicamente idênticas às células progenitoras e dele são exemplos o endotélio vascular e os hepatócitos. O protótipo das células estaminais é representado pelas células hematopoiéticas cujas linhagens de desenvolvimento têm origem numa célula fundadora multipotencial. São como um exército de células embrionárias, propositadamente esquecidas durante o processo de desenvolvimento, prontas a actuar, promovendo a regeneração celular, de forma a manterem um número constante de células diferenciadas, particularmente em tecidos susceptíveis a lesões, doença ou morte celular natural.

* Aluno da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP).

** Monitor de Fisiologia da FMUP.

*** Regente de Fisiologia da FMUP.

Existem células estaminais distribuídas pelos vários folhetos embrionários: na ectoderme (e.g., células estaminais epidérmicas), mesoderme (e.g., célula estaminal hematopoiética) e endoderme (e.g., criptas intestinais)⁽¹⁾.

Recentemente surgiram os primeiros indícios de células estaminais neurais (CEN) no cérebro de mamífero⁽²⁾. Este facto revelou-se de especial interesse dado que, não há muito tempo, considerava-se CEN como uma entidade histológica rígida, imutável, sem renovação celular. Desde então os trabalhos têm-se multiplicado na tentativa de isolar a população celular que reúna as características que a permite definir como células estaminais.

A célula que se procura individualizar define-se por (a) não se encontrar no estágio final de diferenciação, (b) apresentar capacidade de se auto-renovar e (c) dar origem, por divisão mitótica, aos vários tipos celulares conhecidos do SNC.

Este trabalho pretende resumir os realizados na busca da célula estaminal do cérebro adulto de mamífero, o seu isolamento, contagem e localização assim como a caracterização das mesmas e da descendência progenitora. Será ainda feita referência aos factores intrínsecos e extrínsecos que regulam o seu desenvolvimento e à sua dinâmica proliferativa.

CONTEXTO HISTÓRICO

Desde o começo da neurociência moderna, no final do século XIX, que o SNC do mamífero era tido como tecido estruturalmente estável após o nascimento e assim permanecia no estado adulto.

Estudos com [³H]-timidina, mostravam a existência de células em divisão. Altman (1962, 1963, 1966, 1967, 1969) e Altman e Das (1965, 1966) referiram a existência de novos neurónios numa variedade de estruturas de cobaia, incluindo o bolbo olfactivo, hipocampo e córtex cerebral. Quinze anos volvidos, Kaplan examina a ultraestrutura dessas células, confirmando as suspeitas (Kaplan e Hind, 1977). No cérebro adulto, alguma glia pode ser fonte de neurónios e alguns progenitores podem gerar progenitores neuronais e gliais (Alvarez-Buylla e col., 2001). Trabalhos recentes evidenciam que os neurónios granulares do hipocampo originam-se de células glia-like. Nos anos 90, com a introdução de técnicas de imunocitoquímica usando marcadores celulares específicos, o uso de BrdU como marcador de células proliferativas *in vivo* e contagens estereológicas estabeleceram definitivamente a neurogênese no roedor.

Na base da neurogênese e gliogênese propôs-se a existência de CEN. Os primeiros estudos conseguiram isolar células embrionárias "CEN-like" (Temple, 1989; Reynolds e col., 1992). Estudos posteriores evidenciaram, entretanto, actividade mitótica no subepêndima adjacente aos ventrículos laterais do cérebro adulto (Smart, 1961). Lois e Alvarez (1993) mostraram que essas células expandiam em cultura, dando origem a neurónios e glia e, no ano seguinte, verificaram que os neurónios migravam para o bolbo olfactivo. Assim, o processo que começava no período neonatal persiste no adulto (Luskin, 1993). Reynolds e Weiss (1992) verificaram que uma determinada célula que proliferava mediante o Factor de Crescimento Epidérmico – EGF, apresen-

tava o papel de regenerar a população suprendimária.

Estes estudos vieram confirmar a existência de CEN no cérebro adulto do mamífero.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CÉLULAS ESTAMINAIS – NOMENCLATURA

Desde os trabalhos realizados por Anderson (1989) que a nomenclatura das CEN, na altura adaptada a partir da já existente para as células hematopoiéticas, se revelou ineficaz e, por isso, discrepante nos vários trabalhos publicados.

Os trabalhos mais recentes definem célula estaminal como uma célula com capacidade de auto-renovação, persistindo na vida adulta, e que nunca se diferenciará completamente⁽³⁾. Possui potencialmente duas vias possíveis de divisão mitótica: (a) simétrica, dando origem a duas células igualmente indiferenciadas, isto é, duas células estaminais e (b) assimétrica em que uma das células-filhas é uma célula estaminal que renova a já existente e a outra é uma célula progenitora orientada para a diferenciação terminal num neurónio ou glia⁽⁴⁾.

O termo célula reprecursora é um termo ambíguo (o que de certo modo reflecte a difícil caracterização celular dos tecidos neurogénicos na CEN) que normalmente engloba o grupo de células estaminais e progenitoras⁽⁴⁾.

Assim, a CEN pode ser definida como possuindo capacidades de (1) proliferação, (2) auto-renovação durante toda a vida, (3) dar origem a células progenitoras que desenvolvam linhagens de todos os tipos celu-

lares presentes no tecido nervoso cerebral e apenas estes e, (4) grande capacidade de resposta a lesão ou traumatismo^(3,4).

LINHAGENS DAS CEN

A intensa investigação no campo das CEN tem suscitado interessantes questões sobre as linhagens de células que estão na origem das células nervosas e qual será a posição que a CEN ocupa no panorama geral das células estaminais.

É objectivo deste trabalho apresentar dados relativos a esses avanços, o que será abordado nos vários subtítulos seguintes.

A Figura 1 mostra a visão clássica dessa linhagem que se baseia sobretudo em estudos *in vitro* de proliferação em meios enriquecidos com factores mitogénicos. A CEN será uma célula estaminal com as características definidas anteriormente.

Desta, originam-se uma linha neuroblástica e outra glioblástica.

Os glioblastos são o oligodendroblástico-astrocitário-2 (O-2A) que gera oligodendrócitos e astrócitos tipo 2 e o glioblasto astrócitário tipo 1, unipotencial. O neuroblasto é uma entidade igualmente unipotencial. No entanto, existe um determinado tipo de célula precursora, o glioblasto tipo N-A que é capaz de gerar tanto neurónios como astrócitos tipo 1.

ESTUDOS *IN VITRO* – AS PRIMEIRAS EVIDÊNCIAS

Um dos primeiros estudos que pareceu isolar uma célula estaminal *in vitro* foi conduzido por Price e col. (1987), que exploraram as características de células em

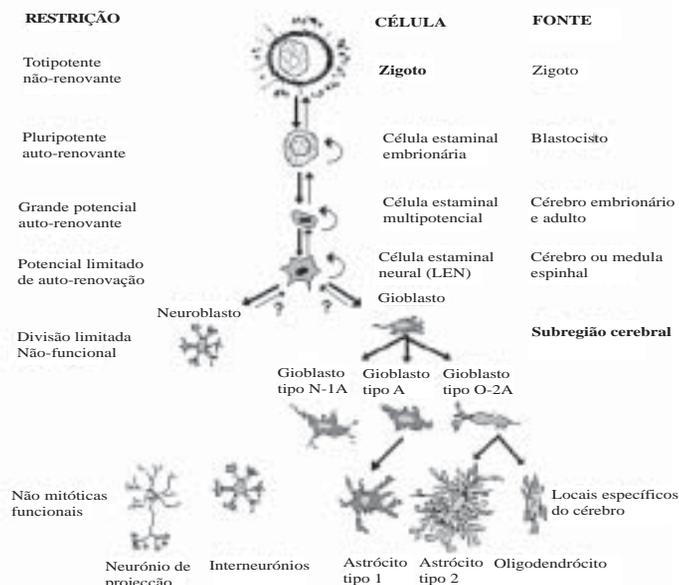


Figura 1 – Linhagem clássica das células estaminais neurais^{adaptado de 6.}

cultura do córtex embrionário, manipuladas para exprimir o gene β -gal. Verificou que a descendência era composta de vários grupos celulares⁽³⁾.

Faltava isolar a CEN. Introduziram-se métodos de microdissecção de zonas do cérebro que reportavam neurogênese *in vivo*, como a zona subependimária e o hipocampo, as quais eram expostas a agentes mitogénicos como o EGF e o FGF

(*Fibroblast Growth Factor*). As células precursoras isoladas do cérebro davam origem a neuroesferas (*neurosphere* – aglomerado de células clones resultantes da divisão de uma célula proliferativa – uma célula estaminal; i.e., *clonal colony-forming unit*) que expressavam apenas nestina (marcador de células estaminais neurais na embriogénese)^(2,3,4). Vários tipos celulares diferenciavam-se a partir destas neuroesferas (quando eram retirados ou modificados os agen-

tes mitogénicos), sendo confirmada a sua identidade com o recurso à imunocitoquímica (Quadro 1).

Desta forma, Reynolds e col. (1992) isolaram uma célula do cérebro em desenvolvimento embrionário tardio que proliferava em resposta ao EGF, dando origem a neurónios do estriado (neurotransmissores – GABA, substância P, metionina-encefalina) e astrócitos⁽⁴⁾. Estudos subse-

QUADRO 1 – MARCADORES IMONUCITOQUÍMICOS USADOS PARA IDENTIFICAR CÉLULAS NEURONAIS E GLIA (ADAPTADO DE GAGE E COL.)³

Marcador antigénico	Tipo celular	Natureza do antígeno
Nestina	CEN	Filamento intermediário
Vimentina	Precursor	Filamento intermediário
NF (L,M,H)	Neurónio	Filamento intermediário
TuJ1	Neurónio	Tubulina – microtúbulo
MAP-2	Neurónio	Proteína associada a microtúbulos
PSA-NCAM	Neurónios	Molécula de adesão celular polissialilada
GFAP	Astrócito	Filamento intermediário
O4	Oligodendrócito	Sulfatídeo

quentes, confirmaram a multipotencialidade da célula "EGF-*responsive*", capaz de se auto-renovar e gerar neurónios, oligodendrócitos e astrócitos pelo que foi considerada uma CEN⁽⁴⁾.

Reynolds e Weiss (1992) isolaram uma célula similar à anterior, mas no cérebro adulto do rato, o que levantou a hipótese da existência de uma célula estaminal no cérebro do adulto que manifestava o seu potencial proliferativo mediante certos mitogénicos⁽²⁾.

ESTUDOS *IN VIVO*. AS PRIMEIRAS EVIDÊNCIAS

A investigação das CEN tem formulado novas hipóteses sobre as linhagens de células estaminais neurais. Na opinião de Weiss e col. (1996) as tentativas *in vivo* de estudar células ainda não isolaram concretamente uma célula estaminal⁽⁴⁾.

Não obstante, os mesmos autores afirmam que uma célula estaminal adulta com identidade com a célula produtora de esferas *in vitro* reside no subepêndima.

A identificação *in vitro* da célula "EGF-*responsive*" é controversa, pelo que a sua correspondência *in vivo* ainda não foi possível. A maioria dos autores sugere que a célula "EGF-*responsive*" corresponde, no subepêndima, a uma célula quiescente astrocitária (tipo B)⁽⁵⁾. No entanto, estudos recentes mostram que o EGF induziu a célula tipo C do subepêndima (ver adiante), mitoticamente activa, para se comportar como célula estaminal⁽⁶⁾. No hipocampo, os dados experimentais ainda são mais obscuros, repartindo-se as opiniões pelos autores que pensam que a CEN é uma célula *glia-like* e outros que defendem apenas a exis-

tência de células precursoras unipotenciais, glioblásticos e neuroblásticos⁽⁶⁾.

ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DAS CENS

Stemple e Anderson (1992) verificaram existir células na crista neural evidenciando carácter multipotencial e capaz de produzir descendência multipotencial, o que lhes confere a propriedade de auto-renovação⁽³⁾. Correspondem a CEN embrionárias que, migrando ao longo de todo o tubo neural, darão origem a todos os tipos celulares do sistema nervoso no adulto.

As primeiras células a evidenciarem-se no processo de desenvolvimento do SNC são as células neuroepiteliais na zona ventricular (VZ) do tubo neural. As células neuroepiteliais são colunares, contactando a superfície ventricular e pial durante o seu ciclo celular⁽⁷⁾ (Fig. 2). Numa primeira fase, proliferativa, sofrem divisão simétrica. A segunda fase caracteriza-se por divisão mitótica assimétrica, dando origem a neuroblastos, em primeiro lugar e, posteriormente, à glia radial. Assim, a neurogênese precede a gliogênese.

Por volta do meio do tempo de gestação, os neurónios recém-formados migram acima da VZ, a glia radial continua a contactar a pia e o ventrículo lateral, ajudando a migração neuronal. Forma-se entretanto uma segunda camada a zona subventricular (SVZ)^{*(1)}. Já em idade pós-na-

* A abreviatura SVZ que deveria definir uma estrutura embrionária é usada por muitos autores como sinónimo de subepêndima. Com efeito e até ao final do trabalho, o termo SVZ será usado para se referir às duas estruturas.

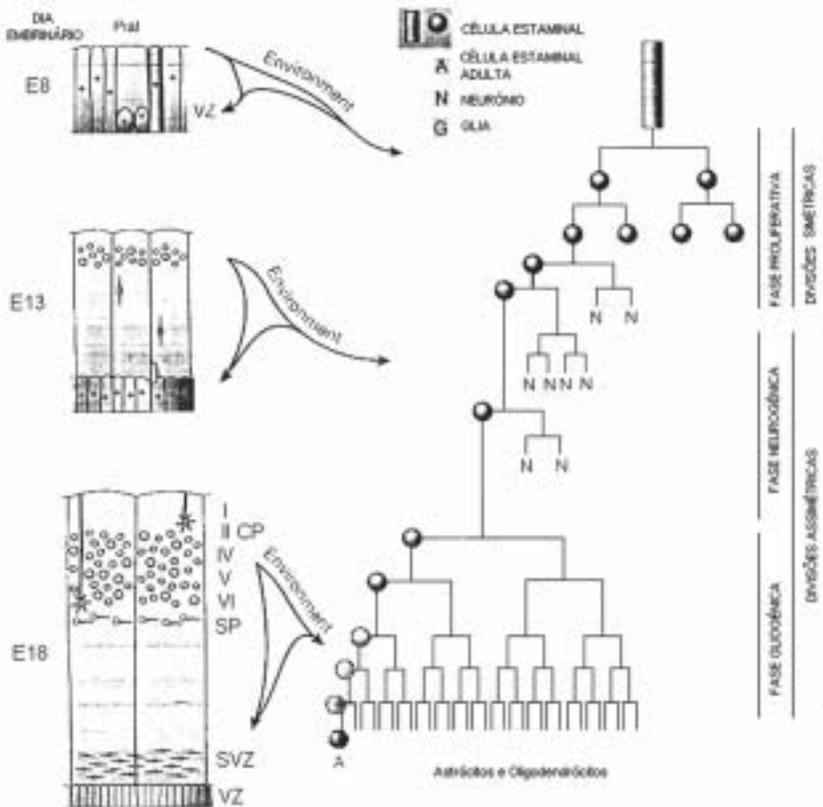


Figura 2 - Desenvolvimento das CEN no SNC de mamífero (Adaptado de Temple⁽⁷⁾). O desenvolvimento das células estaminais pode ser devido à combinação de fatores intrínsecos temporais e sinais extracelulares. Fases do processo histogênico à esquerda. À direita podemos ver que a neurogênese precede a gliogênese.

tal, a glia radial transforma-se em astrócitos e a VZ desaparece, restando dela apenas o epitélio endimário. No entanto, a SVZ permanece no adulto comprimida ao subependíma⁽⁷⁾.

Análises da produção de neuroesferas sugerem que as células estaminais são prevalentes nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário (no tubo neural espinal E8, 50%; no telencéfalo de rato E10 está estimado em 5 a 20%)⁽⁷⁾. O número do CEN declina rapidamente, acompanhada da produção de progenitores res-

tritos e células diferenciadas que destes se originam; por exemplo na espinal medula o número cai de 10% no E8,5 para 1% no dia 1 pós-natal (P1)⁽⁷⁾. Outros estudos confirmam o declínio: apenas 0,3% das células da placa neural anterior E8,5 produzem neuroesferas⁽⁷⁾.

No período pós-natal, a glia radial fica reduzida aos astrócitos da SVZ não tendo sido estudada a sua relação com o hipocampo. A glia radial tem sido interpretada como CEN embrionárias, das quais restará apenas uma pequena percentagem na

SVZ sob a forma de células astrocíticas (tipo B).

LOCALIZAÇÃO DAS CEN NO CÉREBRO ADULTO DE MAMÍFERO

As células da neuroectoderme dão origem a neurónios e glia que constituem o SNC. No período pós-natal, os processos neurogénico e gliogénico terminam quase na totalidade, deixando o SNC sem capacidade de renovação celular. No entanto, estudos têm evidenciado que a divisão celular mantém-se no SNC, embora restrito a locais específicos⁽⁶⁾.

Técnicas de marcação com [³H]timidina (Altman 1962, Sidman 1970, Rakic 1985) e vectores retrovirais (Sanes e col. 1986, Price e col. 1987) têm ajudado na identificação das populações em divisão e respectivos ciclos celulares⁽³⁾. As áreas do SNC que apresentam maior taxa de neurogênese *in vivo* são a (1) SVZ, (2) zona subgranular (SGZ) da circunvolução denteada do hipocampo, (3) zona endimária adjacente ao sistema ventricular e no canal central da espinal medula, (4) bulbo olfativo, (5) córtex cerebral e (6) cerebelo. Estes são os locais onde se tem centrado o estudo das CEN e/ou suas linhagens. No entanto, neurogênese não é, necessariamente, sinónimo da existência de CEN.

A convicção geral é de que as CEN estão presentes, no adulto, apenas nos três primeiros locais⁽⁷⁾. Estudos recentes sugerem que CEN estão presentes no subependíma do sistema ventricular ao longo de todo o neuroeixo. Contudo, parecem ser diferentes populações de células estaminais com fisiologia própria, ao invés de uma população de CEN dispersa por vários locais.

Estudos, ainda mais recentes, vão mais longe ao propôr a exclusão da zona endimária⁽⁸⁾ e possivelmente da própria circunvolução denteada⁽⁹⁾.

CIRCUNVOLUÇÃO DENTEADA DO HIPOCAMPO

O hipocampo é uma das zonas filogeneticamente mais antigas do cérebro.

A circunvolução denteada do hipocampo é uma pequena tira de córtex crenada localizada medialmente ao *cornu ammonis* (hipocampo propriamente dito)⁽¹⁰⁾.

A circunvolução denteada tem uma composição trilaminar – zona subgranular (SGZ), granular e molecular – tendo como tipo celular mais abundante as células granulares da camada granular. São neurónios com dendritos que se estendem para a mesma camada e cujos axónios vão sinaptizar com os neurónios de CA3 do hipocampo⁽¹⁰⁾.

Uma população de células precursoras situada na região basal da SGZ evidencia neurogênese no adulto. Esta é confirmada por estudos de marcação com [³H]timidina em que se verificou a existência de divisão mitótica e maturação neuronal⁽³⁾. Kaplan (1981), adicionando as técnicas de autorradiografia, pôde observar neuroblastos mitóticos, em prófase e telófase, estabelecendo sinapses⁽³⁾.

Que tipo de células são formadas? Utilizando uma marcação como BrdU, 50% das células marcadas diferenciavam-se em neurónios da camada granular e apenas 15% originavam astrócitos. Stanfield e Trice (1988) marcaram as células com [³H]timidina, permitindo a sua maturação

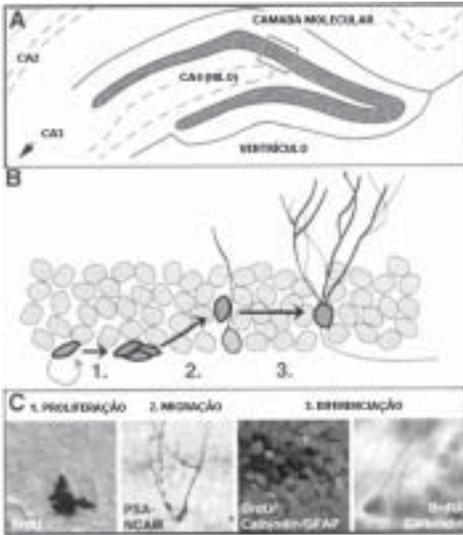


Figura 3 – Migração neuronal na circunvolução dentada do hipocampo. (A) Camada granular do hipocampo ampliada em (B); os números em (B) referem-se às etapas de (C) – proliferação (1), migração (2) e diferenciação (3)²⁴.

ao longo de um mês, e mais tarde injectaram um corante fluorescente em CA3⁽³⁾. Verificaram que as células recém-formadas apresentavam processos axonais corados, confirmando neurónios (Fig. 3)^(3,11).

O facto de, maioritariamente, formar neurónios relacionar-se-á com o facto de o factor mitogénico usado ser o FGF que, como veremos mais adiante, orienta as células precursoras para a linha neuronal. Transplantes de células da SGZ marcadas geneticamente, quando colocadas na mesma camada do cérebro adulto, mostram ser capazes de originar tanto neurónios como glia. Estudos recentes sugerem ainda que, na SGZ do hipocampo, os astrócitos funcionam como precursores primários de neurónios⁽⁶⁾.

O significado da neurogénese na cir-

cunvolução dentada ainda não está decifrado mas especula-se sobre a sua relação com fenómenos de plasticidade neuronal envolvidos na formação de memória⁽³⁾. Verificou-se que os neurónios formados apresentavam uma *Long Term Potentiation* (LTP) mais robusta, não sofrendo o efeito inibitório do GABA^(12,13).

A SGZ da circunvolução dentada contém progenitores de glia e neurónios com capacidade de auto-renovação limitada e são a fonte de neurónios granulares da circunvolução dentada na idade adulta. No entanto, Seaberg e col. (2002) tentam demonstrar que a SGZ contém apenas progenitores restritos⁽⁹⁾.

REGIÃO SUBEPENDIMÁRIA

Como já foi referido anteriormente, as camadas VZ e SVZ são zonas embrionárias de divisão intensa, cuja descendência de progenitores migra radialmente para locais mais afastados, para o parênquima cortical. As células neuroepiteliais, as primeiras a surgir durante o processo de diferenciação, ficam reduzidas, no adulto, a um epitélio cubóide simples ciliado – epêndima. Quando analisada *in vitro*, a proliferação celular apenas origina células endimárias ciliadas⁽⁸⁾. Estas células exprimem GFAP e dividem-se na ausência de Factores de Crescimento exógenos.

As células indiferenciadas da SVZ, derivadas da VZ, continuam a sua proliferação no adulto como zona subependimária, com potencial para formar neurónios e glia^(2,8,14) (Fig. 4).

Desta forma, os remanescentes da zona germinativa embrionária são uma constelação heterogénea de células diferenciadas

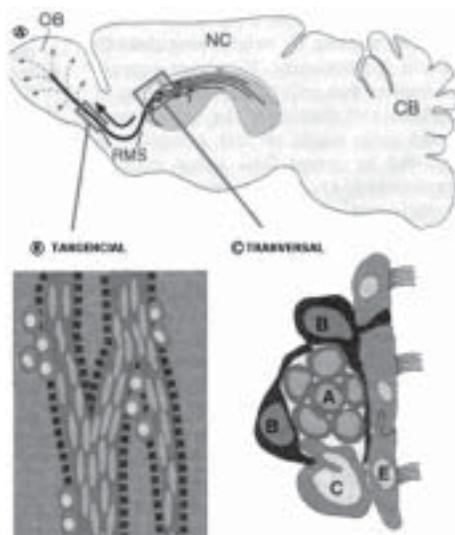


Figura 4 – Esquema da RMS a partir de neuroblastos formados na SVZ. OB, bulbo olfativo; NC, neocórtex; CB, cerebelo. Neuroblastos (tipo A); Astrócitos (tipo B); Células precursoras (tipo C)²³. Células endimárias (E). (B) e (C) representam cortes tangencial e transversal, respectivamente, das zonas indicadas em (A)²³.

e indiferenciadas com várias capacidades proliferativas que se concentram na zona subependimária.

Em última análise, as células endimárias e subependimárias mostram ambas potencial proliferativo, mas apenas as células subependimárias têm características de células estaminais, como já fora demonstrado pela capacidade de se auto-renovarem (gerando neuroesferas secundárias) e a sua capacidade para dar origem tanto a neurónios como a glia^(2,8,14).

No entanto, Johansson e col. (1999) chegam à conclusão contrária, mostrando que a camada endimária, contém células com características de células estaminais⁽¹²⁾. Doetch e col. (1999) mantêm, por seu lado, a posição de que as células neuronais do cérebro residem apenas no

subependima⁽⁶⁾, já que a análise microscópica não evidenciou divisão mitótica nesta região.

Avançam com a hipótese de que as CEN embrionárias da VZ migram para a SVZ, que no adulto corresponderá ao subependima, antes de os restantes progenitores se diferenciarem para dar origem a células endimárias.

ORGANIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ZONA SUBPENDIMÁRIA – POSSÍVEIS CANDIDATOS A CEN

Esta camada existe, no adulto, na parede lateral do ventrículo lateral adjacente ao estriado, septo e corpo caloso, sendo mais evidente no primeiro caso. A parede medial, adjacente ao septo, é praticamente desprovida do subependima, com exceção da parte mais anterior do corno anterior⁽¹⁵⁾.

A SVZ é a maior região germinativa do cérebro adulto do mamífero. Os novos neurónios formados na SVZ migram até ao bulbo olfativo, numa corrente de migração rostral (RMS – ver adiante), onde terminam a sua maturação como interneurónios.

A SVZ-ependima contém, pelo menos, quatro tipos celulares diferentes definidos pela sua morfologia, ultraestrutura e marcadores moleculares (Quadro 2)⁽¹⁴⁾.

As células tipo A correspondem a neuroblastos que formam as correntes de migração forradas pelos astrócitos (células B) (Fig. 4). As células do subtipo B1, semelhantes a astrócitos encontram-se, em mitose latente, adjacentes ao epêndima, enquanto que as células subtipo B2, as células estão mitoticamente activas e adja-

QUADRO 2 – ORGANIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS CÉLULAS DO SVZ-EPÊNDIMA

<i>Tipo celular</i>	<i>Imuno-citoquímica</i>	<i>Microscopia de luz</i>	<i>Microscopia electrónica</i>	<i>Contactos</i>
A	PSA-NCAM+ TuJ1+ Nestina+	Células escuras	Electronodensas Contornos lisos Complexos juncionais circulares (<i>zonula adherens</i>) Pouco electronodensas.	A-A A-C
B	GFAP+ Vimentina+ Nestina+	Células claras	Contornos irregulares Núcleo irregular com invaginações irregulares Filamentos intermediários ribossomas livres.	B-B B-E
C	Nestina+	Células grandes e esféricas mais escuras que B mas mais claras que A.	Electronodensidade intermédia entre A e B Núcleo com invaginações Cromatina dispersa.	C-C C-A
E	Vimentina+ Nestina+	Célula muito clara e ciliada adjacente ao ventrículo lateral.	Complexos juncionais apicais (<i>zonula occludens</i>) Microvilosidades.	E-E E-B

As células do tipo D correspondem a tanicitos, não sendo importantes no âmbito do tema deste trabalho^{Adaptado de Doetsch e col15}

centes ao parênquima estrial^(8,15,16). Junto destas correntes de migração existem aglomerados celulares precursores altamente proliferativos de células C. As células do tipo E correspondem ao epitélio ciliadoependimário dos ventrículos laterais. Enquanto que as células do tipo E têm cílios longos as células do tipo B têm apenas um cílio curto semelhante aos progenitores neurais no embrião (glia radial)⁽⁶⁾.

PROPRIEDADES E DINÂMICA PROLIFERATIVA DAS NSCS DA SVZ

Como vimos anteriormente, a SVZ é uma zona morfológicamente heterogénica, na qual os diversos tipos celulares parecem estar envolvidos na regeneração de neuroblastos, que migram para o bulbo olfativo.

A Figura 5 mostra como se relacionam os diversos tipos celulares: os astrócitos (tipo B) funcionam como CEN relativamente quiescentes, dando origem a uma população de células C, altamente proliferativa e de amplificação transitória, que regenera os neuroblastos (tipo A)^(6,15).

Sabe-se que as células do tipo C têm um tempo de ciclo celular (T_c) de 12,7 h, numa divisão mitótica estável, cuja descendência sofre maioritariamente morte celular (60%), 25% migra para o bulbo olfativo e apenas 15% ficam confinadas à zona subependimária^(17,18).

In vitro, quando a população C foi destruída pela injeção de altas doses de [³H]timidina para destruir as células em divisão, uma subpopulação de CEN do subependimária renovou esta população em 8 dias^(5,17). A renovação da população C en-



Figura 5 – Esquema das relações dos vários tipos celulares presentes na SVZ (ver legenda da Fig. 4). Célula B é um astrócito que gera a população proliferativa C que está na origem dos neuroblastos A. Tc, tempo de ciclo celular (Adaptado de Alvarez-Buylla e Garcia-Verdugo⁶ e de Parasi e col²³).

volve divisão simétrica de células estaminais e não envolve morte celular. A duração média da população de células C na SVZ é de 15 dias, parecendo existir de facto um *turn-over* desta população proliferativa e conseqüentemente na população de neuroblastos da SVZ⁽¹⁷⁾. Embora seja um dado indirecto e especulativo, muitos autores propõem, desta forma, um Tc de, aproximadamente, 15 dias para a CEN da SVZ⁽¹⁷⁾.

Todos os tipos celulares incorporam [³H]Timidina, evidenciando divisão mitótica activa. A divisão das células B e C sugere que estas estão envolvidas na geração de neuroblastos (tipo A). Após ablação das células C e A, com drogas anti-mitóticas, os astrócitos dividem-se para regenerar a população C que, por sua vez, regenera a A^(6,17).

As células do tipo B demonstram igual capacidade de *in vitro* gerar neuroesferas "EGF- e FGF-responsive". O mesmo estudo mostra que os astrócitos do córtex, cerebelo e medula espinhal comportam-se como CEN *in vitro*, apenas quando isoladas antes de P10⁽⁶⁾. *In vitro*, os astrócitos de SVZ mostram ser capazes de formar neuroesferas produtoras de neurónios e glia⁽⁶⁾.

Estudos recentes evidenciam a possibilidade de os astrócitos de SGZ funcionarem como precursores de neurónios granulares⁽⁶⁾. Os astrócitos de SVZ provêm da glia radial do período embrionário, a qual tem sido apontada como CEN do neocórtex em desenvolvimento. Todos estes dados apontam para que a CEN pertença à linha "neuroepitélio – glial radial – astrocitária"⁽⁶⁾.

Estima-se o número de células estaminais em cerca de 1200 no cérebro do adulto (na área limitada anteriormente pelo limite rostral das fibras comissurais do corpo caloso e posteriormente pelo limite rostral das fibras comissurais da comissura anterior), cerca de 0,2-0,4% da população total do subepêndima^(17,18).

No entanto, esta estimativa não corresponde a nenhum dos tipos celulares do Quadro 2 cujas percentagens foram calculadas por Doetch e col. (1997)¹⁵, e que eram superiores a 0,2-0,4%. Levanta-se a hipótese de que uma população de células C relativamente quiescente ou grupo celular morfológicamente não identificável constitua verdadeiramente as CEN da SVZ. Estudos mostram que o EGF é capaz de induzir rapidamente a divisão celular das células C *in vitro*⁽¹⁹⁾.

CORRENTE DE MIGRAÇÃO ROSTRAL

No cérebro neonatal e adulto de roedores, as células da SVZ do ventrículo lateral migram rostralmente e diferenciam-se em neurónios no bulbo olfactivo. Esta migração é tangencial e ocorre ao longo de um caminho bem definido – corrente de migração rostral (RMS)^(9,6) – a uma velocidade média de 120 m/hr.

Apesar de ter sido descrita, primeira-

mente, no rato, migrações similares à RMS foram já evidenciadas no cérebro de primatas e humanos⁽⁶⁾. A corrente de migração também foi proposta para o neocórtex, pese embora o facto de nunca ter sido demonstrada⁽⁶⁾.

A RMS (Figs. 5 e 6) é constituída por neuroblastos alongados, células do tipo A, no centro da corrente, envolvidos por glia, células tipo B, que os isolam do parênquima circundante e do epitélio endimário. A membrana das células do tipo A possuem especializações do tipo *zonula adherens*^(6,15).

A maquinaria celular que impele os neuroblastos, parece estar baseada na polimerização e despolimerização alternada dos seus microtúbulos. A *Doublecortin*, uma *microtubule associated protein* (MAP), é expressa pelos neuroblastos⁽⁶⁾. A presença de um cone de crescimento proeminente e extensão e retração activas do processo axonal sugerem que a migração também partilha processos de locomoção usados no crescimento axonal⁽⁶⁾. De acordo com este facto, foi evidenciada a presença de colapsina na RMS, uma proteína importante para a condução axonal.

Começam a ser identificadas as moléculas necessárias à adesão. A PSA-NCAM é responsável pela junção das mesmas ou pela comunicação com a glia circundante⁽¹⁶⁾. Estudos *Knockout* para o gene da PSA, evidenciam uma migração menos activa, embora os neuroblastos também migrem. A proteína $\alpha 6 \beta 1$ parece ser importante para a adesão entre os neuroblastos⁽⁶⁾. O meio extracelular também influencia a migração – foram identificados proteoglicanos contendo tenascina e condroitino-sulfatos na RMS⁽⁶⁾. Estudos recentes demonstram que a reelina, sub-

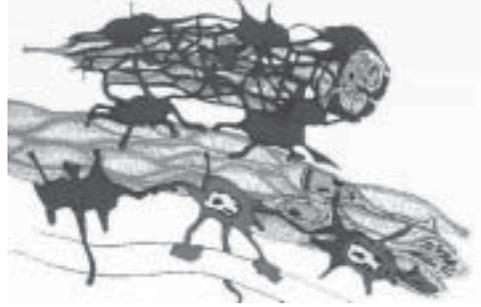


Figura 6 – Ilustração da corrente de migração rostral evidenciando os diversos tipos celulares descritos no texto⁶.

unidade do receptor da $\beta 3$ -integrina, é importante para a migração das células estaminais nervosas no rato que proliferaram na SVZ, e que ratos em que o gene que expressa a reelina foi inactivado, mostraram ter menos CEN quer no bulbo olfativo quer no hipocampo⁽²⁰⁾.

Estudos concluíram que o septo segregava quimiorrepulsivos que guiam os neuroblastos, através do efector *Slit-Robo*⁽⁶⁾. Pelo contrário, o bulbo olfativo segregava quimioatractivos, mas estes revelam-se pouco importantes já que a RMS ocorre mesmo após secção do mesmo.

A glia funciona como um envelope para os neuroblastos em migração, estendendo os seus múltiplos prolongamentos numa espécie de rede. Em última instância, os neuroblastos em migração vão diferenciar-se em células granulares e periglomerulares no bulbo olfativo⁽¹⁶⁾.

A incorporação constante de neurónios no bulbo olfativo sugere que este seja um mecanismo importante de ajustamento dos circuitos olfativos à medida que a intensidade ou o tipo de odores de meio mudam⁽⁶⁾.

REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CEN

As CEN são reguladas por um conjunto de factores intrínsecos e extrínsecos ainda pouco conhecidos. Os primeiros relacionam-se com a expressão de certos genes e são preponderantes no desenvolvimento das células estaminais no período embrionário. Por seu turno, os segundos correspondem ao grupo de polipeptídeos designados por Factores de Crescimento que têm sido estudados *in vitro*, mas que parecem faltar no organismo *in vivo*.

Factores Genéticos

Os estudos realizados com a *Drosophila* para determinar os genes envolvidos na neurogénese individualizaram dois grupos de genes importantes:

- *Genes proneurais*. Pertencentes ao grupo *basic helix-loop-helix* (bHLH), como o complexo *achaete-scute*, cujos homólogos no rato são o MASH-1 e MASH-2 (*mammalian achaete-scute homologue 1 e 2*) e no homem é o HASH-1, *ventral nervous system defective* (vnd)⁽⁶⁾ e os genes relacionados com o atonal (genes das neurogeninas, *neuroD-like* e *ATH*)^(21,22). Os genes do grupo bHLH parecem ser importantes para a diferenciação das células neuroepiteliais em neurónios, interrompendo o ciclo celular e delaminando o epitélio⁽²²⁾.

- *Genes neurogénicos*, como o *Notch* cujos homólogos no rato são o *Notch-1* e *2* e no homem o TAN-1. Os genes *Notch* auxiliam os genes proneurais promovendo a inibição lateral, i.e., permitindo a individualização de grupos de células (*clusters*) competentes que se diferenciarão em neurónios^(21,22).

- *Genes gliogénicos* – Outros dois genes, *Olig2* e *Nkx2.2* orientam a diferenciação das mesmas para oligodendrócitos⁽²²⁾.

Factores de Crescimento

Efeitos do Factor de Crescimento Epi-dérmico (EGF). Reynolds e col. (1992) demonstraram o efeito proliferativo do EGF num determinado grupo celular do estriado E14⁽³⁾. A célula que responde ao EGF faz parte de uma população progenitora que também prolifera com TGF- (*Transforming Growth Factor* ; ligando do receptor de EGF). As células, quando isoladas das neuroesferas, podem desenvolver-se morfológicamente na ausência de EGF, exprimindo marcadores para neurónios e astrócitos⁽³⁾. Os neurónios formados apenas apresentam como neurotransmissor o GABA ou a substância P⁽²⁾. No entanto, dados mais recentes mostram que o EGF em altas doses na SVZ aumenta a produção de glia enquanto que a taxa de produção de neurónios permanece inalterada ou baixa^(6,13). Com efeito, a activação do receptor do EGF parece favorecer a gliogénese em relação à neurogénese, por mecanismos ainda não conhecidos.

Efeitos do Factor de Crescimento dos Fibroblastos (FGF). Os FGF parecem estar envolvidos na regulação do número de divisões celulares dos progenitores. Vários factores da família dos FGF (FGF1, FGF2, FGF4, FGF7) mostraram ser capazes de prolongar a neurogénese, actuando no ciclo celular a nível de G1, reprimindo a diferenciação terminal 21. O FGF evidencia, no entanto, um efeito proliferativo.

Um dos factores mais estudados é o

FGF (ou FGF-2). Células isoladas do hipocampo mostram uma resposta proliferativa ao FGF (Gage e col., 1994), estimula preferencialmente a proliferação de neuroblastos⁽³⁾. Este pode actuar, todavia, como factor que leva os precursores indiferenciados a caminharem no sentido das linhagens neuronais. A origem da célula que responde ao FGF ainda é pouco clara⁽³⁾. O FGF revela também ser capaz de promover a proliferação não só de neuroblastos como também de células multipotenciais, que em última instância darão origem a neurónios e glia. Weiss e col. (1996) mostraram que o FGF actuava sobre duas populações distintas: um neuroblasto unipotente, uma célula que se divide e dá origem a 3-17 precursores neuronais e um progenitor bipotente neuronal/astroglial⁽⁴⁾.

Não obstante, vários autores corroboram a hipótese de que o FGF é um agente mitogénico dos precursores neuronais mas a diferenciação e sobrevivência das células neurais é secundária e regulada por outros factores produzidos em resposta ao FGF, como a laminina e o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor I*)⁽⁹⁾.

Efeitos de outros factores extrínsecos.

O Factor Glial de Crescimento 2 (GGF2) pode actuar nas células da crista neural dirigindo-as para uma diferenciação glial em detrimento da neuronal⁽²¹⁾. O gene MASH-1, que é normalmente expresso pelas colónias de células da crista em desenvolvimento antes da diferenciação neuronal, não era expresso pelos "clones" destas células num meio enriquecido com GGF2. Este factor leva à restrição do potencial das células precursoras multipotenciais⁽²¹⁾. A hormona T3 e o PDFG

(*Platelet Derived Growth Factor*) são também importantes factores instrutivos, fazendo com que as CEN se restrinjam à linhagem de progenitores de oligodendrócitos, facto confirmado por diversos estudos com o O-2A^(13,19).

Diversas NT (Neurotrofinas) também têm mostrado influenciar a proliferação de células precursoras, como por exemplo o CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) que influencia a proliferação do precursor O-2A no sentido da formação de astrócitos, embora muitos estudos o classifiquem de oligodendrogénico^(13,19,21). As células indiferenciadas geradas nas neuroesferas induzidas por EGF, expressavam Trk B receptores de BDNF. O BDNF actua em todos os precursores neuronais para estimular a diferenciação e maturação de neurónios recém-formados^(4,13).

A BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) actua no decurso do desenvolvimento do embrião até à idade adulta, orientando as células precursoras para a sua diferenciação. Estudos mostram que a BMP é capaz de promover a diferenciação astrocitária. A nogina, que é segregada pelas células endimárias, inibe a BMP de permitir a neurogénese. A BMP é secretada pelas células do tipo B e C do subepêndima⁽⁷⁾.

Um aspecto interessante foi a recente descoberta de receptores das células estaminais/precursoras das células hematopoiéticas e endoteliais⁽²³⁾: (1) KDR, com alta afinidade para o Factor de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), um mitogénico associado à angiogénese; (2) Flt4, receptor de VEGF-C; (3) Flt1 (receptor cinase de tirosina de VEGF das células endoteliais) e (4) Tek/Tie. Tal demonstra que a neurogénese está associada ao recrutamento vascular. Por outro lado, abre

portas para o desenvolvimento de um marcador de CEN.

Modulação da neurogênese no hipocampo

Estudos inovadores no hipocampo revelaram outros factores que influenciam a neurogênese *in vivo*.

- *Experiência*: o exercício voluntário e ambientes laboratoriais complexos aumentam a proliferação na SGZ e a amplitude do LTP dos neurónios^(24,25).
- *Eixo HPA (Hypothalamus-pituitary-adrenal cortex)* e neurotransmissores: o stress, mediado pela acção dos glicocorticóides, diminui a proliferação celular na circunvolução denteada. O glutamato também diminui o número de neurónios formados; a adrenalectomia e bloqueio dos receptores de glutamato (NMDA – *N-Metil-D-Aspartate*) com MK801 aumenta a proliferação na SVG^(24,25,11) (Fig. 7).
- *Hormonas*: ao contrário dos glicocorticóides, os estrogénios ováricos têm um efeito proliferativo na SGZ aumentando o número de neurónios^(24,25).

PERSPECTIVAS

O isolamento e caracterização das CEN no cérebro adulto de mamífero abre novos horizontes no conhecimento dos processos regenerativos do SNC e da diversidade celular em geral. No entanto, o caminho a percorrer ainda é longo e várias questões ficam por resolver.

Ainda não se conseguiu estabelecer

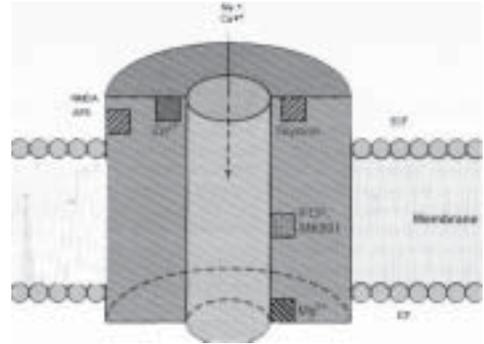


Figura 7 – Receptor NMDA. Permite a entrada de cálcio, sendo excitado pelo glutamato. A substância MK801 é um inibidor⁽²³⁾.

uma correspondência exacta entre os estudos realizados *in vitro* e os *in vivo* nem se isolou a CEN no cérebro adulto. O subependíma parece ser o local onde se encontram a maioria das CEN. Mas qual das populações celulares corresponderá a elas? Os astrócitos (tipo B) mostram as propriedades que mais se assemelham à CEN estudada *in vitro*, mas não há um estudo que confirme a verdadeira identidade das CEN.

Demonstrou-se que não só existe uma célula EGF-*responsive* capaz de gerar neuroesferas como também o mesmo acontece com células que respondem ao FGF. São muitos os factos que ficam por esclarecer. Seria vantajoso descobrir a influência concreta dos vários factores extrínsecos e intrínsecos que regem a proliferação das CEN o que permitiria descobrir as linhagens de descendência, permitindo compreender a amplitude da neurogênese no cérebro adulto.

Uma última questão põe-se em relação à reprodutibilidade, no Homem, dos avanços feitos no cérebro de rato.

O completo isolamento das CEN, assim como o completo controlo temporal e es-

pacial dos diversos factores que influenciaram a neurogênese do cérebro adulto, abrem um novo capítulo de novas terapêuticas no tratamento de traumatismos e doenças que afectam o cérebro humano.

Abstract

Adult mammal nervous system has been considered unique in the organism for its inability to repair injured neurons. However, in some parts of the brain, neurogenesis can occur not only in newborn but also in adults.

Progenitor cells isolated from embryo brain can undergo mitosis and differentiation into neurons and glia in vitro. Growth factors and molecular substrates are essential to increase or restrict differentiation of stem cells.

Multipotent (staminal) cells and neuroblasts and glioblasts are present in adult mammal brain and maintained quiescent but with the ability to proliferate and differentiate in the presence of these factors. Their preferential locations are subependyma adjacent to lateral ventricles and hippocampal dentate gyrus.

Key-words: *Cerebral staminal cells; Neuron regeneration; Stem cell differentiation; Regulating factors.*

BIBLIOGRAFIA

- Spangling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104.
- Reynolds B, Weiss S. Generation of Neurons and Astrocytes from isolated cells of the mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-1710.
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from CNS. *Annu Rev Neurosci* 1995b; 18: 159-192.
- Weiss S, Reynolds BA, Vescosi AL, Morshead C, Craig CG, Van der Kooy D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 1996b; 19: 387-393.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, Van der Kooy D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relative quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994; 13:1071-1782.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in de Adult Subventricular Zone. *J Neurosci* 2002; 22: 629-634.
- Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414: 112-117.
- Chiasson B, Tropepe V, Morshead CM, Van der Kooy D. Adult mammalian forebrain ependyma and subependyma cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have stem cell characteristics. *J Neurosci* 1999; 19: 4462-4471.
- Seaberg RM, and Van der Kooy. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 2002; 22:1784-1793.
- Gray's Anatomy* 38th Edition.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Petersin DA, Suhr ST and Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor transplanted to adult brain. *Proc Natl Sci USA* 1995; 92: 11879-11883.
- Kemperman G. Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Neurosci* 2002; 22: 635-638.
- Temple S and Alvarez-Buylla A. Stem Cells in Adult Mammalian Central Nervous System. *Curr Opin Neurobiology* 1999; 9: 135-141.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. Multipotential CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 1996; 16: 75599-7609.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, and Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997; 17: 5046--5061.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 1996; 271:978-981.
- Morshead CM, Craig CG, Van der Kooy D. *In vivo* clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in adult mammalian forebrain. *Development* 1998; 125: 2251-2261.
- Morshead CM, and Van der Kooy D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* 1992; 12: 249-256.
- MacKay R. Stem Cells in Central Nervous System. *Science* 1997; 276: 66-71.
- Kinter C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci* 2002; 22: 639-643.
- Calof AL. Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 19-27.
- Kim HM, Qu t, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas GD, Guidotti A, Coata E, Sugaya K. Reelin function in neural stem cell biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 19: 99: 4020-2025.
- Parati EA, Bez A, Ponti D, Ugo de Grazia, Corcini E, Cova L, Sala S, Colomdo A, alessandri G, Pagano SF (2002) Human neural stem cells express extra-neural markers. *Brain Research* 925: 213-221.
- Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 2000; 287: 1433-1441.
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in Adult Mammals: Some progress and Problems. *J Neurosci* 2002; 22: 619-623.