

LILIAN CRUZ

Perfil de miRNAs intracelulares e liberados via vesículas extracelulares na diferenciação neural de células-tronco pluripotentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

LILIAN CRUZ

**Perfil de miRNAs intracelulares e liberados via
vesículas extracelulares na diferenciação neural de
células-tronco pluripotentes**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes

Co-orientador: Dr. Raphael Bessa Parmigiani

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cruz, Lilian

Perfil de miRNAs intracelulares e liberados via vesículas extracelulares na diferenciação neural de células-tronco pluripotentes / Lilian Cruz; orientadora Marilene Hohmuth Lopes; coorientador Raphael Bessa Parmigiani. -- São Paulo, 2017.
148 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. miRNAs. 2. Vesículas extracelulares. 3. Diferenciação neural . 4. Células-tronco pluripotentes . 5. Células-tronco neurais . I. Hohmuth Lopes, Marilene, orientador. II. Bessa Parmigiani, Raphael, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lilian Cruz

Título da Tese: Perfil de miRNAs intracelulares e liberados via vesículas extracelulares na diferenciação neural de células-tronco pluripotentes

Orientador(a): Marilene Hohmuth Lopes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **715/15** referente ao projeto intitulado: “*Perfil de miRNA de vesículas extracelulares na diferenciação neuronal de células-tronco embrionárias murinas*” sob a responsabilidade de **Lilian Cruz**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes, pela atenção, paciência, energia e carisma na orientação do projeto. Por seu exemplo de pesquisadora ambiciosa e persistente. Obrigada por abrir as portas do laboratório para mim (mesmo sem espaço nenhum naquela época)!

Aos familiares, principalmente meus pais, Julia e Pedro, e irmãos, “Mário Brother” e Mirian, por acompanharem minha jornada de doutorado, pelos conselhos, companhia e paciência em momentos de estresse. À minha mãe, Julia, pelo exemplo de profissional biomédica, por ser meu apoio e pela força em continuar seguindo em frente. Ao meu pai, Pedro, por sempre me fazer lembrar que tudo na vida tem sua hora e seu limite. À minha madrinha, Lilian Key, pelo exemplo de dedicação e de mente em constante aprendizagem.

Aos laboratórios colaboradores nacionais (Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês e A.C Camargo Cancer Center em São Paulo) e internacionais (Laboratórios da Dra Xandra Breakefield e do Dr. Cris Bragg no Mass General Hospital, Boston; Laboratório da Dra Anna Krichevsky, no Brigham and Women’s Hospital, Boston e Laboratório do Dr. George Daley, no Boston Children’s Hospital, Boston) pelo uso do espaço, de equipamentos e reagentes e/ou discussões construtivas do projeto.

Ao Prof. Dr. Helder Nakaya e Thiago Hirata (Laboratório de Biologia de Sistemas Computacional, USP) e ao Dr. Raphael Parmigiani (Idengene Medicina Diagnóstica, São Paulo) e Camila Lopes pela valiosa ajuda na discussão e análise dos dados de bioinformática.

Aos colegas do Laboratório de Comunicação Celular e do Laboratório de Neurobiologia e Células-tronco da USP, que de algum modo contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Às amigas construídas ao longo do doutorado. À Tatiana Andrioli, por estar sempre presente quando precisei. À Andrea Arevalo, pelos momentos compartilhados de angústia e felicidade tanto da vida como relacionados às células-tronco embrionárias.

Aos que conheci sobre rodas, pela minha acolhida em São Paulo, pelos momentos de descontração, pelo respeito e por fazerem exercitar minha capacidade de transmitir a ideia do projeto numa linguagem menos acadêmica possível.

Àquela pessoa que me considera sua segunda tese, que está sempre pronta para “jogar um tema” e “fosforilar” ideias, que entrou na minha vida para ficar, para caminhar, sonhar e voar juntos. Ao meu ponto de equilíbrio, Chris Robles, obrigada por sempre despertar e acreditar no meu potencial.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/22078-1 e 2015/25756-6) e ao CNPq (158321/2011-1) pelo apoio financeiro durante o doutorado.

*“Imagination is more important than knowledge.
Knowledge is limited. Imagination encircles the world”*
Albert Einstein

RESUMO

CRUZ L. **Perfil de miRNAs intracelulares e liberados via vesículas extracelulares na diferenciação neural de células-tronco pluripotentes.** 2017. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As células-tronco processam e são sensíveis a múltiplos sinais dentro de seu microambiente, os quais podem exercer influências que, coletivamente, regulam seu destino e sua função de forma espaço temporal. Neste contexto, células podem exercer seu papel biológico por transferir informação genética e alterar expressão gênica de alvos celulares através de vesículas extracelulares (VEs). MicroRNAs (miRNAs), uma classe de pequenos RNAs não codificantes, podem ser encontrados nestas vesículas e são considerados moléculas efetivas no controle do neurodesenvolvimento por regular genes chaves em tempo controlado. Entretanto, apenas alguns miRNAs foram descritos na diferenciação em linhagem neural dopaminérgica e pouco se sabe sobre como a diferenciação influencia o conteúdo de miRNAs liberados via VEs de modo a revelar o papel dos mesmos no microambiente de cada etapa do comprometimento neural. Assim, a proposta deste estudo foi analisar o perfil de miRNAs intracelulares e presentes em VEs envolvidos na diferenciação neural dopaminérgica de células-tronco pluripotentes e identificar os possíveis alvos regulados pelos mesmos como mecanismo de estabelecimento de um destino neural específico. Para tanto, modelo de células-tronco embrionárias murinas foi utilizado e diversas evidências revelaram que células-tronco pluripotentes liberam VEs, sendo as mesmas com tamanho entre 50-150nm, forma *cup-shaped*, expressando marcadores típicos e enriquecidas em pequenos RNAs. Além disso, análises ultraestrutural e molecular revelaram eventos diretamente relacionados à biogênese de VEs (corpos multivesiculares e brotamento de VEs na membrana) e expressão de marcadores de via endocítica, respectivamente. Células-tronco pluripotentes induzidas humanas foram utilizadas para a diferenciação em células-tronco neurais e em células progenitoras dopaminérgicas e o perfil de miRNAs, tanto intracelular como de VEs, foi avaliado nesses três tipos celulares. Observou-se indícios de que células-tronco pluripotentes liberam maior quantidade de pequenos RNAs com RNAs longos ausentes quando comparadas com células diferenciadas. Foi possível identificar o padrão de alteração de expressão de miRNAs intracelulares esperados e bem descritos na diferenciação neural e novos potenciais miRNAs essenciais na diferenciação em progenitores dopaminérgicos. O estudo confirmou que miRNAs de VEs refletem o miRNoma de cada tipo celular mas, interessante, apresentam uma assinatura típica de miRNAs atualmente identificados como fragmentos de outros tipos de RNAs. Por fim, estes dados fornecem base para aprofundarmos o estudo dos miRNAs e outros RNAs como sinais regulatórios intra e extracelulares em mecanismos de pluripotência e da diferenciação neural dopaminérgica.

Palavras-chave: miRNAs. Células-tronco pluripotentes. Diferenciação neural. Vesículas extracelulares.

ABSTRACT

CRUZ L. **Intracellular and extracellular vesicles miRNAs profile during neural differentiation of pluripotent stem cells.** 2017. 148 p. Ph.D Thesis (Cell and Tissue Biology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Stem cells sense and process multiple signals in their microenvironment, which can exert influences that collectively regulate cell fate and function in a time spatial manner. In this context, the stem cells can exert their biological role transferring genetic information and altering the genetic expression of target cells through extracellular vesicles (EVs). MicroRNAs (miRNAs), a class of small non coding RNAs, can be found in those EVs and are considered effective molecules in the control of neurodevelopment and differentiation by regulating key genes in a time specific manner. However, few miRNAs were described into dopaminergic lineage differentiation and little is known about how the cell differentiation influences the miRNAs content released through EVs, and how these molecules function in the microenvironment of each phase of neural commitment. Thus, the purpose of this study was to analyze the intracellular and EVs miRNAs profiles involved in the dopaminergic differentiation of pluripotent stem cells in attempt to identify possible targets regulated by miRNAs as a mechanism of specific neural fate decision. For that, mouse embryonic stem cells were used to show evidence that these cells release EVs, sized 50-150nm, cup-shaped, expressing typical markers and enriched in small RNAs. Ultrastructural and molecular analyses detected events directly related to EVs biogenesis (multivesicular bodies and shedding vesicles) and expression of markers of endocytic pathway, respectively. Human induced pluripotent stem cells were used to perform the differentiation into neural stem cells and dopaminergic progenitors and these three cell types were used for miRNAs profiling, both intracellular and released through EVs. There were evidence that these pluripotent stem cells release higher amount of small RNAs without signal of long RNAs when compared to differentiated cells. It was possible to identify the expected and well characterized pattern of the intracellular miRNAs expression switch during neural differentiation and also new potential miRNAs essential for dopaminergic progeny commitment. This study confirmed that EVs miRNAs reflected the miRNoma of each cell type, but, interestingly, EVs presented a specific signature of miRNAs currently considered fragments of other RNAs types. These data provide basis to explore the miRNAs and other small RNAs as regulatory signals intra and extracellularly in mechanisms of pluripotency and dopaminergic neural differentiation.

Keywords: miRNAs. Pluripotent stem cells. Extracellular Vesicles. Neural differentiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do tubo neural com destaque para localização e funções de progenitores dopaminérgicos da base do tubo.....	23
Figura 2 - Esquema de miRNAs e moléculas alvo na indução ou repressão da diferenciação neural	27
Figura 3 - Morfologia de vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias obtida por diferentes métodos de processamento de microscopia eletrônica	37
Figura 4 - Quantificação de tamanho de vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias.....	38
Figura 5 - Presença de Alix, HSP90, STI1, flotilina e Tsg101 em fração de vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias.	39
Figura 6 - Localização de STI1 em células-tronco embrionárias e precursores neurais	41
Figura 7 - Localização de STI1 em células-tronco embrionárias.....	42
Figura 8 - Análise da integridade do RNA pelo Agilent 2100 Bioanalyzer	43
Figura 9 - Microscopia eletrônica de eventos celulares relacionados à secreção de vesículas extracelulares	44
Figura 10 - Ultraestrutura de células-tronco embrionárias em dois diferentes métodos de processamento para microscopia eletrônica	45
Figura 11 - Análise ultraestrutural de células-tronco embrionárias	46
Figura 12 - Análise ultraestrutural de células-tronco embrionárias evidenciando proximidades e deformações membrana plasmática	47
Figura 13 - Eventos de biogênese de vesículas extracelulares em células-tronco embrionárias murinas	48
Figura 14 - Expressão de componentes da maquinaria da biogênese de vesículas extracelulares em células-tronco embrionárias	50
Figura 15 - Maquinaria de via endocítica e biogênese de vesículas em embriões ...	51
Figura 16 - Esquema de diferenciação neuronal por mecanismo <i>default</i>	52
Figura 17 - <i>Time course</i> da diferenciação neuronal pelo mecanismo <i>default</i>	53
Figura 18 - Características morfológicas das células durante a diferenciação neuronal	54
Figura 19 - População de precursores neurais gerados pelo mecanismo <i>default</i>	55
Figura 20 - Desenho experimental do projeto	58
Figura 21 - Marcadores de pluripotência em hiPSCs	66
Figura 22 - Marcadores de diferenciação de hiPSCs em células-tronco neurais	67
Figura 23 - Marcadores de diferenciação de hiPSCs em <i>floor plate progenitors</i>	68

Figura 24 - Diferenciação de hiPSCs em neurônios dopaminérgicos	69
Figura 25 - Análise por Bioanalyzer de RNAs extraídos após protocolo de isolamento de vesículas de DPBS e meio E8.....	70
Figura 26 - Perfil do tamanho de RNAs de vesículas extracelulares de hiPSCs, NSCs e FPPs	72
Figura 27 - Comparação de perfil de miRNAs intracelulares entre hiPSCs, NSCs e FPPs	74
Figura 28 - Comparação de perfil de miRNAs de VEs entre hiPSCs, NSCs e FPPs	75
Figura 29 - Comparação de perfil de miRNAs de VEs em relação a miRNAs intracelulares em hiPSCs, NSCs e FPPs	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de RNA (ng) obtido por cada mL de meio condicionado de cada amostra biológica (1, 2 e 3) e cada população celular (hiPSCs, NSCs e FPPs).....	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALIX	<i>Apoptosis Linked Gene-2-interacting protein X</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid</i>
AREs	Elementos ricos em adenilato-uridilato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMPs	Proteína morfogenética óssea
BSA	Albumina bovina sérica
cDNA	DNA complementar
CDK2	Quinase dependente de ciclina 2
CHMP 1-7	<i>Charged Multivesicular body Protein 1-7</i>
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CPE	Elemento de poliadenilação citoplasmática
Cq	Ciclo de quantificação
CTE	Células-tronco embrionárias
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAZAP2	<i>Deleted in azoospermia-associated protein 2</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIC	Contraste de interferência diferencial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
DOHH	<i>Deoxyhypusine hydroxylase</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
E8	Essential 8
Ebf3	<i>Early B-cell fator 3</i>

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEF1A	Fator de alongamento eucariótico 1 α
EGF	Fator de crescimento epidermal
eIF5A	Fator de início de tradução em eucarióticos 5A
EPO	Eritropoietina
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
ESC	Células-tronco embrionárias
EV	Vesículas extracelulares
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF8	Fator de crescimento de fibroblasto 8
FOS	<i>Finkel-Biskis-Jinkins osteosarcoma</i>
FOXA2	<i>Forkhead box protein A2</i>
FPPs	<i>Floor plate progenitors</i> (progenitores da base da placa do tubo neural)
FU	Unidades de fluorescência
GMEM	<i>Glasgow's minimal essential médium</i>
h	Horas
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
hESCs	Células-tronco embrionárias humanas
hPS	<i>human pluripotent stem</i>
hiPSCs	Células-tronco pluripotentes induzidas humanas
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IGF1R	Receptor de IGF1
lt-NES	<i>"long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells"</i>
KRT19	Queratina 19
LBPA	Ácido lisobisfosfatídico
LIF	Fator inibidor de leucemia

Lmx1a	<i>LIM Homeobox Transcription Factor 1 Alpha</i>
MAP2	Proteína associadas a microtúbulo-2
MCM5	<i>Mini-Chromosome Maintenance protein 5</i>
ME	Microscopia eletrônica
mEPSC	<i>mini Excitatory Post-Synaptic Currents</i>
min	Minutos
miRNA	MicroRNA
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
Msi 1	Proteína musashi 1
MVB12	<i>Multivesicular body sorting fator 12</i>
MVB	Corpos multivesiculares
ncRNA	RNA não codificantes
NF-kB	Fator nuclear kappa B
ng/μL	Nanogramas por microlitro
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nm	Nanômetro
NPCs	Células precursoras neurais
NR2F2	<i>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2</i>
NSCs	Células-tronco neurais
Nt	Nucleotídeos
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
Oct4	Fator de transcrição
ORF	Fase aberta de leitura
OTX2	Orthodenticle Homeobox 2

Pax6	<i>Paired box protein Pax-6</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial de hidrogênio
PKR	Proteína-quinase ativada por RNA
Prp ^c	Proteína prion celular
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIPA	Ensaio de radio-imunoprecipitação
RISC	Complexo de indução do silenciamento do RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNU44	[<i>SNORD44 small nucleolar RNA, C/D box 44</i>]; RNA, U44 <i>Small Nuclear; U44, RNU44</i>]
RNU48	[<i>SNORD48 (small nucleolar RNA, C/D box 48)</i>]; RNA, U44 <i>Small Nuclear; U48, RNU48</i>]
Rpm	Rotações por minuto
Seg	Segundos
Shh	<i>Sonic Hedghog</i>
SLAIN1	<i>SLAIN motif family, member 1</i>
SMAD	<i>Small Mother Against Decapentaplegic</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Sox1 <i>SRY</i>	<i>(sex determining region Y)-box 1</i>
Sox2 <i>SRY</i>	<i>(sex determining region Y)-box 2</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
STI1	<i>Stress Inducible Protein 1</i>
TAp73	Forma transcricionalmente ativa da proteína p73
TBS	Tampão salina Tris
TE	Tampão Tris-EDTA
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta

TH	Tirosina hidroxilase
TLDA	<i>TaqMan Low Density Array</i>
TOB2	<i>Transducer of erbB-2 2</i>
TRA-1-60	<i>T cell receptor alpha locus</i>
tRFs Transfer	Fragmentos de RNA transportador
Tris-EDTA Buffer	Tampão Tris-EDTA
tRNA transfer	RNA (RNA transportadores)
Tsg101	<i>Tumor Susceptibility 101</i>
TUJ	<i>Neuron-specific class III beta-tubulin</i>
UBAP1	Proteína 1 associada a ubiquitina
U/μL	Unidades por microlitro
U/mL	Unidades por mililitro
UTR	Região não traduzida
VEs	Vesículas extracelulares
VPS4	Proteína vacuolar de seleção 4
VPS22	Proteína vacuolar de seleção 22
VPS25	Proteína vacuolar de seleção 25
Vps28	Proteína vacuolar de seleção 28
VPS36	Proteína vacuolar de seleção 36
Vps37	Proteína vacuolar de seleção 37
VTA1	<i>Vesicle Trafficking 1</i>
vtRNA	<i>vault</i> RNA
ZEB	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox</i>
3D	Três dimensões
x g	Gravidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°	Grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Neurogênese e microambiente	21
1.2 Uso de células-tronco pluripotentes embrionárias e pluripotentes induzidas como modelo de neurodesenvolvimento	24
1.3 microRNAs e neurogênese	25
1.4 Vesículas extracelulares e microRNAs	28
1.5 Justificativa	29
2 OBJETIVO	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 PARTE 1 - CARACTERIZAÇÃO DE BIOGÊNESE E ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS	32
3.1 Materiais e Métodos	32
3.1.1 <i>Cultivo de Células-tronco embrionárias murinas</i>	32
3.1.2 <i>Coleta de embriões</i>	32
3.1.3 <i>Diferenciação neuronal</i>	32
3.1.4 <i>Reação de imunofluorescência indireta</i>	33
3.1.5 <i>Isolamento de vesículas extracelulares</i>	34
3.1.6 <i>Microscopia eletrônica</i>	35
3.1.7 <i>Análise por immunoblotting</i>	36
3.1.8 <i>Quantificação da concentração e tamanho de VEs</i>	36
3.2 Resultados e discussão	37
3.2.1 <i>Sobre vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias</i>	37
3.2.1.1 <i>Análise morfológica</i>	37
3.2.1.2 <i>Análise de tamanho e quantificação</i>	37
3.2.1.3 <i>Análise bioquímica</i>	39
3.2.1.4 <i>Análise de RNA</i>	42
3.2.2 <i>Sobre biogênese de vesículas extracelulares em células-tronco embrionárias</i>	43
3.2.2.1 <i>Análise ultraestrutural de eventos celulares e corpos multivesiculares em células-tronco embrionárias murinas</i>	43
3.2.2.2 <i>Localização por imunofluorescência de marcadores da biogênese de vesículas</i>	48
3.2.3 <i>Sobre padronização da diferenciação neuronal</i>	52
3.2.3.1 <i>Análise morfológica e por imunofluorescência indireta</i>	52

3.3 Conclusões	57
4 PARTE 2 - PERFIL DE miRNAs INTRACELULARES E LIBERADOS VIA VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES HUMANAS INDUZIDAS	58
4.1 Materiais e Métodos	58
4.1.1 <i>Desenho experimental do projeto</i>	58
4.1.2 <i>Cultivo de células-tronco pluripotentes humanas induzidas</i>	59
4.1.3 <i>Diferenciação de hiPSCs em células-tronco neurais e em progenitores da placa basal do tubo neural - FPPs</i>	59
4.1.4 <i>Reação de Imunofluorescência indireta</i>	60
4.1.5 <i>Coleta de meio condicionado e isolamento de vesículas extracelulares</i>	60
4.1.6 <i>Extração de RNA de células e VEs</i>	61
4.1.7 <i>Análise de perfil e integridade de RNA usando Bioanalyzer</i>	62
4.1.8 <i>Síntese de cDNA</i>	62
4.1.9 <i>Pré-amplificação de cDNA</i>	63
4.1.10 <i>qPCR com TaqMan® Array Human microRNA Cards</i>	63
4.1.11 <i>Análise de dados</i>	65
4.2 Resultados e discussão	65
4.2.1 <i>Caracterização de hiPSCs e diferenciação neural</i>	65
4.2.2 <i>Padronização do isolamento de VEs e extração de RNA de VEs em hiPSCs</i>	69
4.2.3 <i>Caracterização de RNA intracelulares e de vesículas extracelulares de hiPSCs, NSCs ou FPPs</i>	70
4.2.4 <i>Cenário geral do perfil de miRNA intracelulares e de EVs em iPSCs, NSCs e FPPs</i> ..	72
4.2.5 <i>Expressão diferencial de miRNAs entre hiPSCs, NSCs e FPPs</i>	77
4.2.6 <i>miRNAs distinguem NSCs de FPPs</i>	77
4.2.7 <i>Assinatura específica de miRNAs em VEs</i>	80
4.3 Conclusões	83
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	96
A – MANUSCRITO SUBMETIDO	97
B – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO	126
C – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA	148

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurogênese e microambiente

O processo do desenvolvimento embrionário envolve uma complexa rede organizacional de fatores que regulam proliferação celular, diferenciação e apoptose. Após sucessivas divisões celulares que se segue à mórula, o embrião se encontra numa fase denominada blastocisto. Este estágio consiste de uma camada externa denominada trofoblasto (origina camadas externas da placenta), que envolve uma massa celular interna de células pluripotentes. Esta massa celular interna dá origem ao hipoblasto (gera estruturas extraembrionárias) e ao epiblasto, uma camada da qual os três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) se originam. Vários eventos de sinalização são necessários para instruir o epiblasto a se tornar cada um dos três folhetos (DE MIGUEL; FUENTES-JULIÁN; ALCAINA, 2010; SHENG, 2015; SNOW, 1977).

Dentro de seu microambiente específico, as células processam e são sensíveis a múltiplos sinais, os quais podem exercer influências que coletivamente regulam o destino das mesmas e sua função de forma espaço temporal. Estes fatores celulares extrínsecos incluem fatores solúveis e imobilizados, moléculas da matriz extracelular e sinais apresentados por células vizinhas. De fato, a diversidade celular que se estabelece ao longo do desenvolvimento é produzida por uma quantidade não muito ampla de sinais e depende, ao menos em parte, das mudanças no modo em que as células respondem a cada sinal. De acordo com esta visão, os sinais indutivos extrínsecos desencadeiam a diferenciação celular mas o destino fenotípico induzido por tais sinais é intrínseco à célula receptora (ABEMATSU; SMITH; NAKASHIMA, 2006; JESSELL, 2000; LE DRÉAU; MARTÍ, 2012; SASAI; KUTEJOVA; BRISCOE, 2014; WADDINGTON, 1940). A adequada apresentação destes múltiplos sinais regulatórios é necessária para o desenvolvimento correto do tecido e para sua homeostase (ARMANT, 2005; KEUNG; KUMAR; SCHAFFER, 2010; KSHITIZ et al., 2012; PRZYBYLA; VOLDMAN, 2012).

O desenvolvimento neural é um exemplo claro, porém sob intensa investigação, de como se sucede os eventos de padronização (no inglês, *patterning*)

de modo dependente da exposição a fatores extracelulares e da configuração intrínseca celular. Basicamente, as etapas iniciais do desenvolvimento neural embrionário são governadas por um conjunto de fatores de transcrição que controlam ao menos três processos: manutenção de precursores multipotentes que expandem o neuroectoderma, a transição dos mesmos para células-tronco comprometidas com aspecto neural na placa neural e o começo da diferenciação de progenitores neurais. A transição de uma etapa a outra requer uma ativação sequencial de conjuntos específicos de genes bem como seu silenciamento em momentos exatos durante o desenvolvimento (ABRANCHES et al., 2009; JI; LV; JIAO, 2013; KINTNER, 2002; MOODY et al., 2013; RANI et al., 2016)

Neste contexto, vários estudos têm defendido a ideia de que, nos momentos iniciais de indução neural, as células epiblasticas já possuem como destino natural intrínseco, o perfil de neuroectoderma, resultante da inibição de sinais que promoveriam o mesoderma e o endoderma (Wnts, Nodal e BMPs, do inglês *Bone Morphogenic Proteins*) (AUBERT et al., 2002; LUPO et al., 2013; TROPEPE et al., 2001; YING; SMITH, 2003). Uma vez definido o comprometimento com uma linhagem neural, uma camada única de células neuroepiteliais proliferantes, as células-tronco neurais (NSCs, *neural stem cells* no inglês) definem a placa neural e o tubo neural no início da embriogênese. Estas células são multipotentes, têm capacidade de autorrenovação e dão origem aos neurônios do sistema nervoso central (SNC) e glia radial bem como a astrócitos e oligodendrócitos (CAVINESS, 2003; GÖTZ; HUTTNER, 2005). Durante esta fase, as células progenitoras passam por diversos ciclos de divisões simétricas (autorrenovação) antes de dar origem a neurônios terminalmente diferenciados. Esta fase ativa de autorrenovação é necessária para manutenção de um grande pool de progenitores. Além disto, durante a neurogênese, as células progenitoras adotam progressivamente uma identidade regional específica ao longo do eixo do tubo neural em resposta a fatores exógenos (BRISCOE; SMALL, 2015; LAMB; HARLAND, 1995; OKADA et al., 2008; OOSTERVEEN et al., 2013). Desta forma, a programação molecular inicial específica de cada região embrionária é fundamental para existência de estruturas diferenciadas no SNC (ANDERSON et al., 2002; GERMAIN; BANDA; GRABEL, 2010; KUTEJOVA et al., 2016).

De particular interesse, temos o exemplo da especificação e diferenciação do *pool* de progenitores que darão origem a neurônios dopaminérgicos na porção basal do tubo neural (FPPs, do inglês *floor plate progenitors*) da região do cérebro médio (no inglês, *midbrain*). Estes progenitores são definidos numa janela do desenvolvimento entre gástrula e início da somitogênese, intervalo no qual possuem programa intrínseco para se tornarem FPPs em combinação com tempo de exposição e quantidade de *Sonic Hedgehog* (Shh) (BRISCOE et al., 2001; DESSAUD et al., 2007; DESSAUD; MCMAHON; BRISCOE, 2008; LEK et al., 2010; RIBES et al., 2010; SASAI; KUTEJOVA; BRISCOE, 2014). No entanto, estes FPPs, além de ser fonte de neurônios dopaminérgicos, adquirem outras funções dependendo da posição em que se encontram ao longo do tubo neural. Eles podem funcionar como centro organizador liberando fatores (Netrin, Shh, Slit, Ephrin, Semaphorin) que influenciam a diferenciação de células adjacentes, bem como fatores que direcionam o cruzamento de neurônios espinhais na linha medial (no inglês, *midline*) do tubo neural (HERNANDEZ-ENRIQUEZ et al., 2015; PARRA; ZOU, 2010; SHOJA-TAHERI; DEMARCO; MASTICK, 2015; YU; MCGLYNN; MATISE, 2013) (Figura 1). Deste modo, esta população celular se destaca como alvo de estudo por representarem células intermediárias da diferenciação de neurônios dopaminérgicos de elevado interesse em doenças neurodegenerativas, além de contribuírem com liberação de sinais que modulam o microambiente do desenvolvimento neural.

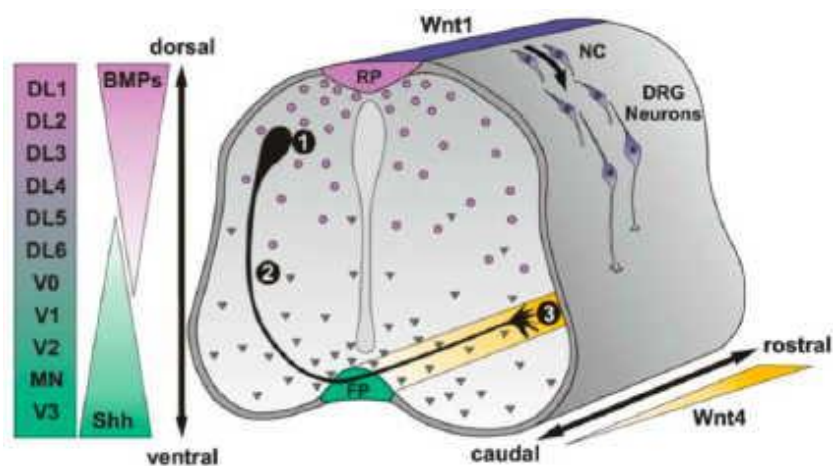


Figura 1 - Esquema do tubo neural com destaque para localização e funções de progenitores dopaminérgicos da base do tubo. À esquerda, gradiente dorso-ventral controlado dos morfógenos BMP e Shh determinam subtipos neurais (DL1-V3). Axônios comissurais de neurônios da medula

espinal (1) são guiados (2) por fatores liberados (triângulo) por células do floor plate (FP) a cruzarem a linha medial do eixo corporal (3). Gradiente do morfógeno Wnt4 na base do tubo atua como guia de axônios comissurais no sentido rostro-caudal (3). RP: roof plate; FP: floor plate; NC: neural cells; DRG: Dorsal root ganglion. Fonte: <http://briebuzz.blogspot.com.br/>

1.2 Uso de células-tronco embrionárias e células-tronco pluripotentes induzidas como modelo de neurodesenvolvimento

Células-tronco pluripotentes (PSCs, do inglês, *pluripotent stem cells*), como células-tronco embrionárias (CTEs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês, *induced pluripotent stem cells*), têm sido amplamente exploradas como modelo *in vitro* de diferenciação para compreensão dos complexos mecanismos durante o desenvolvimento embrionário (GUAN et al., 2013; PELTON et al., 2002; SANTOS; KISKINIS, 2017; SOLOZOBOVA; WYVEKENS; PRUSZAK, 2012). CTEs são derivadas da massa celular interna do blastocisto (ou estágio de epiblasto) ao passo que iPSCs são originadas da reprogramação de células somáticas através da expressão forçada ou adição de genes específicos relacionados a rede de pluripotência (TAKAHASHI et al., 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; THOMSON, 1998; YU et al., 2007). Essas células-tronco pluripotentes são caracterizadas por três aspectos: pluripotência (capacidade de diferenciar em tecidos de todos três folhetos embrionários), autorrenovação (manutenção de um estado não diferenciado) e proliferação ilimitada (DE LOS ANGELES et al., 2015; RALSTON; ROSSANT, 2010).

Como consequência, elas exibem um vasto potencial de expansão *in vitro*, uma habilidade de serem modeladas em uma imensa gama de fenótipos celulares e fornecem opções viáveis de padronização e escalonamento de diferenciação celular para fins terapêuticos (LEROU; DALEY, 2005; NISHIKAWA; GOLDSTEIN; NIERRAS, 2008; ROY et al., 2006). De fato, inúmeros trabalhos já mostraram a capacidade da diferenciação de CTEs e iPSCs em neurônios, usando as mais diversas abordagens experimentais como regulação de dose e duração de sinais extrínsecos no meio celular, co-cultivo celular, modulação da expressão de microRNAs, indução de genes neuronais específicos por infecção viral, reconstrução de microambiente em 3D dentre outros (CAPETIAN et al., 2016; CHAMBERS et al., 2009; KEUNG; KUMAR; SCHAFFER, 2010; LI et al., 2016; MORIZANE et al., 2011;

SACHDEVA et al., 2010; SANCHEZ-DANES et al., 2012; YAN et al., 2016; ZHAO et al., 2015). Apesar disso, um dos maiores desafios ainda se encontra em como controlar o vasto potencial das PSCs e explorá-lo a fim de guiar apropriadamente esta fonte de células pluripotentes exclusivamente para um fenótipo neuronal específico.

1.3 microRNAs e neurogênese

Trabalhos recentes sugerem que RNAs não codificantes (ncRNAs) regulatórios tem um papel na modulação de diversos eventos biológicos. Dentre os ncRNAs, um conjunto básico de microRNAs (miRNAs) possuem múltiplos alvos, os quais participam da manutenção da autorrenovação, e regulam a saída de um estado de pluripotência para uma escolha do destino celular. Neste sentido, supõe-se que miRNAs atuem como controladores do desenvolvimento por regular genes chaves em tempo controlado (AKERBLOM; JAKOBSSON, 2013; GREVE; JUDSON; BLELLOCH, 2013; ROSA; BRIVANLOU, 2013).

miRNAs são RNAs de fita simples endógenos que podem regular expressão gênica pós-transcricionalmente por meio da complementariedade com a região 3' não traduzida (3' UTR) de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Os miRNAs são derivados de unidades de transcrição independentes ou de íntrons de genes codificadores de proteínas. Um gene de miRNA é transcrito em uma forma primária denominada pri-miRNA. O pri-miRNA é clivado ainda no núcleo pela endonuclease RNAase III Drosha para produzir um intermediário em forma de grampo conhecido como precursor ou pre-miRNA. Este é subsequentemente exportado para o citoplasma, onde é processado pela Dicer para produzir um RNA dupla-fita menor. O processo de clivagem pela Dicer é acoplado com a incorporação de uma das fitas do miRNA maduro ao *RNA-induced silencing complex* (RISC). O miRNA direciona o RISC ao mRNA alvo por meio do pareamento de bases, sendo este necessariamente perfeito na extremidade 5' do miRNA (GRAVES; ZENG, 2012; KIM; KIM; KIM, 2016; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

A interação entre o miRNA e o mRNA pode diminuir a expressão proteica por meio de diferentes mecanismos: i) inibição da tradução, ii) degradação do mRNA ou

iii) indução do decaimento do mRNA. Mais de 60% de todo mRNA de mamíferos estão sob controle de miRNAs. Devido à especificidade, ao tamanho e a ligação dos miRNA serem limitadas, um único miRNA sempre tem vários mRNAs alvo, e um único mRNA pode ser alvo de múltiplos miRNAs. Desta forma, miRNAs frequentemente agem como moléculas de ajustes minuciosos podendo assim, interferir em processos fisiológicos por regular proteínas chave de uma determinada via de sinalização específica ou relacionada (FARH et al., 2005; JI; LV; JIAO, 2013).

Inúmeros estudos têm demonstrado que vários miRNAs são dinamicamente regulados durante o desenvolvimento neural o que sugere que os mesmos estejam ocasionando mudanças no transcriptoma durante o processo de diferenciação (AKERBLOM; JAKOBSSON, 2013; BIAN; XU; SUN, 2013; JI; LV; JIAO, 2013; PHAM; GALLICANO, 2012; SKREKA et al., 2012; SMIRNOVA et al., 2005). Dentre os diversos miRNAs descritos, miR-124, por exemplo, está relacionado à indução da diferenciação neuronal, enquanto que miR-184 e miR-137 promovem a manutenção de precursores neurais ou impedem a diferenciação dos mesmos (LIU et al., 2010; SANTOS et al., 2016; SZULWACH et al., 2010). Let-7 é a família de miRNAs mais expressa em células precursoras neurais (>50%), sugerindo que esta família tem um grande impacto na neurogênese funcionando como determinante do destino neural (KENNEDY et al., 2014; MORGADO; RODRIGUES; SOLÁ, 2016; PATTERSON et al., 2014; ZHAO et al., 2010).

Todavia, miRNAs não atuam sozinhos, eles agem em sinergia com outros reguladores transcricionais, como fatores de transcrição e epigenéticos, para estabelecer redes regulatórias na determinação de subtipos neurais. miRNAs e fatores de transcrição podem formar os mais diversos graus de *loops* de *feedback* ou *feed forward* (PELÁEZ; CARTHEW, 2012). Por exemplo, o balanço adequado de vias de sinalização de Activin/TGF β bem como de BMP é a base para saída de estado de pluripotência e indução neural (CHO et al., 2014; LIU et al., 2014). Diversos miRNAs têm como alvos componentes ou modulares da via Activin/TGF β (do inglês, *Tumor Growth Factor* beta) afetando positivamente ou negativamente a diferenciação neural. MiR-125a/b e miR-135b agem bloqueando componentes chave da via BMP/TGF β induzindo, assim, o perfil neural, e, por outro lado, miR-302/371 bloqueia a indução neural por contribuir com manutenção de níveis altos de

sinalização via BMP, atuando sobre vários inibidores endógenos da via (Lefty, DAZAP2, SLAIN1 e TOB2) (LIPCHINA et al., 2011; ROSA; SPAGNOLI; BRIVANLOU, 2009). MiR-200 também participa na via e reprime a indução neural por agir sobre o fator de transcrição ZEB (do inglês, *zinc finger E-box-binding homeobox*), um regulador negativo da sinalização BMP/TGF β . Em contrapartida, fatores de transcrição ZEB inibem a expressão de miR-200, caracterizando assim um *loop* de *feedback* duplo negativo (BECLIN et al., 2016; GREGORY et al., 2011). Diversos outros exemplos de miRNAs e vias se enquadram nessas redes regulatórias e ilustram a importância de miRNAs como controladores finos ou peças chave para o correto desenvolvimento neural (Figura 2).

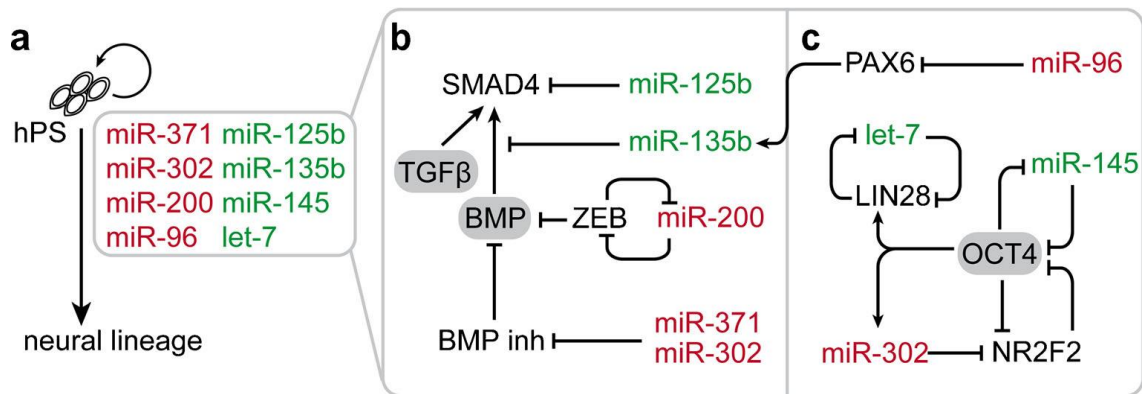


Figura 2 - Esquema de miRNAs e moléculas alvo na indução ou repressão da diferenciação neural. a) Lista de miRNAs que atuam positivamente (em verde) ou negativamente (em vermelho) na indução neural. b) atuação de miRNAs que regulam a diferenciação neural ao influenciar a atividade da via BMP/ TGF β . c) atuação de miRNAs que regulam expressão de fatores de transcrição associados a pluripotência (OCT4, LIN28) ou perfil neural (NR2F2, PAX6). *hPS*: human pluripotent stem cells. *BMP inh*: BMP inhibitor. Fonte: Stappert, Koerner e Brustle, 2014.

Já foi demonstrado que miRNAs circulam de forma altamente estável e livre de células em vários fluidos biológicos, como soro, plasma, saliva, urina e leite. Além disto, miRNAs circulantes podem ser significativamente alterados numa diversidade ampla de condições fisiológicas, bem como em processos patológicos (HANKE et al., 2010; HICKS et al., 2016; KOSAKA et al., 2010; MITCHELL et al., 2008). Alguns mecanismos têm sido indicados como fonte destes miRNAs extracelulares, incluindo a ativa secreção via microvesículas, sugerindo assim, que miRNAs podem ser entregues a outras células. Mais do que isso, já foi demonstrado que nas células

receptoras os miRNAs são capazes de regular a expressão gênica e induzir o desencadeamento de vias de sinalização, o que pode implicar na modulação de processos fisiológicos (VALADI et al., 2007; XIN et al., 2012).

1.4 Vesículas extracelulares e microRNAs

Estudos tem descrito que células eucarióticas liberam populações heterogêneas de vesículas envoltas por membrana através de mecanismos secretórios não convencionais os quais não empregam a via clássica peptídeo-sinal de transporte secretório via Complexo de Golgi (GEORGE et al., 1982; HEIJNEN et al., 1999). A liberação de exossomos e microvesículas são dois mecanismos de exocitose não convencionais, sendo que estas vesículas diferem-se com base nos seus processos de biogênese e propriedades biofísicas, como o tamanho e marcadores proteicos de superfície (CHOI et al., 2013; KELLER et al., 2006).

Exossomos são pequenas partículas homogêneas medindo de 40 a 100nm de diâmetro e são derivadas da via de reciclagem endocítica. Durante a endocitose, vesículas formadas na membrana plasmática se fundem com endossomos precoces. Estes ficam maduros e tornam endossomos tardios onde vesículas intraluminais brotam no lúmen da organela gerando corpos multivesiculares. Ao invés de se fundir com lisossomos, estes corpos multivesiculares fundem-se diretamente com a membrana plasmática, liberando as vesículas intraluminais para o meio extracelular, sendo então denominadas exossomos. Por outro lado, as microvesículas, uma população mais heterogênea, medindo de 50 a 1000 nm de diâmetro, são produzidas diretamente pelo brotamento da membrana plasmática produzindo pequenas protrusões citoplasmáticas que se soltam da superfície celular e portanto, seus marcadores de superfície são dependentes da composição da membrana de origem (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010; NICKEL, 2005; PAP et al., 2009; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Atualmente, porém, não há ainda um consenso em relação à nomenclatura e à estas características, e portanto, tem-se considerado ambos tipos como integrantes de um grupo heterogêneo denominado vesículas extracelulares (VEs) (WITWER et al., 2013).

Apesar destas diferenças, tanto os exossomos como as microvesículas contêm moléculas de RNA incluindo mRNAs e miRNAs funcionais, os quais podem ser transferidos entre células e assim afetar a expressão proteica das células receptoras. Cada vez mais evidências indicam que VEs participam de um papel importante na comunicação entre células (GILDEA et al., 2014; HAGA et al., 2015; VALADI et al., 2007; XIN et al., 2012). Neste contexto, Ratajczak et al. (2006) demonstraram pela primeira vez que microvesículas derivadas de células-tronco eram capazes de reprogramar células vizinhas, por entregar tanto proteínas como mRNA codificantes de vários fatores de transcrição de pluripotência. Isto sugeriu então, que as células-tronco poderiam exercer seu papel biológico por transferir informação genética e alterar expressão gênica de alvos celulares através de VEs (CAMUSSI; DEREGIBUS; CANTALUPPI, 2013; RATAJCZAK et al., 2006).

1.5 Justificativa

O fenótipo das células-tronco é continuamente ajustado por condições específicas do microambiente em que estão inseridas. Neste contexto, microvesículas exercem uma função crucial na modulação da plasticidade de células-tronco, representando uma troca de informação genética num microambiente definido (CAMUSSI; DEREGIBUS; CANTALUPPI, 2013; QUESENBERRY; ALIOTTA, 2008). Durante o desenvolvimento neural, o mecanismo que regula a passagem de uma fase para outra de diferenciação envolve múltiplos fatores. Diante disto, é necessário compreender como uma célula pluripotente, quando adquire um perfil neural, contribui com sinais no seu microambiente específico que caracterizem uma assinatura da configuração celular e que definem vias de comunicação intercelular. Para tanto, pretendemos estudar como miRNAs intracelulares e liberados por vesículas extracelulares em cada etapa do desenvolvimento contribui para o comprometimento da célula pluripotente para um fenótipo neural diferenciado, considerando estágios intermediários num modelo *in vitro*. Assim, além da análise do perfil de miRNAs intracelulares e de vesículas extracelulares, a identificação de alvos torna-se relevante para desvendar mecanismos moleculares da diferenciação neural. Estes mecanismos fisiológicos serviriam de base para o entendimento de

efeitos relacionados a doenças do neurodesenvolvimento bem como fornecerão valiosas informações que vão ao encontro do uso de VEs em terapias livres de células-tronco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar miRNA intracelulares e liberados via vesículas extracelulares em estágios diferentes do processo de diferenciação neural de células-tronco pluripotentes.

2.2 Objetivos específicos

- Evidenciar biogênese de vesículas extracelulares e caracterizar as vesículas extracelulares liberadas por células-tronco embrionárias murinas (Parte 1);
- Identificar miRNAs intracelulares e de vesículas extracelulares nas etapas de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs), células-tronco neurais (NSCs) e *floor plate progenitors* (FPPs) (Parte 2);
- Identificar possíveis alvos regulados pelos miRNAs e vias associadas à diferenciação neural (Parte 2);

3 PARTE 1 - CARACTERIZAÇÃO DE BIOGÊNESE E ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS

3.1 Material e métodos

3.1.1 Cultivo de Células-tronco embrionárias murinas

Células-tronco embrionárias de camundongo, E14Tg2a (*American Type Culture Collection*, ATCC; CRL-1821), foram cultivadas em condições controladas de ambiente, 37 °C com 5% CO₂ e umidade. Foram mantidas em placas cobertas com gelatina (0,1%) na presença de *Glasgow Modified Eagles Medium* (GMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), β-mercaptoetanol (50 μM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), aminoácidos não essenciais (1X), penicilina/estreptomicina e 1000 unidades/mL de *Leukemia Inhibitor Factor* (LIF; ESGRO® Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) (SUN et al., 2013).

3.1.2 Coleta de embriões

Camundongos fêmeas C57BL/6 e C57/Ola/BI/6 foram usados para coleta de embriões em fase inicial de desenvolvimento (blastocisto). Brevemente, 3,5 dias após cópula, camundongos fêmeas foram eutanasiadas em câmara saturada de CO₂ e o útero removido com assepsia. As tubas uterinas foram lavadas com jato de HBSS através do infundíbulo com auxílio de uma agulha em seringa de insulina ultra-fina em uma placa de Petri. Os embriões em fase de blastocisto tardio foram coletados e transferidos para solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%) para fixação. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo número: 21/2013).

3.1.3 Diferenciação neuronal

O protocolo de diferenciação neuronal consiste na abordagem de mecanismo default em monocultura. CTEs foram plaqueadas inicialmente aderentes em baixa

confluência em placas cobertas com gelatina (1 h) em meio GMEM+SORO+LIF. Após 24 h, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e o meio substituído pelo meio definido N2B27 (DMEM F12/N2 + Neurobasal/B27). O meio foi trocado todos os dias. Nestas condições, elas adquirem um comprometimento neural dentro de 4-6 dias. Após a indução da diferenciação pelo mecanismo *default* através do cultivo das CTEs em meio N2B27 por 4-6 dias, as células foram dissociadas e plaqueadas em placas pré-tratadas com poli-L-lisina/laminina. As células, consideradas nesta etapa como precursores neurais, foram mantidas e expandidas como precursores em meio N2 (ESGRO Complete Basal Medium, 1% N2, 1% penicilina/estreptomicina) e EGF/FGF (20 ng/mL). Para indução de diferenciação em neurônios, precursores neurais foram dissociados e plaqueados em placas cobertas com poli-L-lisina/laminina em meio N2B27, com quantidade decrescente de EGF/FGF ao longo dos dias até completa ausência dos fatores (YING et al., 2003).

3.1.4 Reação de imunofluorescência indireta

Células-tronco foram cultivadas sobre lâminas μ -slide *Ibi-Treat* (Ibidi, Martinsried, Alemanha) e células em diferenciação foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina (2 μ g/mL). Após 24-48 h, o meio de cultura foi retirado e as células fixadas com PFA 4% (20 min, à temperatura ambiente), e então, lavadas três vezes com PBS 1 X. As lamínulas (imersas em PBS) foram armazenadas em geladeira até realização de etapas seguintes de bloqueio e incubação com anticorpos.

O bloqueio foi realizado com incubação das amostras em solução de permeabilização/bloqueio: PBS + 0.3% Triton X100 + 5% Albumina Sérica Bovina (BSA) (1 h, à temperatura ambiente). Anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4 °C em solução PBS + 0.1% Triton X-100 + 1% BSA, seguindo instruções do fabricante. No dia seguinte, as lâminas/lamínulas foram lavadas três vezes para prosseguir com incubação dos anticorpos secundários por uma hora (no escuro, à temperatura ambiente). Para finalizar, as lâminas/lamínulas foram lavadas novamente e montadas com Prolong (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) ou, no caso

das lâminas Ibi-Treat, os poços foram preenchidos com meio de montagem *anti-fade* (glicerol + PBS pH 9, 9:1).

Para confirmação das etapas de diferenciação, utilizamos anticorpos contra marcadores de pluripotência: anti-Nanog (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), anti-Oct3/4 (Santa Cruz, Dallas, TX, EUA); precursores neurais: anti-nestina (Millipore) e de neurônios: anti- β III Tubulina (Cell Signaling). Para caracterização da biogênese de vesículas, utilizamos os anticorpos: anti-LBPA (Echelon, Salt Lake City, UT, EUA), anti-VPS36 (Abcam, Cambridge, UK), anti-VPS4 (Sigma, Darmstadt, Alemanha), anti-flotilina, anti-Rab27b (Sigma), anti-ALIX (Cell Signaling). Os anticorpos secundários usados foram: anti-rabbit Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific), anti-mouse Alexa-Fluor 546 (Molecular Probes™) e os núcleos foram marcados com *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI).

Imagens foram obtidas no microscópio de epifluorescência Axio Vert. A1 Carl Zeiss, no microscópio confocal Leica TCS SP2, do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE, A.C. Camargo Cancer Center) ou no microscópio confocal multifóton – Zeiss LSM 780 NLO, do Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP-ICB, USP).

3.1.5 Isolamento de vesículas extracelulares

Previamente ao preparo de meio condicionado, soro fetal bovino foi ultracentrifugado ($100000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 h) para eliminação de vesículas extracelulares (VEs) presentes no mesmo. Este soro livre de VEs foi usado no preparo do meio para o experimento. Células E14-Tg2a foram crescidas em confluência de 80% em placas de cultura (10 cm diâmetro) por 24 h, lavadas três vezes com PBS e tratadas com meio contendo soro livre de VEs. O meio condicionado foi coletado da placa após 48 h e submetido à centrifugações ($300 \times g$, 10 min; $2000 \times g$, 10 min, e $10000 \times g$, 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) para eliminação de debris celulares (THÉRY et al., 2006). O sobrenadante foi armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até momento da ultracentrifugação.

Para isolar VEs, o sobrenadante foi, então, ultracentrifugado a $100000 \times g$ por 70 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em rotor *swing* P40ST (Himac cp90b, Hitachi, Tóquio, Japão). O *pellet* foi lavado com PBS e ultracentrifugado novamente nas mesmas condições (THÉRY

et al., 2006). O pellet de VEs resultante foi ressuspenso em PFA 4% para processamento para microscopia eletrônica ou em tampão de lise RIPA para uso em *western blotting* ou em PBS para quantificação da concentração e tamanho pela técnica *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA, em aparelhos das marcas NanoSight - Salisbury, Reino Unido e Zetaview – Particle Metrix, Meerbusch, Alemanha).

3.1.6 Microscopia eletrônica

Para observação de VEs isoladas, o pellet final da ultracentrifugação foi fixado em PFA 4% por 1 h e uma gota (3 μ L) foi adicionada em telinhas de níquel de microscopia eletrônica cobertas com carbon Formvar para posterior processamento. Para observação de corpos multivesiculares e outros eventos celulares, as células cultivadas em placa foram lavadas com PBS, retiradas com *cell scraper*, centrifugadas, lavadas novamente, centrifugadas e ressuspendidas em glutaraldeído (16 h, à temperatura ambiente). Amostras foram então, centrifugadas (12000 rpm, 10 min, à temperatura ambiente) para formação de um pellet consistente, e processadas para microscopia eletrônica. O processamento da amostra para microscopia eletrônica foi realizado no setor de Técnicas Histológicas do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP. O material foi analisado no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 100 CX II) do mesmo departamento.

De modo alternativo, o pellet de VEs fixado foi adicionado em telinhas cobertas com metilcelulose e processado no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) na UNIFESP. Para visualização de corpos multivesiculares e eventos celulares, as células foram cultivadas em membrana ACLAR® Film (Honeywell, Morristown, NJ, EUA) cobertas com poli-L-lisina (50 μ g/mL) para preservação morfológica das mesmas. Após 48 h, o fixador glutaraldeído foi colocado no próprio meio em que as células estavam na proporção de 1:1 e, após 15 min, esta mistura foi retirada e substituída pelo fixador puro até o momento do processamento da amostra para ME. As amostras em ACLAR® foram processadas no CEME. O material foi analisado no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 100 CX II) do próprio CEME.

3.1.7 Análise por immunoblotting

Extratos proteicos de amostras celulares e de VEs foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Membranas foram bloqueadas (TBS, Tween 20 0,1%, Molico 5% m/v, por 1 h, à temperatura ambiente) e *immunoblotting* foi realizado com a incubação *overnight* (4 °C) de anticorpos marcadores de VE como anti-flotilina (Abcam), anti-*heat shock protein 90* (HSP90, Cell Signaling), anti-ALIX (Cell Signaling), anti-TSG101 (Abcam). Além desses, também foi utilizado anti-*Stress inducible protein 1* (STI1) (ZANATA et al., 2002), proteína de estudo do nosso grupo. Após lavagem, as membranas foram incubadas por 1-2 h com anticorpos secundários respectivos (*anti-rabbit* ou *anti-mouse*) conjugado com peroxidase. Reações foram reveladas usando ECL (GE Life Sciences, Uppsala, Sweden) ou *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific) e membranas foram expostas a filme *X-ray* (HAJJ et al., 2013).

3.1.8 Quantificação da concentração e tamanho de VEs

Pellet de VEs resultante da ultracentrifugação foi ressuspenso em 10 µL de PBS e então diluído 1:100 em PBS (para volume final de 1 mL). O tamanho de partículas foi quantificado pela tecnologia NTA (NanoSight LM20 ou Zetaview). O aparelho realiza uma análise através de gravação de vídeo de um campo visual onde 1 mL da amostra foi injetada e, então, os dados são analisados após 3 ou mais leituras (3 ou mais vídeos) do mesmo campo. Com finalidade de obter uma leitura mais fidedigna, diluições posteriores da amostra foram ajustadas caso a amostra apresentasse uma elevada concentração de partículas na primeira análise qualitativa. Parâmetros usados no software do NanoSight Camera Level 15, 30 seg de aquisição de vídeos.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Sobre vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias

3.2.1.1 Análise morfológica

Para coleta do sobrenadante de CTEs, as células foram cultivadas em placa de 10 cm em meio GMEM com adição de LIF e soro livre de vesículas, e, após 48 h, o sobrenadante foi recolhido para ser processado de acordo com protocolo descrito por Théry et al. 2006 (THÉRY et al., 2006). Por análise de ME, foi possível observar um padrão de tamanho heterogêneo de VEs de CTEs, variando entre 50-200 nm. Além disso, foi possível obter imagens de VEs com formato "cup shaped" (Figura 3). De fato, tal forma côncava visualizada em "cup shaped" é um ótimo indício de isolamento de vesículas, e acontece devido a um artefato criado na amostra pela metilcelulose durante o processamento para ME.

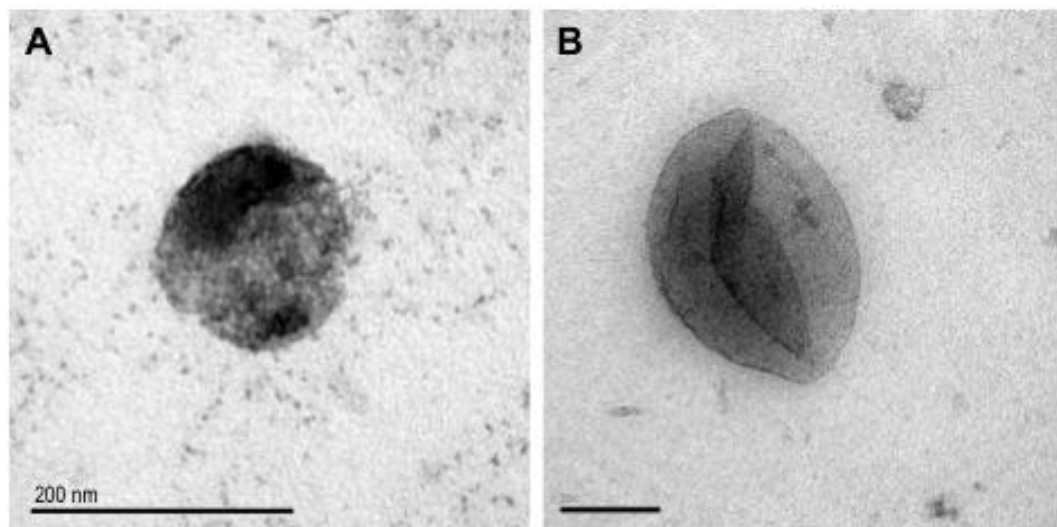


Figura 3 - Morfologia de vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias obtida por diferentes métodos de processamento de microscopia eletrônica. A: Vesícula extracelular sem formato *cup shaped* após uso de telinha sem cobertura com metilcelulose. **B:** Vesícula extracelular com formato *cup shaped* após uso de telinha com cobertura com metilcelulose. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100 CX II. Barra de escala: 200 nm.

3.2.1.2 Análise de tamanho e quantificação

Após análise dos dados pelo NTA, foi observado uma população de VEs acumuladas por 48 h no sobrenadante de CTEs com uma média de tamanho de aproximadamente 157 nm e com concentração de 2×10^{10} partículas/mL (Figura 4).

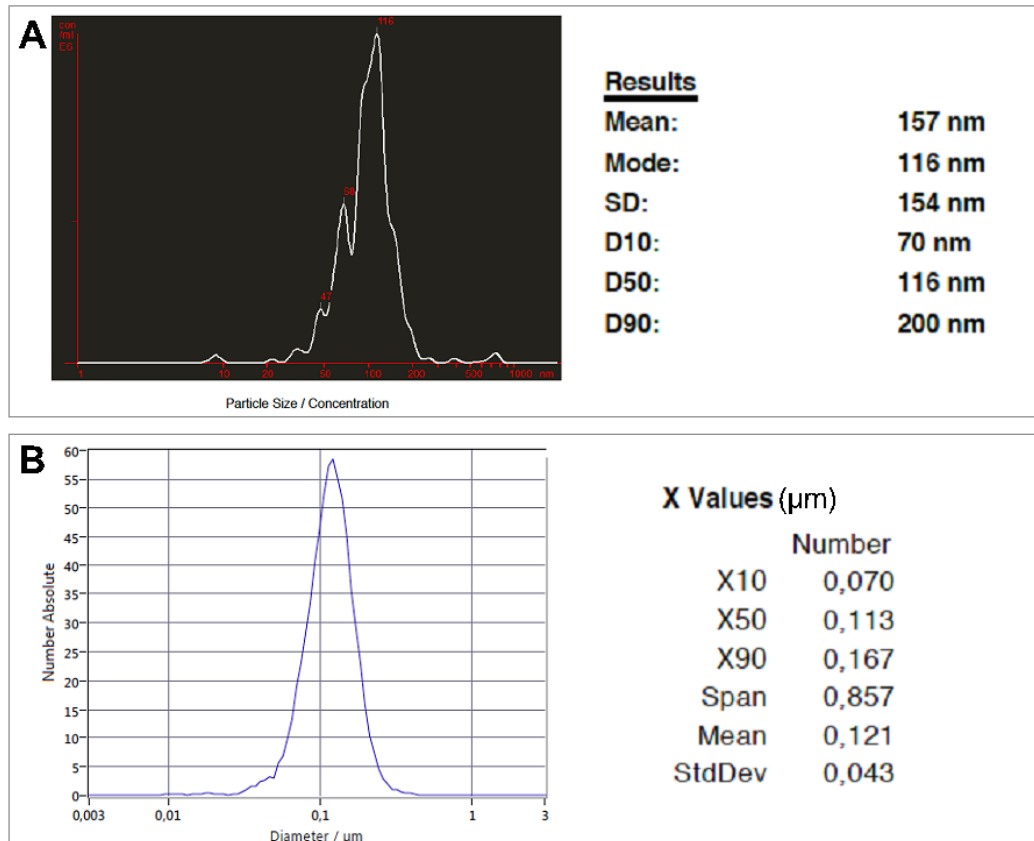


Figura 4 - Quantificação de tamanho de vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias. **A:** Análise representativa de dados gerados por uma leitura no aparelho NTA da marca NanoSight. Pico de partícula com 116 nm de diâmetro e média de tamanho da amostra de 157 nm. Eixo X: Tamanho da partícula. Eixo Y: concentração (partículas E6/mL) **B:** Análise representativa de dados gerados por uma leitura no aparelho NTA da marca Zetaview. Pico de partícula com 119,6 nm e média de tamanho da amostra de 121 nm. Eixo X: Diâmetro da partícula (μm). Eixo Y: número absoluto.

Uma limitação da tecnologia é que a mesma não permite diferenciar ou eliminar na leitura partículas devido à agregados proteicos (pequenos) ou agregados das próprias vesículas (grandes). Além disso, também não é capaz de analisar a integridade das vesículas, se estão deformadas ou mesmo rompidas, ou seja, qualquer partícula com movimento browniano é detectado pelo aparelho, podendo não ser exatamente VEs íntegras. Por isso, as análises geralmente são realizadas conjuntamente com ME, por meio da qual podemos observar a morfologia e

integridade das VEs de forma ultraestrutural. Apesar das limitações, a tecnologia NTA ainda é amplamente usada na área de estudo de VEs (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

3.2.1.3 Análise bioquímica

Para confirmação da presença de marcadores de VEs, a fração coletada após a ultracentrifugação final, bem como o extrato celular das CTEs, foram processadas para realização de *immunoblotting*, no qual foram utilizados anticorpos geralmente usados como marcadores de VEs (anti-ALIX, anti-HSP90, anti-flotilina, anti-TSG101), além de anti-STI1, uma co-chaperonina de interesse do nosso grupo e que está associada a VEs (Figura 5). Imagem da membrana corada com Ponceau revela um perfil diferenciado de proteína em vesículas quando comparado com extrato celular. Desta forma, pode-se afirmar que a presença destas proteínas na fração de VE bem como no extrato celular, juntamente com os dados de microscopia eletrônica, evidenciam que o método de isolamento por ultracentrifugação adotado foi promissor.

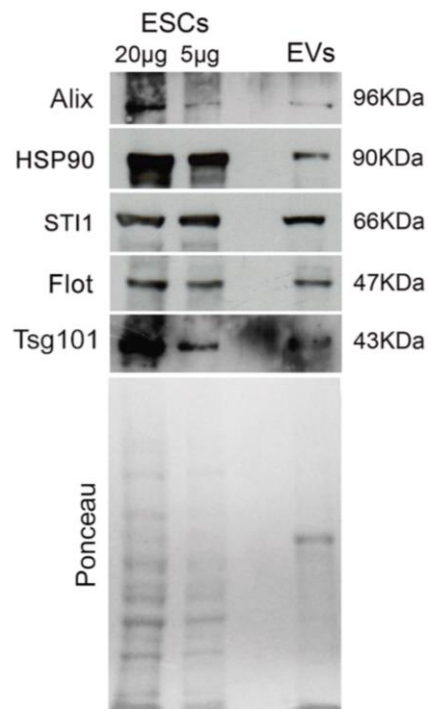


Figura 5 - Presença de Alix, HSP90, STI1, flotilina e Tsg101 em fração de vesículas extracelulares de células-tronco embrionárias. Extratos proteicos de células-tronco embrionárias

(ESCs) e de VEs (EVs) foram submetidos à SDS-PAGE seguida por *immunoblotting* [para Alix, *heat shock protein 90* (HSP90), *stress-inducible protein 1* (STI1), flotilina e Tsg101]. Imagem da membrana corada com Ponceau mostrando perfil proteico diferente em vesículas em relação às células.

A presença de STI1 observada na fração de VEs de CTEs murinas vem ao encontro de dados publicados mostrando que a mesma pode ser secretada por diferentes tipos celulares como astrócitos, células-tronco neurais, microglia e glioblastoma (ARANTES et al., 2009; ERLICH et al., 2007; FONSECA et al., 2012; HAJJ et al., 2013; LIMA et al., 2007; SANTOS et al., 2011; SOARES et al., 2013). De fato, quando secretada, a STI1 atua principalmente formando complexos com a proteína prion (PrP^c) uma glicoproteína de membrana plasmática que em sua isoforma normal encontra-se relacionada à mecanismos que controlam a plasticidade neural durante o desenvolvimento embrionário e na fase adulta (BENVEGNÙ; POGGIOLINI; LEGNAME, 2010; TREMBLAY et al., 2007).

Em células-tronco neurais, por exemplo, STI1 modula a autorrenovação e proliferação celular atuando de forma conjunta com PrP^c (SANTOS et al., 2011). Além disto, STI1 está vinculada à manutenção da pluripotencialidade de CTEs, regulando diferentes processos como a translocação nuclear do fator de transcrição STAT3 fosforilado (LONGSHAW et al., 2009; SETATI et al., 2010), bem como a regulação da formação de corpos embrióides derivados das mesmas (LONGSHAW et al., 2009; PRINSLOO et al., 2009; PUENTE et al., 2005). Diante disto, a confirmação de STI1 secretada via VEs pelas CTEs murinas reforçam a importância do estudo desta proteína na modulação de processos relacionados ao desenvolvimento embrionário.

Estudo com animais geneticamente modificados mostrou que STI1 começa a ser expressa em estágio inicial do desenvolvimento, sendo sua ausência letal para camundongos (BERALDO et al., 2013). Este mesmo estudo mostrou que animais *knockout* para STI1 tem formação comprometida dos brotos dos membros e do tubo neural levando-nos a iniciar uma caracterização da STI1 em CTEs induzidas à diferenciação em um fenótipo neural. Desta forma, para descrever a distribuição de STI1 em CTEs e em precursores neurais, reação de imunofluorescência indireta foi realizada e foi observado uma distribuição dispersa da proteína pelo citoplasma, e, em menor quantidade, pelo núcleo em ambos tipos celulares (Figura 6 A e B e, em

destaque, Figura 7). Porque muitos efeitos celulares neurais de STI1 são mediados pela sua interação com PrP^c, foi avaliado também a expressão de ambas proteínas em precursores neurais. Foi observado uma concentração característica de PrP^c na proximidade do núcleo e uma colocalização com STI1 pelo citoplasma (Figura 6C). Juntamente com o dado anteriormente gerado (Figura 5), pode-se afirmar que além de ser expressa no meio intracelular, STI1 também é secretada via VEs de CTEs.

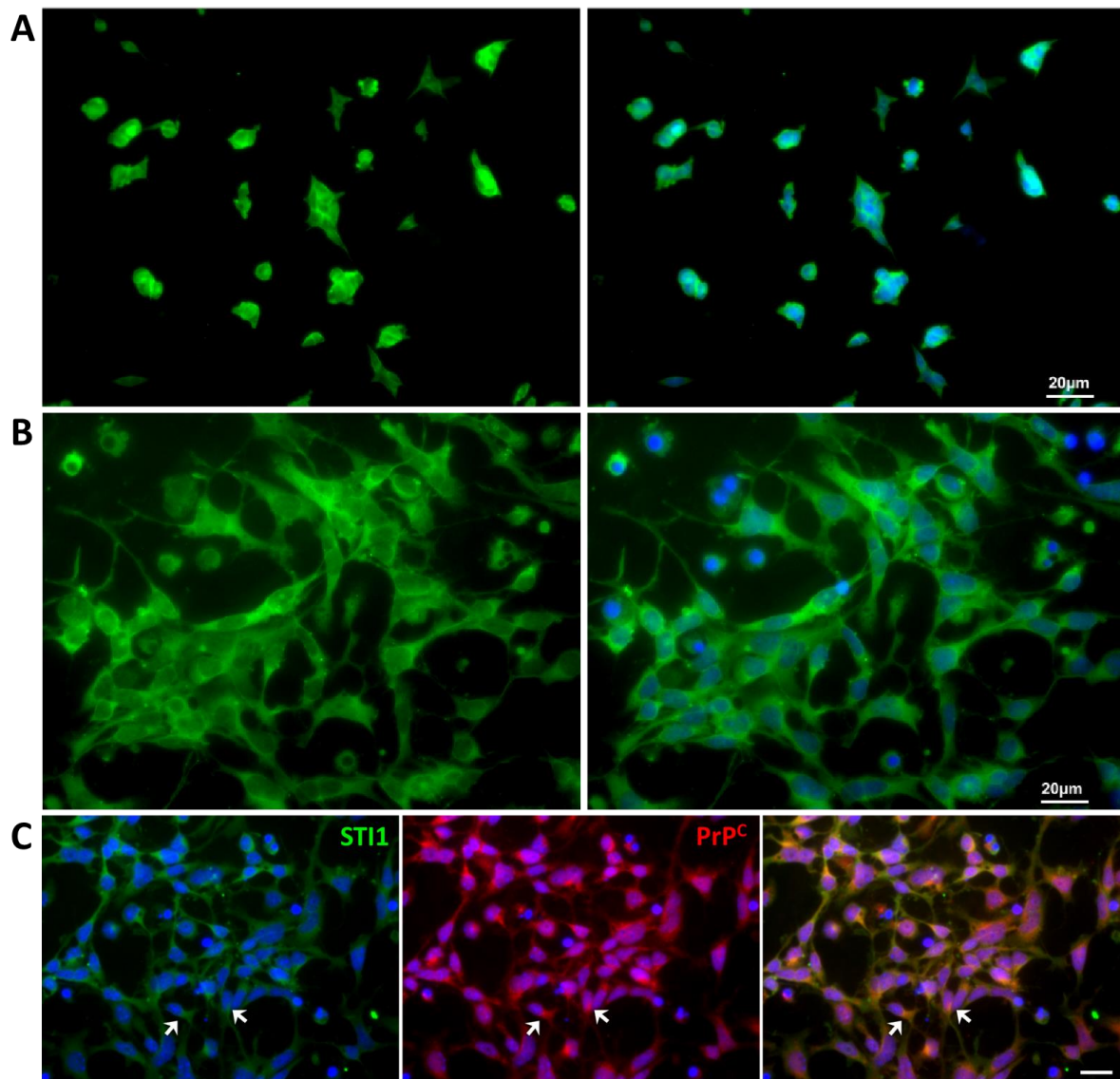


Figura 6 - Localização de STI1 em células-tronco embrionárias e precursores neurais. A: distribuição de STI1 em células-tronco embrionárias. **B:** Distribuição de STI1 em precursores neurais provenientes da diferenciação pelo mecanismo *default*. **C:** Distribuição de STI1 e PrP^c em precursores neurais. Setas indicam concentração de PrP^c próximo ao núcleo e último painel representa sobreposição das marcações. Núcleos marcados com DAPI. Imagens obtidas no microscópio de epifluorescência Axio Vert. A1 Carl Zeiss. Barras: 20 μm.

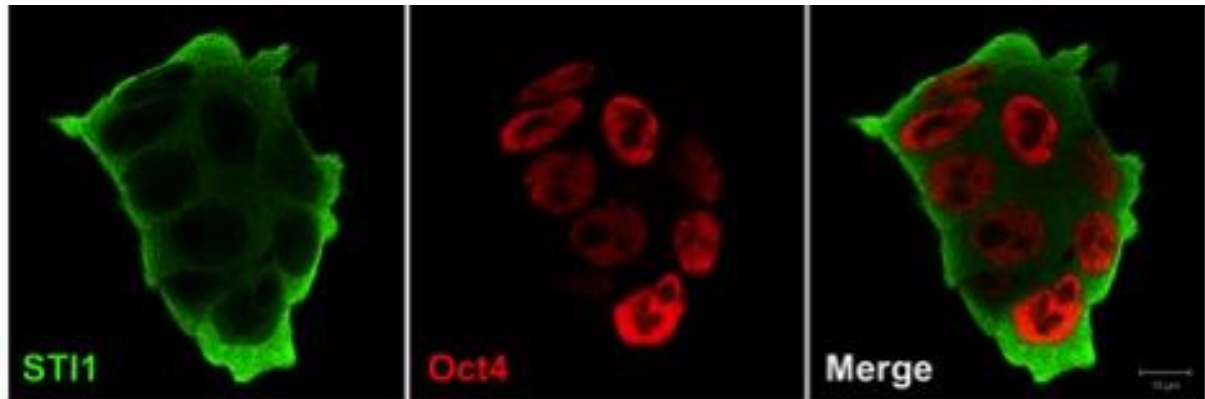


Figura 7 - Localização de STI1 em células-tronco embrionárias. Distribuição de STI1 em células-tronco embrionárias murinas. Núcleos evidenciados pelo marcador de pluripotência Oct3/4. Imagens obtidas no microscópio confocal multifóton – Zeiss LSM 780 NLO, CEFAP. Barra: 10 µm.

3.2.1.4 Análise de RNA

Para padronizar a quantidade ideal de células necessária para obtenção de uma quantidade de RNA de VEs ideal para análise de perfil de RNAs, uma purificação de VEs foi realizada por ultracentrifugação partindo do sobrenadante de 8 placas de CTEs. Ao final do processo de ultracentrifugação, o pellet foi ressuspensionado em Trizol e processado para extração de RNA segundo recomendações do fabricante e foi obtido um total de 1 µg de RNA final (Razão_{260/280} = 1,7).

O RNA extraído foi analisado usando Bioanalyzer, em que foi possível observar a integridade do material de RNA celular e o perfil de pequenos RNAs em amostra de VEs, corroborando o fato que VEs são enriquecidas em pequenos RNAs (Figura 8). No entanto, cuidado deve ser tomado ao se analisar RNAs provenientes de EVs isolados por ultracentrifugação a partir de meio condicionado preparado com soro depletado de vesículas. Primeiramente, o procedimento de depleção de vesículas em soro fetal bovino não garante eliminação completa de VEs de origem bovina. Em segundo lugar, o processo de ultracentrifugação traz junto com o pellet de VEs, outros complexos proteicos de densidade semelhante, os quais também são fontes de RNA circulantes, como ribonucleoproteínas e lipoproteínas. Portanto, ultracentrifugação por si não garante apenas análise de RNA provenientes de VEs (WEI et al., 2016).

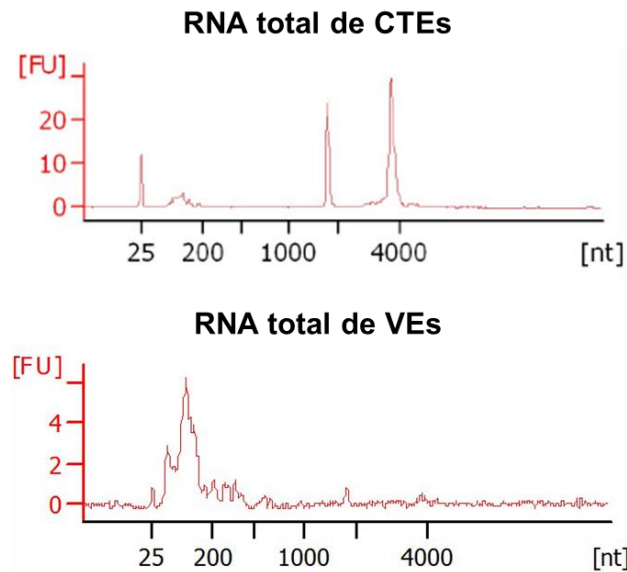


Figura 8 - Análise da integridade do RNA pelo Agilent 2100 Bioanalyzer. Amostras de RNA de CTEs e de vesículas extracelulares (VEs) de CTEs foram analisadas em Total RNA Pico chip no aparelho Bioanalyzer. Análise de RNA de VEs mostrou pico definido menor que 200 nt, confirmando um enriquecimento de pequenos RNAs. FU: *Fluorescence Units*; nt: *nucleotides*. Marcador de tamanho: pico referência de 25 nt.

3.2.2 Sobre biogênese de vesículas extracelulares em células-tronco embrionárias

3.2.2.1 Análise ultraestrutural de eventos celulares e corpos multivesiculares em células-tronco embrionárias murinas

Considerando a biogênese das VEs, foram analisados eventos celulares relacionados à liberação de vesículas nas proximidades da membrana plasmática bem como a presença de corpos multivesiculares (MVBs) no interior de CTEs E14Tg2a. Para isso, as células foram retiradas da placa usando *cell scraper*, centrifugadas e o *pellet* foi fixado com glutaraldeído para posterior embocamento e processamento para ME. Após análise ao microscópio, foram observadas CTEs caracterizadas por apresentarem um núcleo extenso, com citoplasma reduzido (Figura 9A), além de diversos eventos celulares relacionados a endo/exocitose (mediada por clatrina, por exemplo) com presença de pequenas vesículas nas proximidades da membrana plasmática (Figura 9B). Foram também encontradas formas vesiculares intracelulares contendo vesículas de diversos tamanhos em seu interior, estruturas conhecidas como MVBs (Figuras 9C e D).

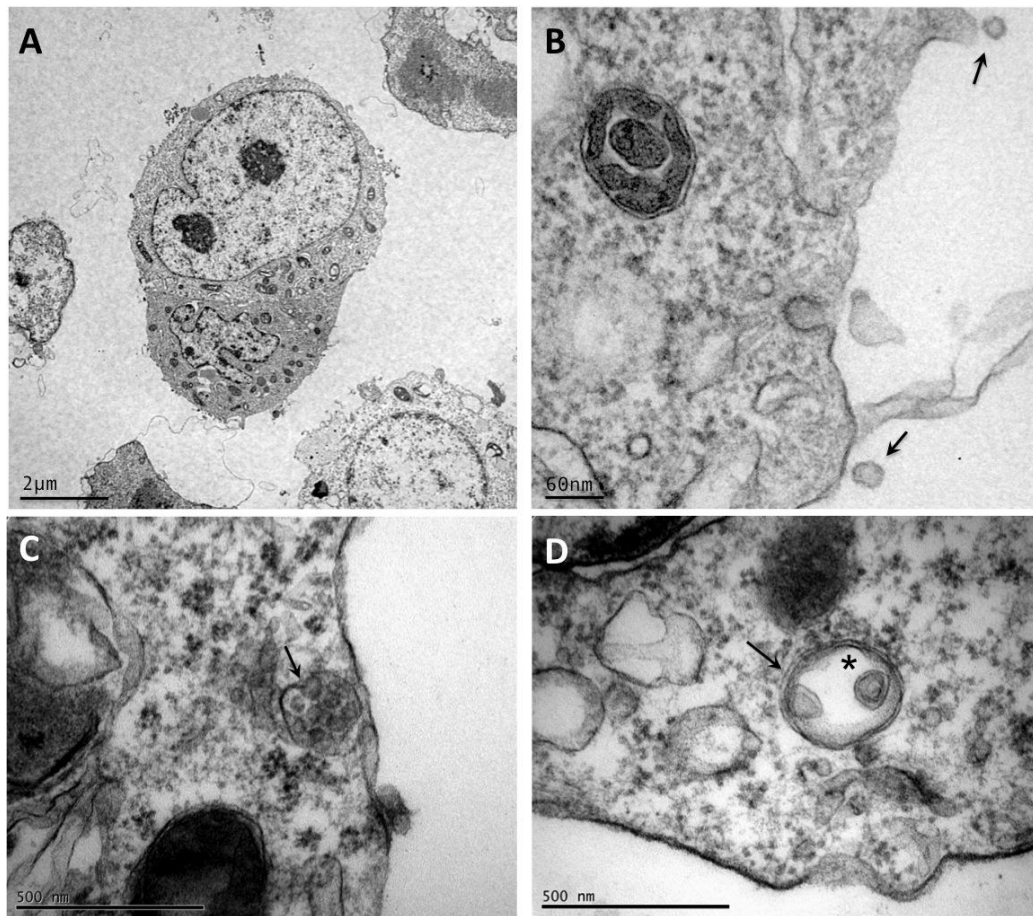


Figura 9 - Microscopia eletrônica de eventos celulares relacionados à secreção de vesículas extracelulares. **A:** Visão geral de célula-tronco embrionária murina E14-TG2a. Barra: 2 µm **B:** Eventos celulares na proximidade da membrana celular com presença de pequenas vesículas (setas). Barra: 60 nm. **C e D:** evidência de corpos multivesiculares no citoplasma da célula (setas). Barras: 500 nm *morfologia *cup shaped* de vesícula extracelular. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100 CX II.

Quando se retira as células de seu substrato de adesão, no caso a placa de plástico, a morfologia com que as mesmas crescem é alterada completamente. Devido a isso, outra abordagem foi utilizar uma membrana, ACLAR[®] Film (feito de resinas fluorinadas-clorinadas), resistente aos reagentes e procedimentos de processamento para ME. As células foram plaqueadas sob este filme, fixadas diretamente na membrana e processadas para ME. Desta forma, a morfologia das CTEs foi mantida. O resultado final obtido está representado na figura 10, em que é possível notar a preservação morfológica das CTEs crescendo em colônias em membrana ACLAR[®] Film (Figura 10B) quando comparada com a condição de

células soltas com *cell scraper* processadas em forma de *pellet* (Figura 10A). Além disso, organelas, como as mitocôndrias (Figura 11B e F) e complexo de Golgi (Figura 11C) bem como citoesqueleto de actina (Figura 11D) e citoplasma foram melhores preservados na condição da membrana ACLAR[®] Film.

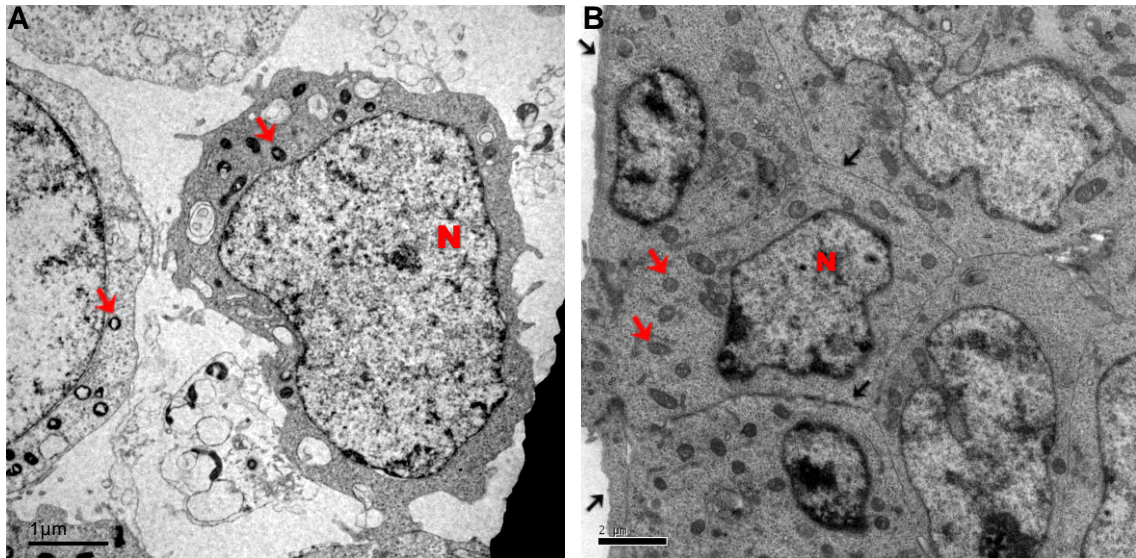


Figura 10 - Ultraestrutura de células-tronco embrionárias em dois diferentes métodos de processamento para microscopia eletrônica. A: CTEs em cultura foram retiradas da placa usando *cell scraper*, centrifugadas e o *pellet* consistente foi processado para ME. Nesta condição as células ficaram isoladas umas das outras e a morfologia não foi muito bem preservada. Barra: 1 μm. **B:** CTEs foram cultivadas diretamente em membrana ACLAR[®] Film e processada para ME. As CTEs foram preservadas em colônias (setas pretas à esquerda indicando limite periférico da colônia), não perderam as junções entre si (setas pretas à direita) e a morfologia ficou melhor preservada. Barra: 2 μm. Setas vermelhas indicam mitocôndrias. N: núcleo. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100 CX II.

Também foi possível detectar eventos relacionados à biogênese de vesículas como os MVBs (Figura 11E e F), porém foi raro visualizar eventos de liberação de microvesículas nas proximidades da membrana plasmática das células mais periféricas das colônias de CTEs (Figura 12C e D) uma vez que a membrana plasmática apresentou-se mais uniforme (Figuras 10B setas pretas à esquerda, 11D, 12C e D), com citoesqueleto de actina bem conservado (Figura 11D).

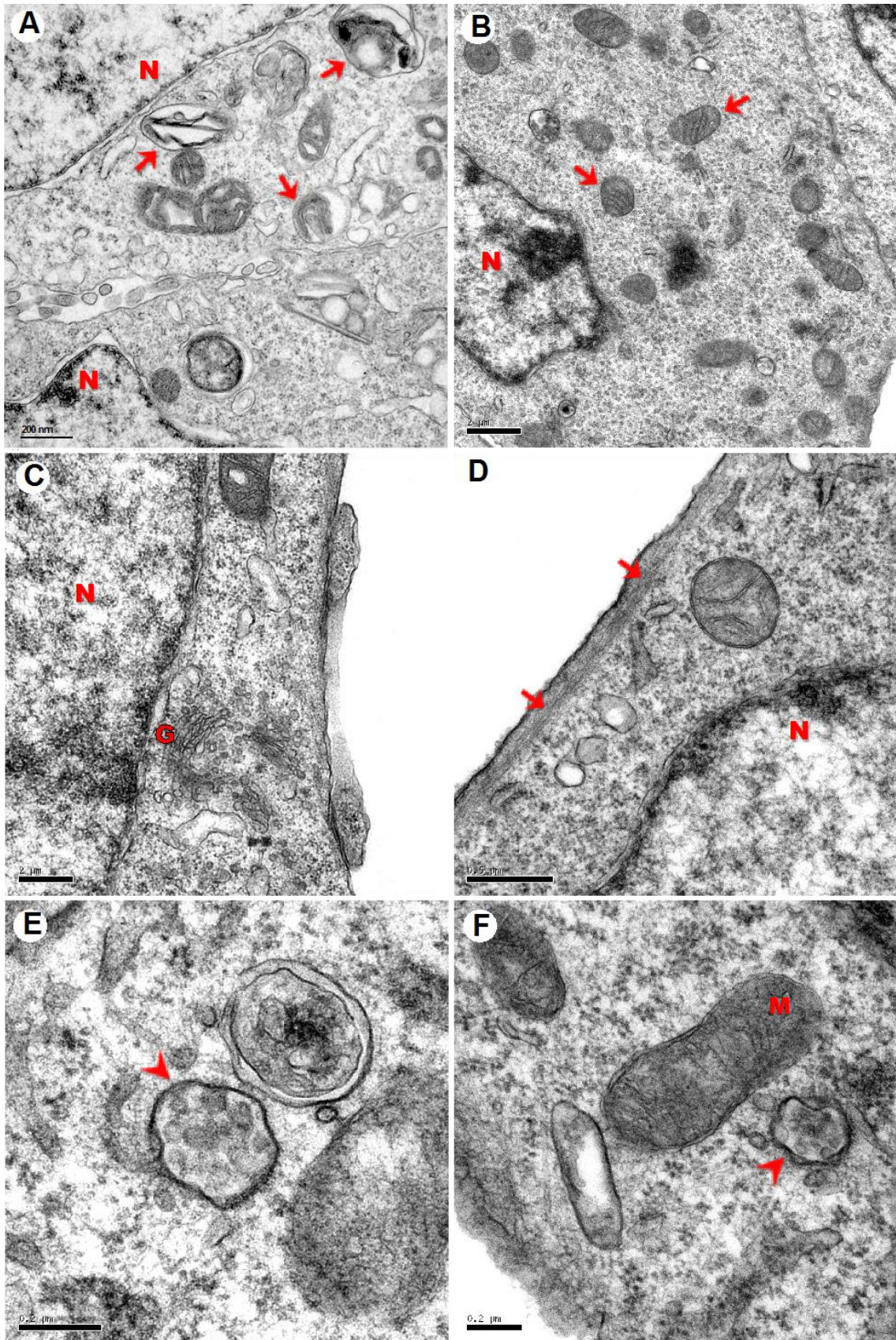


Figura 11 - Análise ultraestrutural de células-tronco embrionárias. **A:** Evidência de mitocôndrias (setas) e citoplasma mal preservados antes de realizar ajustes no processamento da amostra. Barra: 200 nm. **B:** Evidência de mitocôndrias (setas) e citoplasma bem preservados após ajustes no processamento da amostra. Barra: 2 µm. **C:** Evidência do complexo de Golgi (G) bem preservado. Barra: 2 µm. **D:** Evidência de citoesqueleto de actina bem preservado (setas). Barra: 0,5 µm. **E e F:** Evidência de corpos multivesiculares (MVBs) (cabeças de setas). Barra: 0,2 µm. M: mitocôndria, N: núcleo, G: complexo de Golgi. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100 CX II.

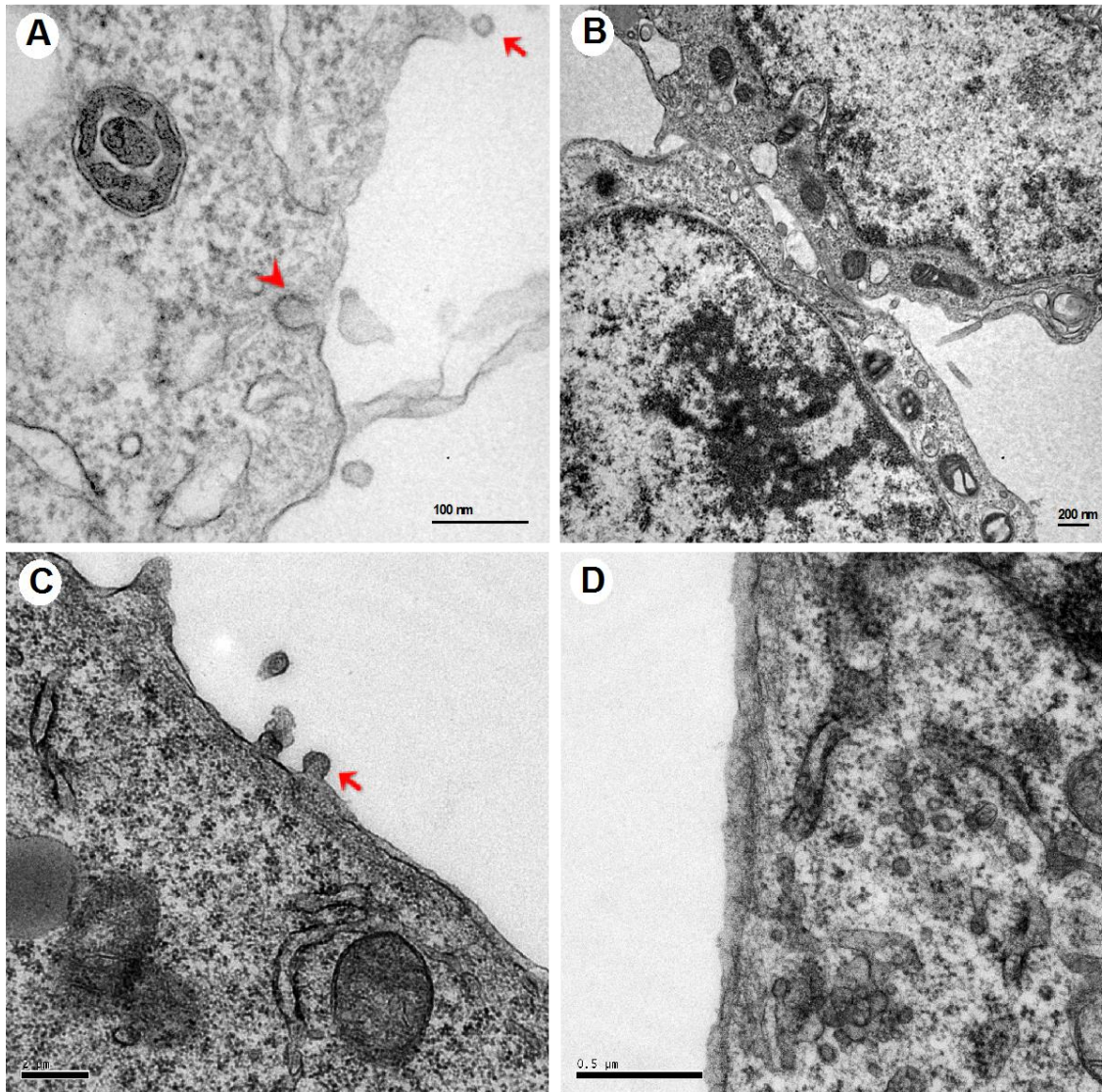


Figura 12 - Análise ultraestrutural de células-tronco embrionárias evidenciando proximidades e deformações membrana plasmática. **A e B:** Células-tronco retiradas com *cell scraper* da placa, centrifugadas, fixadas e emblocadas onde é possível observar células individualizadas com a membrana plasmática mais irregular com microvesículas (seta) e endo/exocitose de vesículas nas proximidades da mesma. Cabeça de seta: endocitose mediada por clatrina. Barras: A – 100 nm, B – 200 nm. **C e D:** Células-tronco plaqueadas sobre membrana ACLAR[®], com membrana plasmática mais uniforme e com eventos raros de liberação de vesículas (seta). Barras: C – 2 µm, D – 0,5 µm.

Estes experimentos mostraram ser promissores para caracterização de VEs e corpos multivesiculares das CTEs E14Tg2a. Uma visão geral da biogênese de vesículas extracelulares está esquematizado na Figura 13, com exemplos de imagens próprias obtidas no laboratório.

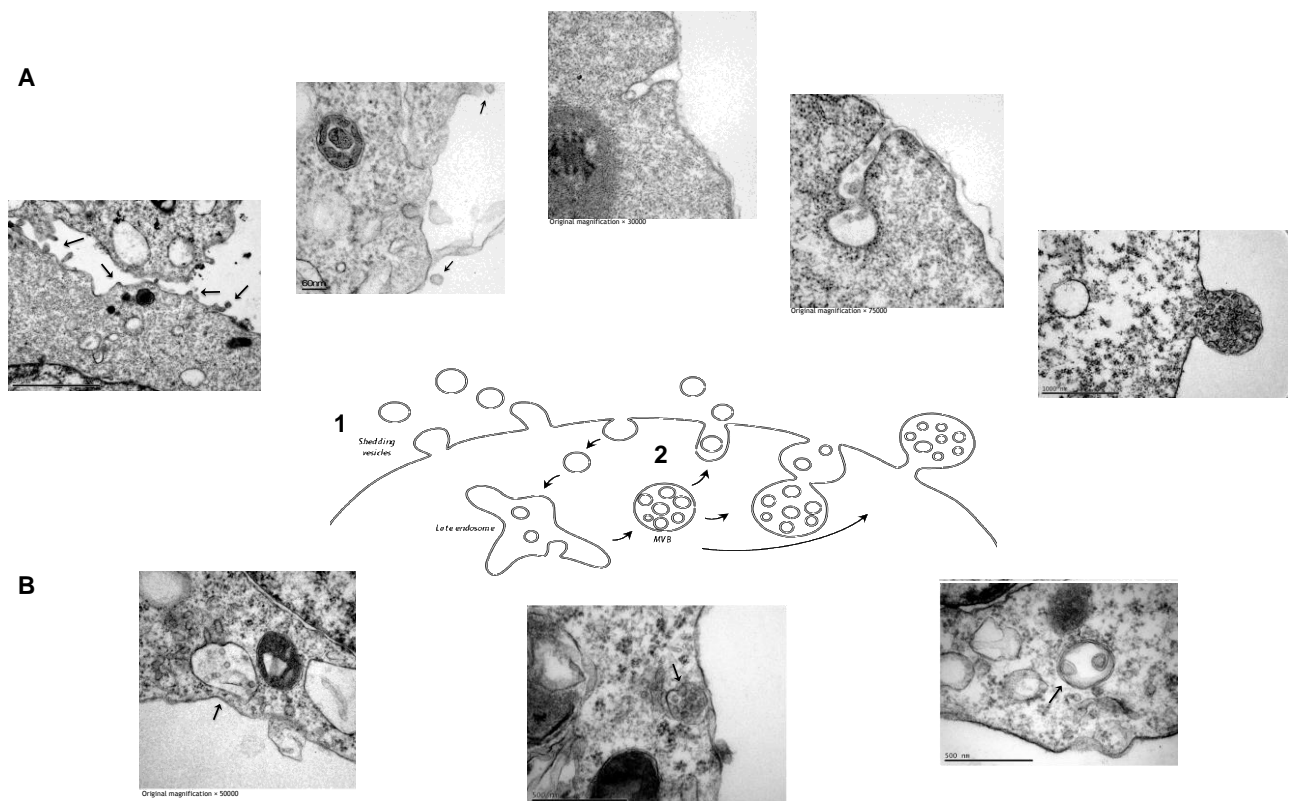


Figura 13 - Eventos de biogênese de vesículas extracelulares em células-tronco embrionárias murinas. Vesículas extracelulares incluem microvesículas que brotam da membrana citoplasmática (1) e de exossomos encontradas em corpos multivesiculares (MVBs) formadas através da via endocítica (2). MVBs fundem com a membrana e liberam as vesículas para o meio extracelular. **A:** Microscopia eletrônica de transmissão representativa da liberação de VEs a partir da superfície de células-tronco embrionárias murinas. **B:** Microscopia eletrônica de transmissão representativa mostrando MVBs no interior das células-tronco embrionárias murinas.

3.2.2.2 Localização por imunofluorescência de marcadores da biogênese de vesículas

Exossomos são definidos por VEs secretadas correspondentes às vesículas

intraluminais de MVBs as quais são formadas durante a maturação dos endossomos. Alguns MVBs são destinados à degradação, enquanto que outros podem fundir à membrana plasmática, levando à secreção das vesículas intraluminais como exossomos (BOBRIE et al., 2012; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). A geração de vesículas intraluminais no interior dos MVBs envolve uma segregação lateral do conteúdo, da membrana endossomal, sequestro da carga, a formação de uma vesícula que brota da membrana para o interior do endossomo e a liberação para o lúmen do endossomo da vesícula contendo uma pequena porção do citosol (COLOMBO et al., 2013).

Os componentes do *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) estão envolvidos na biogênese de MVBs e das vesículas intraluminais. ESCRTs consistem de aproximadamente 20 proteínas que se agrupam em 4 complexos (ESCRT-0, -I, -II e -III) com proteínas associadas (VPS4, VTA1, ALIX) (HENNE; BUCHKOVICH; EMR, 2011; ROXRUD; STENMARK; MALERØD, 2010). O complexo ESCRT-0 reconhece e sequestra proteínas ubiquitinadas na membrana endossomal, enquanto que os complexos ESCRT-I (Tsg101, Vps28, Vps37, MVB12, and UBAP1) e -II (VPS36, VPS22, VPS25) parecem ser responsáveis pela deformação da membrana para formação de vesículas intraluminais juntamente com a carga sequestrada, e os componentes do ESCRT-III (CHMP 1-7, IST1) subsequentemente levam à separação das vesículas para dentro do MVB (HANSON; CASHIKAR, 2012; HURLEY; HANSON, 2010; WOLLERT et al., 2009).

A liberação dos exossomos envolve contribuições de diversas proteínas Rab, uma subfamília de pequenas GTPases com mais de 60 membros, envolvidas na regulação de transporte de vesículas intracelulares por meio da interação com moléculas efetoras específicas (STENMARK, 2009; VILLARROYA-BELTRI et al., 2014).

Diante deste cenário, outra abordagem adotada para caracterização da biogênese de exossomos em CTEs foi usar marcadores da via para visualizar presença e localização dos mesmos nas CTEs por reação de imunofluorescência indireta. Para tanto, os seguintes marcadores LBPA, VPS36, VPS4 e Rab27b foram usados. Marcadores como Nanog ou Oct3/4 foram usados para certificar a natureza pluripotente das CTEs.

Observou-se uma distribuição perinuclear de LBPA, um lipídeo presente em vesículas intraluminais que geralmente são destinados aos lisossomos. VPS36, membro do complexo ESCRT-II, e Rab27b, molécula que participa do transporte de vesículas à membrana, apresentaram uma distribuição típica pontilhada pelo citoplasma. VPS4, proteína acessória da maquinaria ESCRT, apresentou-se difusa pelo citoplasma, apesar de se esperar distribuição pontilhada (Figura 14).

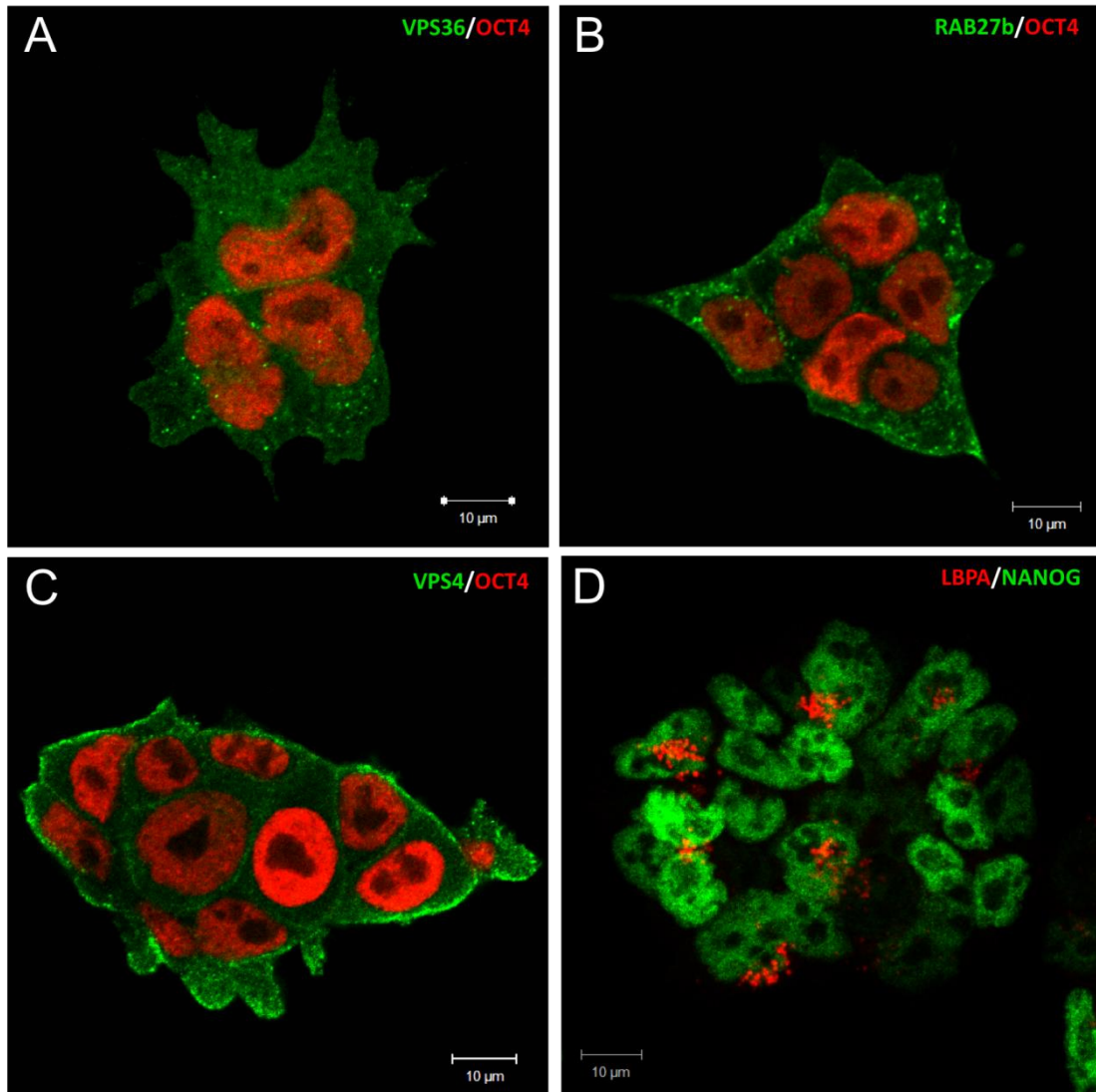


Figura 14 - Expressão de componentes da maquinaria da biogênese de vesículas extracelulares em células-tronco embrionárias. A. marcação de *lysobisphosphatidic acid* (LBPA, marcador de vesículas intraluminais) em vermelho e Nanog em verde; B. *Vacuolar Protein Sorting 36* (VPS36, membro de ESCRT-II) em verde e Oct4 em vermelho; C. *Vacuolar Protein Sorting 4* (VPS4, uma AAA ATPase, proteína acessória da maquinaria ESCRT) em verde e Oct4 em vermelho; D. Rab27b (*Rab GTPase* que regula exocitose de vesícula) em verde e Oct4 em vermelho. Nanog e Oct4, com localização nuclear, foram usados como marcadores de pluripotência das CTEs. Barras: 10 µm.

Estes marcadores da via endocítica também foram detectados em embriões de camundongo em fase de blastocisto (E 3.5), fase na qual foi possível detectar a massa celular interna com expressão nítida de marcadores de pluripotência (Nanog ou Oct4) (Figura 15). Interessante observar a diferença morfológica dos blastocistos entre os *backgrounds* genéticos C57BL/6 e C57BL/6/OLA.

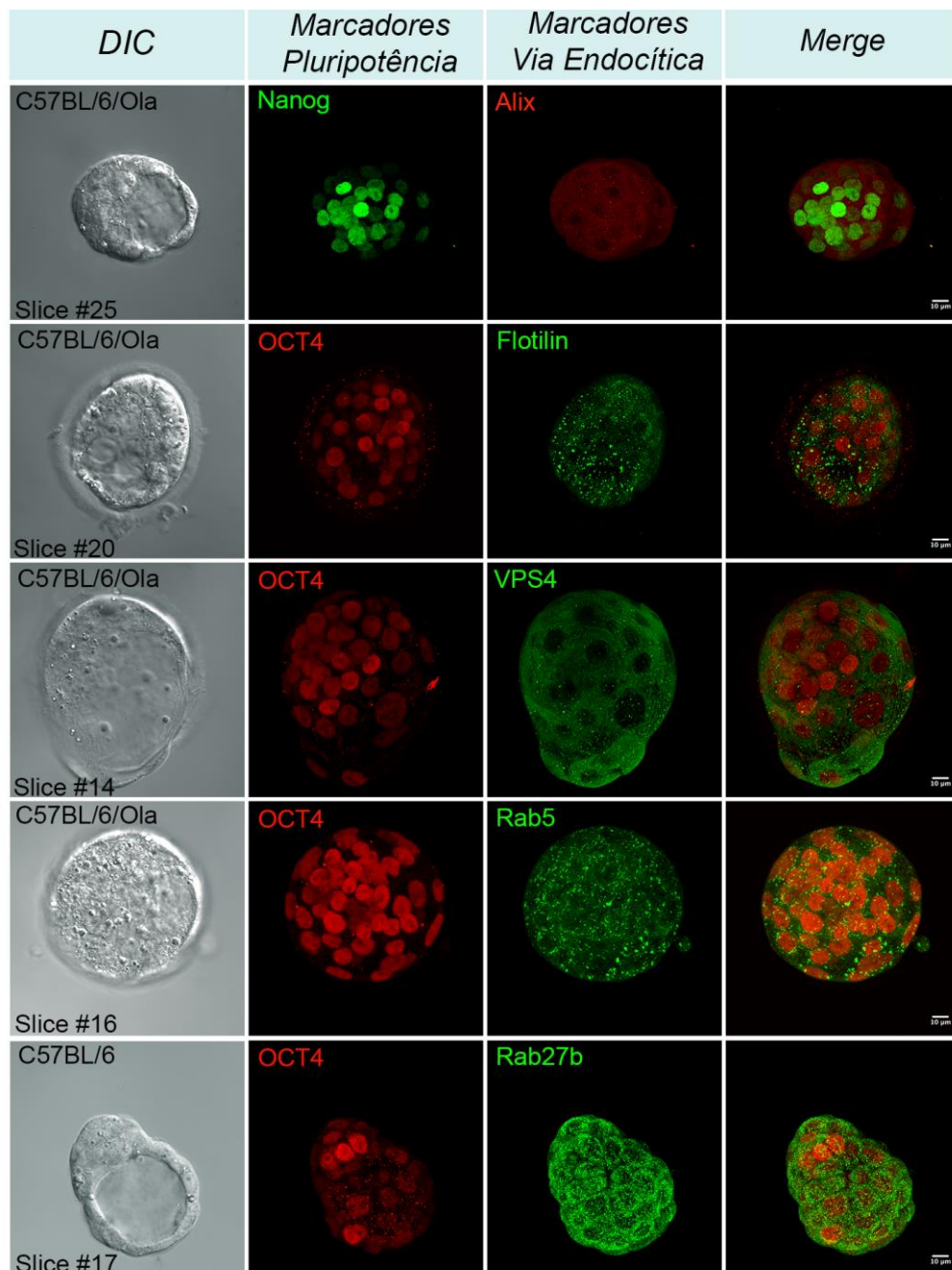


Figura 15 - Expressão de marcadores da via endocítica e biogênese de vesículas em embriões. Embriões em estágio de blastocisto de *background* genético C57BL/6 e C57BL/6/OLA foram marcados com anti-Alix, proteína acessória de ESCRT; anti-flotilina, proteína envolvida em eventos de tráfego endossomal; anti-*vacuolar protein sorting 4* (VPS4), uma AAA ATPase que participa da maquinaria ESCRT; anti-Rab5, uma Rab GTPase associada com eventos de sorting e fusão endossomal; anti-Rab27b, uma Rab GTPase que regula exocitose de vesículas. Nanog e Oct4 foram utilizados como marcadores de pluripotência. DIC: *Differential interference contrast*. Merge: sobreposição de imagens. Barras de escala: 10 µm.

3.2.3 Sobre padronização da diferenciação neuronal

3.2.3.1 Análise morfológica e por imunofluorescência indireta

Após várias tentativas de padronização da diferenciação neuronal, a que apresentou melhor resultado foi o método de *default* em monocultura, sem envolver formação de neuroesfera (Figura 16).

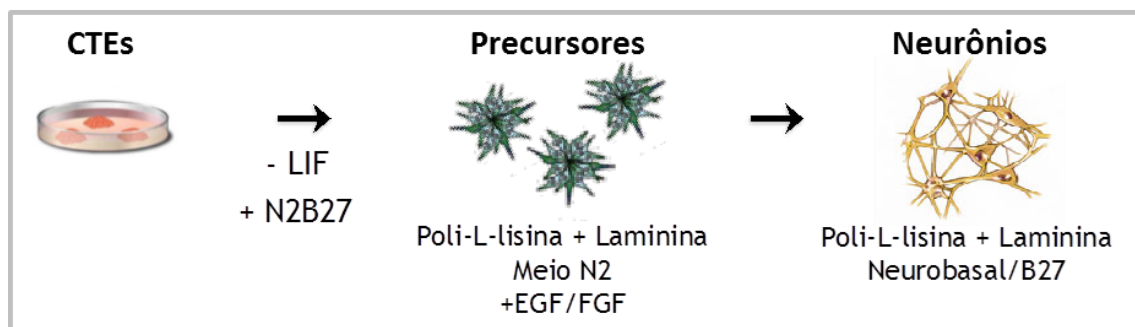


Figura 16 - Esquema de diferenciação neuronal por mecanismo *default*. CTEs foram plaqueadas em baixa densidade em placas pré-tratadas com gelatina em meio GMEM+SORO+LIF. Após 24 h, o meio foi descartado, as células lavadas com PBS e o meio foi trocado pelo N2B27. Este meio foi trocado todos os dias até completar 5-7 dias de cultivo. As células, consideradas precusores neurais, foram então dissociadas e semeadas em placas pré-tratadas com poli-L-lisina/laminina em meio N2 + EGF/FGF. Os precusores foram expandidos neste meio e para diferenciação neuronal o meio foi trocado pelo N2B27, na ausência de fatores de crescimento.

Com este protocolo, após a indução da diferenciação pelo mecanismo *default* através do cultivo das CTEs com meio N2B27 por 5-7 dias, as células foram dissociadas e semeadas em placas pré-tratadas com poli-L-lisina/laminina. As células, consideradas nesta etapa como precusores neurais, foram mantidas e expandidas como precusores em meio N2 e EGF/FGF (Figura 17).

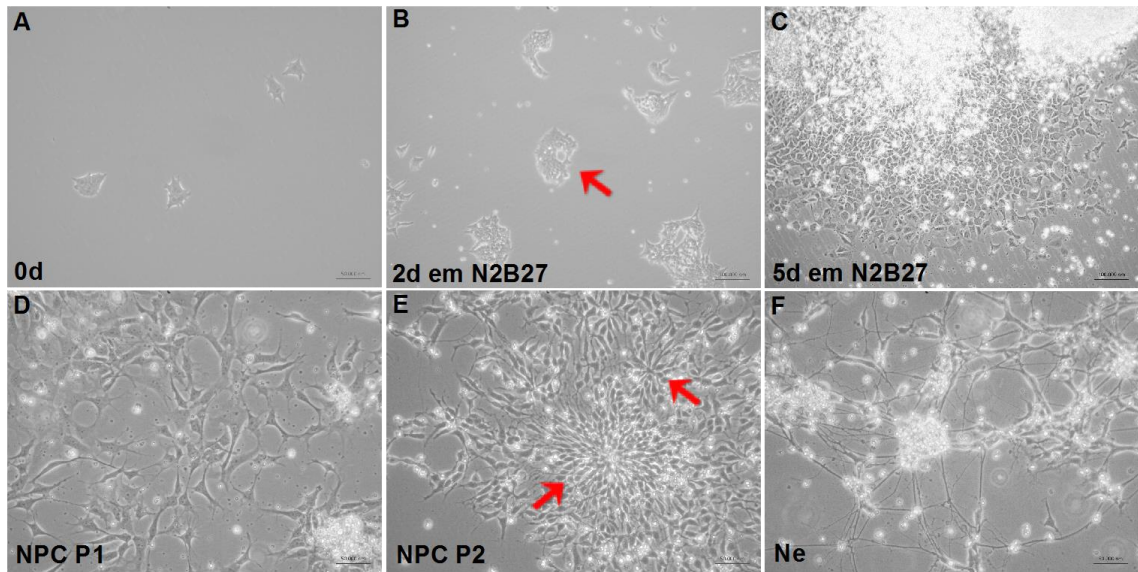


Figura 17: Time course da diferenciação neuronal pelo mecanismo *default*. **A:** Células-tronco plaqueadas em baixa densidade, dia 0 da diferenciação. Barra: 50 μm . **B:** 2 dias após cultivo em N2B27, com formação de colônias em meia lua (seta). Barra: 100 μm . **C:** 5 dias após cultivo em N2B27, colônias grandes, com células com características de precursores neurais. Barra: 100 μm . **D:** Passagem 1 de *neural precursor cells* (NPC P1). Barra: 50 μm . **E:** Passagem 2 de *neural precursor cells* (NPC P2), com formação de rosetas (setas). Barra: 50 μm . **F:** Neurônios (Ne) em formação. Barra: 50 μm .

Na etapa de precursores, foram observadas estruturas descritas na literatura como rosetas (Figura 17E), que são presentes em culturas de precursores neurais de murinos e humanos e que representariam o tubo neural durante o desenvolvimento neural embrionário *in vivo* (ABRANCHES et al., 2009; EIRAKU et al., 2008; ELKABETZ; STUDER, 2008). A presença das rosetas é um ótimo indício de que a diferenciação neural está prosseguindo bem. Características morfológicas evidentes durante a diferenciação encontram-se em destaque na Figura 18.

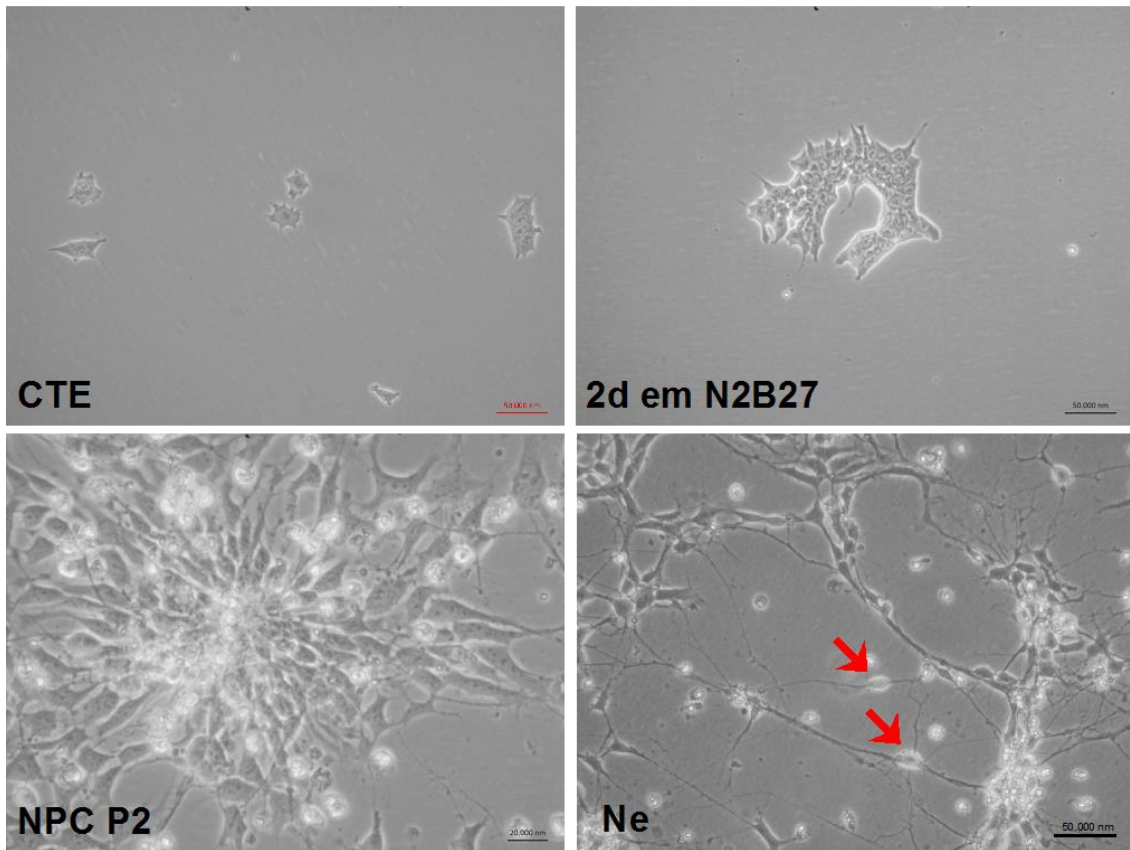


Figura 18 - Características morfológicas das células durante a diferenciação neuronal. CTE: Células-tronco embrionárias, dia do plaqueamento, baixa densidade de células para começar diferenciação. Barra: 50 μm. **2d em N2B27:** 2 dias após cultivo em N2B27, as células proliferaram e as colônias adquiriram um formato de meia-lua. Barra: 50 μm. **NPC P2:** Roseta em evidência durante manutenção de precursores neurais (*Neural precursor cells*, Passagem 2, NPC P2). Barra: 20 μm. **Ne:** Neurônios caracterizados por apresentar corpo celular mais refringente (setas) e prolongamentos celulares evidentes. Barra: 50 μm.

Além disso, foi observado por imunofluorescência que a população de precursores da passagem 2 foi praticamente toda positiva para nestina ou β III tubulina, confirmando que a cultura está enriquecida em precursores neurais e neurônios imaturos (Figura 19). Isso novamente confirmou a obtenção de uma população homogênea de precursores neurais o que comprovou uma diferenciação promissora.

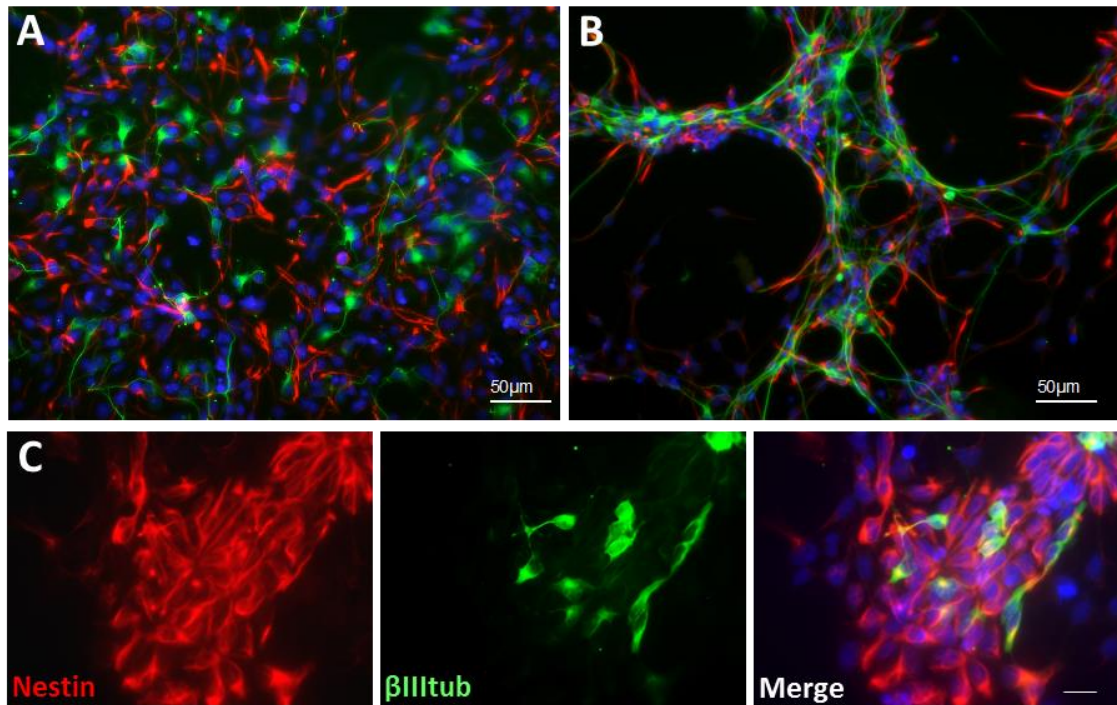


Figura 19 - População de precursores neurais gerados pelo mecanismo *default*. A-C: Presença de células positivas para nestina em vermelho, e β III tubulina em verde, em precursores neurais obtidos em experimentos independentes. Núcleos marcados com DAPI, em azul. C: Precursores em forma de roseta positivos para nestina (nestin) e células positivas para β III tubulina (β III tub). Merge: sobreposição dos canais vermelho, verde e azul. Barra: 20 μ m.

De acordo com a literatura, a diferenciação em neurônios a partir dos precursores neurais em expansão é um pouco mais complicada e não muito eficiente. Além disso, atualmente está cada vez mais sendo exigido o tipo neuronal a ser diferenciado, devido a implicações diferentes em função das características de cada fenótipo neuronal (gabaérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, neurônio motor, etc). Bibel et al. (2007) descreveram que, pelo protocolo de diferenciação utilizando corpo embrióide, os neurônios obtidos são na maioria glutamatérgicos (BIBEL et al., 2007). Por outro lado, o protocolo pelo mecanismo *default* gera neurônios em sua maioria gabaérgicos e glutamatérgicos porém, outros tipos neuronais também são vistos em menor quantidade como neurônios dopaminérgicos (células positivas para tirosina hidroxilase) (CONTI et al., 2005; YING; SMITH, 2003). De fato, o enriquecimento em um ou outro tipo neuronal específico pode ser induzido por fatores extrínsecos acrescentados no meio de cultura durante o protocolo. Por exemplo, a adição dos fatores FGF8 e Shh resulta no aparecimento de uma

quantidade significativa de células positivas para tirosina hidroxilase (YING; SMITH, 2003). A combinação de ácido retinóico e, posteriormente, de Shh induz diferenciação em neurônio motor (WICHTERLE et al., 2002). Entretanto, a caracterização molecular da identidade neuronal das células provenientes da diferenciação *in vitro* de CTEs ainda é assunto de debate e estudos, muito se deve à complexidade do desenvolvimento neural embrionário *in vivo* que envolve uma intrincada padronização espacial e temporal de precursores e neurônios em formação.

Diante da dificuldade de expansão de precursores neurais por diversas passagens para obtenção de meio condicionado para análises posteriores, bem como da complexidade em se obter neurônios mais enriquecidos para um tipo neuronal em larga escala, decidimos dar continuidade ao estudo em colaboração no exterior com os grupos da Dra. Xandra Breakefield, do Dr. Cristopher Bragg do Massachusetts General Hospital e da Dra. Anna Krichevsky do Brigham and Women's Hospital. Fruto do trabalho desenvolvido durante este período de doutorado sanduiche está apresentado na Parte 2.

3.3 Conclusões

Com base no que foi apresentado e discutido na parte 1 da tese, podemos concluir que:

- Ultracentrifugação permite isolamento de VEs com formato *cup shaped* evidente, com marcadores típicos de VEs e com tamanho predominantemente por volta de 150 nm.
- VEs isoladas por ultracentrifugação são enriquecidas em RNAs pequenos.
- Análise ultraestrutural de CTEs mostrou eventos de liberação/*uptake* de vesículas bem como MVBs evidentes no ambiente intracelular, típicos da biogênese de exossomos.
- CTEs possuem núcleo grande e citoplasma reduzido caracterizado pela quantidade elevada de mitocôndrias evidenciado por ME.
- CTEs e embriões em fase de blastocisto expressaram alguns componentes da maquinaria de biogênese de vesículas (membros de complexo ESCRT).
- Diferenciação neuronal pelo mecanismo *default* gera população de precursores neurais com morfologia de rosetas e expressão de marcadores esperados.

4 PARTE 2 - PERFIL DE miRNAs INTRACELULARES E LIBERADOS VIA VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES HUMANAS INDUZIDAS

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Desenho experimental do projeto

De acordo com os objetivos propostos, o modelo de diferenciação neural de células-tronco pluripotentes humanas induzidas (hiPSCs) foi realizado para obtenção de dois tipos celulares com fenótipo neural, células-tronco neurais (NSCs) e progenitores dopaminérgicos da placa basal do tubo neural (FPPs). A diferenciação foi realizada em três amostras biológicas distintas, ou seja, de hiPSCs provenientes de três indivíduos diferentes. A diferenciação foi realizada uma única vez para cada amostra biológica, não havendo réplica técnica da mesma. Para cada amostra biológica de cada grupo celular, foram coletados RNAs de vesículas e RNAs intracelulares para posterior análise do perfil de miRNAs. Assim, o experimento foi delineado com 3 grupos celulares (iPSCs, NSCs e FPPs), 3 amostras biológicas e 2 fontes de RNAs de cada amostra (vesículas e intracelular), resultando em um total de 18 amostras de RNAs para análise de perfil de miRNAs (Figura 20).

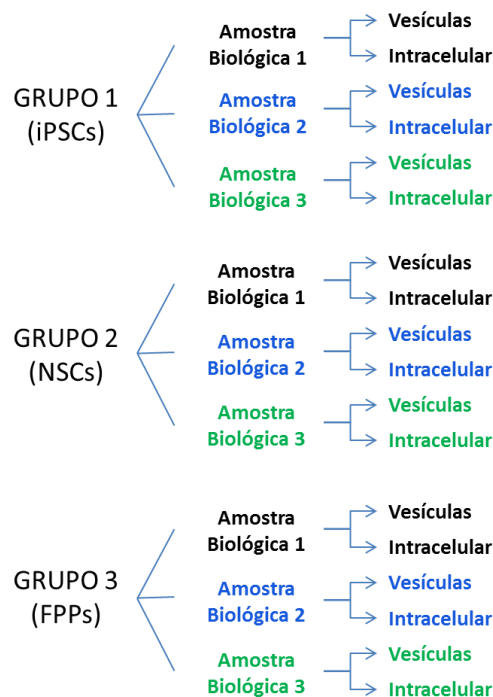


Figura 20 - Desenho experimental do projeto. O trabalho foi delineado com base na utilização de RNAs intracelulares e de vesículas extracelulares de três grupos celulares (iPSCs, NSCs e FPPs) obtidos pela diferenciação neural a partir de hiPSCs. O estudo foi conduzido com triplicata biológica pelo maior poder estatístico biológico quando comparado à réplica técnica.

4.1.2 Cultivo de células-tronco pluripotentes humanas induzidas

hiPSCs foram geradas por reprogramação de fibroblastos de pele de indivíduos do gênero masculino pelo método de transfecção de mRNA (WARREN et al., 2010). O uso de hiPSCs foi previamente aprovado pelo comitê de revisão institucional do Massachusetts General Hospital e o estudo foi desenvolvido seguindo *National Institutes of Health Guidelines for Human Stem Cell Research*. hiPSCs foram mantidas em meio E8 (Essential 8™ *Basal Medium* com adição de Essential 8™ *Supplement* (50X) e antibiótico penicilina/estreptomicina 1%), em superfície coberta com Geltrex™ *Basement Membrane Matrix* (Thermo Fisher Scientific). O meio E8 foi trocado diariamente e as células foram passadas em forma de colônias a cada 3-4 dias com solução EDTA 0,5 M, pH 8,0.

4.1.3 Diferenciação de hiPSCs em células-tronco neurais e em progenitores da placa basal do tubo neural – FPPs

Diferenciação foi realizada seguindo o protocolo de indução e expansão de células-tronco neurais da Thermo Scientific. Brevemente, hiPSCs foram plaqueadas em forma de colônias em placas cobertas com Geltrex™ na presença do meio E8. Sob confluência ideal de 10-20%, o meio foi trocado para meio de Indução neural (Meio Neurobasal com Gibco™ *Neural Induction Supplement*, Thermo Fisher Scientific). O meio foi trocado nos dias 2, 4 e 6 após início da indução. No dia 7, as células foram dissociadas com acutase (*StemPro Accutase cell dissociation reagent*) e replaqueadas em placas cobertas com Geltrex™. As células, consideradas nesta etapa de células-tronco neurais (NSCs), foram mantidas em meio de expansão (Neurobasal 49 mL + *Advanced DMEM/F12* 49 mL + Gibco™ *Neural Induction Supplement* 2 mL). O meio foi trocado a cada 2 dias e as células passadas a cada 4-5 dias. As mesmas foram usadas em experimentos entre passagens 2 e 5.

Diferenciação em progenitores dopaminérgicos (FPPs) foi realizada de acordo com protocolo do *kit PSC Dopaminergic Neuron Differentiation* (Thermo Fisher

Scientific). hiPSCs foram plaqueadas como *single cells* em placas cobertas com vitronectina e em meio E8. Após 24 h, o meio foi trocado para *Floor Plate Specification Medium*. Nos dias 3, 5, 7 e 9 o meio foi trocado mantendo *Floor Plate Specification Medium*. No dia 10, as células foram dissociadas com acutase e plaqueadas sob laminina em meio *Floor Plate Expansion Medium*. O meio foi trocado a cada 2 dias e os progenitores foram passados a cada 4 dias. As células progenitoras foram utilizadas em experimentos entre passagens 2 e 5.

4.1.4 Reação de Imunofluorescência indireta

Células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços previamente tratadas com Geltrex™ (hiPSCs e NSCs) ou laminina (FPPs). Após 24-48 h, o meio de cultura foi retirado e as células fixadas com PFA 4% (20min, à temperatura ambiente), e então, lavadas três vezes com PBS 1X. As lamínulas (imersas em PBS) foram armazenadas a 4 °C até realização de etapas seguintes de bloqueio e incubação com anticorpos.

O bloqueio foi realizado com incubação das lamínulas em solução de permeabilização/bloqueio: PBS + 0.3% Triton X-100 + 5% BSA (1 h, à temperatura ambiente). Anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4 °C em solução PBS + 0,1% Triton X-100 + 1% BSA. Após 18 h, as lamínulas foram lavadas três vezes para prosseguir com incubação dos anticorpos secundários e DAPI (para marcação nuclear) por uma hora (no escuro, à temperatura ambiente). Para finalizar, as lamínulas foram lavadas três vezes e montadas com *ProLong® Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific).

4.1.5 Coleta de meio condicionado e isolamento de vesículas extracelulares

Meios condicionados foram coletados e processados imediatamente seguindo etapas de centrifugação. Basicamente, em centrífuga refrigerada, os meios foram submetidos a 300 x g por 10 min, sobrenadantes recuperados e submetidos novamente a 2000 x g por 20 min, sobrenadantes recuperados e filtrados em filtro

0,8 µm. Em seguida, os meios foram armazenados a -80 °C até o momento de isolamento de VEs.

Para isolamento de VEs, os meios estocados em -80 °C foram descongelados em banho de água à temperatura ambiente, e submetidos à ultracentrifugação ou à coluna do *kit* comercial exoEasy Maxi Kit (QIAGEN, Hinden, Alemanha). Para ultracentrifugação, meios foram alocados em tubos específicos com vedação, balanceados adequadamente e posicionados em rotor de ângulo fixo na ultracentrífuga Optima XE-90 (Beckman Coulter, Brea, EUA). Os meios foram ultracentrifugados por 2 h a 100000 x *g*, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em tampão de lise do *kit* miRCURY™ (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) de extração de RNA.

Para o exoEasy, os meios foram misturados com *Binding Buffer* na proporção 1:1. 8 mL foram colocados na coluna e submetidos a centrifugação à temperatura ambiente por 1 min a 500 x *g*. Este passo foi repetido até a completa centrifugação dos 32 mL. Após, seguiu-se com centrifugação 3000 x *g* por 1 min, 10 mL de *Wash Buffer* foi adicionado e novamente centrifugado a 3000 x *g* por 5 min. O tubo de coleta foi trocado e então, 400 µL de *Lysis Buffer* do *kit* mirCURY™ (Exiqon) foi adicionado na coluna e incubado por 1 min. Após centrifugação a 500 x *g* por 1 min, o eluato foi coletado e incubado na coluna novamente e depois centrifugado a 3000 x *g* por 5 min. O lisado foi processado para extração de RNA seguindo protocolo do *kit* miRCURY™ (Exiqon).

4.1.6 Extração de RNA de células e VEs

Células (hiPSCs, NSCs e FPPs) foram tripsinizadas, contadas e 3×10^6 células foram alocadas em microtubos, centrifugadas a 300 x *g* por 3 min. O sobrenadante foi aspirado e as células foram lavadas com D-PBS, centrifugadas a 300 x *g* por 3 min, sobrenadante aspirado e o *pellet* armazenado imediatamente a -80 °C.

RNA de VEs foi extraído com protocolo adaptado do *kit* exoEasy (QIAGEN) de isolamento de VEs. Basicamente, na etapa de eluição, foi usado tampão de lise

do *kit* miRCURY™ (Exiqon) de extração de RNA de modo a lisar vesículas retidas na coluna e seguir com o protocolo para obtenção de RNA.

Para extração de RNA, tampão de lise foi adicionado ao *pellet* de células. O lisado celular e o de VEs foram submetidos a etapas de extração de RNA de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante com pequenas modificações. Entre todas as lavagens e etapas de descarte de *flow through*, os tubos de coleta foram trocados por novos para evitar contaminação. Etapa final de eluição foi realizada com 50 µL de Ambion® água livre de nuclease (Thermo Fisher Scientific).

Amostras foram dosadas por absorvância utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) e por fluorescência utilizando o fluorômetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific). Para dosagem pelo Qubit, amostras foram preparadas com kit Qubit® *RNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com protocolo do fabricante.

4.1.7 Análise de perfil e integridade de RNA usando Bioanalyzer

Amostras de RNAs das células e VEs foram diluídas em água livre de nuclease para concentração abaixo de 5 ng/µL e analisadas utilizando Agilent RNA 6000 Pico chip e o aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) de acordo com recomendações do fabricante.

4.1.8 Síntese de cDNA

Síntese de cDNA por transcrição reversa foi realizada com o *kit* TaqMan® *MicroRNA Reverse Transcription kit* e primers *Megaplex™ RT Primers, Human Pool A e Human Pool B* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com instruções contidas em *Megaplex™ Pool Quick Reference Card*.

Mix da reação de transcrição reversa foi preparado como a seguir:

Componentes	Volume por amostra (µL)
<i>Megaplex RT Primers</i> (10x)	0,8
<i>dNTPs with dTTP</i> (100 mM)	0,2
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> (50 U/µL)	1,5

10x <i>RT Buffer</i>	0,8
MgCl ₂ (25 mM)	0,9
<i>RNase Inhibitor</i> (20 U/μL)	0,1
<i>Nuclease-free water</i>	0,2
Total	4,5

Em cada tubo, 3 μL de RNA a 3,3 ng/μL foram adicionados. Mesma quantidade foi usada para RNA de células e de VEs. Programa usado no termociclador:

16°C 2min	40 ciclos
42°C 1min	
50°C 1seg	
85°C 5min	
4°C <i>hold</i>	

4.1.9 Pré-amplificação de cDNA

A reação de pré-amplificação foi realizada de acordo com instruções contidas em *Megaplex™ Pool Quick Reference Card*. *TaqMan® PreAmp Master Mix* e *Megaplex™ PreAmp Primers Human Pool A* e *Human Pool B* (Thermo Fisher Scientific) foram utilizados na reação.

Mix da reação de pré-amplificação foi preparado como a seguir:

Componentes	Volume por amostra (μL)
<i>TaqMan® PreAmp Master Mix</i> , 2x	12,5
<i>Megaplex™ PreAmp Primers</i> (10x)	2,5
<i>Nuclease-free water</i>	7,5
Total	22,5

Em cada tubo, foi adicionado 2,5 μL do produto da transcrição reversa (cDNA). Programa no termociclador:

95 °C 10 min
 55 °C 2 min
 72 °C 2 min
95 °C 15 seg
60 °C 4 min | **15 ciclos**
 99.9 °C 10 min
 4 °C *hold*

Após amplificação, em cada tubo foi adicionado 75 µL de TE 0,1 X (diluição final do cDNA de 1:4).

4.1.10 qPCR com TaqMan® Array Human microRNA Cards

Com a finalidade de obter um perfil de apenas miRNAs dentre todos os pequenos RNAs não codificantes, optamos por utilizar um ensaio em cartões de micro fluidos denominado *TaqMan® Array Human microRNA Cards* comercializado pela Thermo Fisher Scientific. Este ensaio é baseado em reação em cadeia pela polimerase quantitativa (qPCR) e faz uma cobertura de 758 alvos, sendo 754 miRNAs e 4 controles (RNU44, RNU48 e U6 como controles endógenos e ath-miR159 como controle negativo) distribuídos em dois cartões (*Human Card A v2* e *Human Card B v3*). Portanto, para cada amostra do projeto foram utilizados dois cartões (A e B). Os cartões do *Human A + B Card Set v3* (Thermo Fisher Scientific) foram utilizados na qPCR de acordo com instruções contidas no *Megaplex™ Pool Quick Reference Card* e *Applied Biosystems TaqMan® Array User Bulletin*.

TaqMan® Universal Master Mix, No AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para preparo da qPCR como a seguir:

Componentes	Volume para cada array (µL)
<i>TaqMan® Universal Master Mix, No AmpErase UNG, 2x</i>	450

Produto de pré-amplificação diluído	9
<i>Nuclease-free water</i>	441
Total	900

O *mix* foi adicionado nos cartões de acordo com orientações do fabricante (*Applied BiosystemsTaqMan® Array User Bulletin* - Thermo Fisher Scientific). Os cartões foram centrifugados 2 vezes seguidas a 1200 rpm por 1 min, à temperatura ambiente em aparato de suporte de cartões, rotor e centrífuga específicos de acordo com orientações do fabricante (*Applied BiosystemsTaqMan® Array User Bulletin*). Cartões foram vedados com selador de placas determinado pelo fabricante e em seguida a corrida foi realizada no termociclador *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific), com bloco adaptado para *TaqMan Low Density Array* (TLDA).

4.1.11 Análise de dados

Dados foram analisados utilizando sistema de nuvem *Cloud* da Thermo Scientific. Cqs foram determinados com base no algoritmo Crt e Cq=35 foi utilizado como *cut off*. Cqs acima de 35 ou não determinados foram convertidos em 35 para possibilitar análise. Para análise de comparação entre amostras de miRNA intracelulares e entre VEs, U6 foi utilizado como controle endógeno. Para comparação entre amostras de miRNAs intracelulares e VEs, normalização global foi utilizada. Teste t foi aplicado quando houve comparação aos pares, e a opção Benjamini-Hochberg foi deselecionada nos parâmetros de análise estatística do *Cloud*. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Caracterização de hiPSCs e diferenciação neural

Com finalidade de evidenciar a natureza pluripotente das hiPSCs, reação de imunofluorescência indireta foi realizada utilizando-se marcadores específicos de células-tronco tais como Nanog, Oct3/4, Sox2, TRA-1-60. As imagens apresentadas na figura 21 mostram que as hiPSCs crescem em forma de colônias arredondadas

nas condições utilizadas e foram positivas para tais marcadores. O dado se reproduziu para células dos três indivíduos incluídos no estudo.

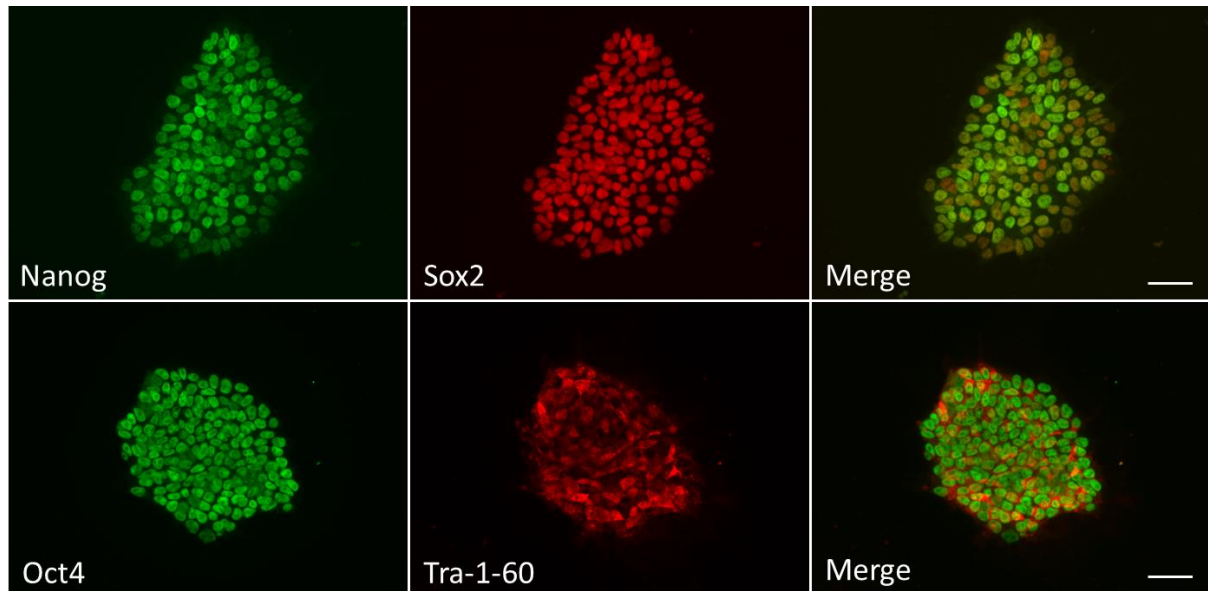


Figura 21 - Marcadores de pluripotência em hiPSCs. Colônias de células-tronco pluripotentes induzidas humanas positivas para os marcadores de pluripotência Nanog, Sox2, Oct4 e Tra-1-60. Sobreposição de cada combinação representada nas imagens Merge. Nanog, Sox2 e Oct4 apresentam marcação típica nuclear e Tra-1-60 de membrana plasmática. Barras: 50 μ m.

hiPSCs foram induzidas a diferenciação em células-tronco neurais (NSCs) e em progenitores dopaminérgicos (FPPs) utilizando protocolos distintos e bem estabelecidos. NSCs caracterizam-se pela potencialidade de se diferenciar nas três populações neurais, oligodendrócitos, astrócitos e neurônios de acordo com as condições de cultivo e estímulos fornecidos. Esta característica se difere dos FPPs, uma fase intermediária da diferenciação em neurônios dopaminérgicos, portanto um progenitor neural mais comprometido a diferenciação em um neurônio específico. A natureza das células diferenciadas foi confirmada por imunofluorescência para marcadores específicos. Para NSCs, foram utilizados SOX1, Pax6, Musashi, Nestin, β III tubulina (TUJ) (Figura 22) e para FPPs foram utilizados FOXA2, OTX2, Lmx1a como sugerido no protocolo do *kit* comercial de diferenciação (Figura 23).

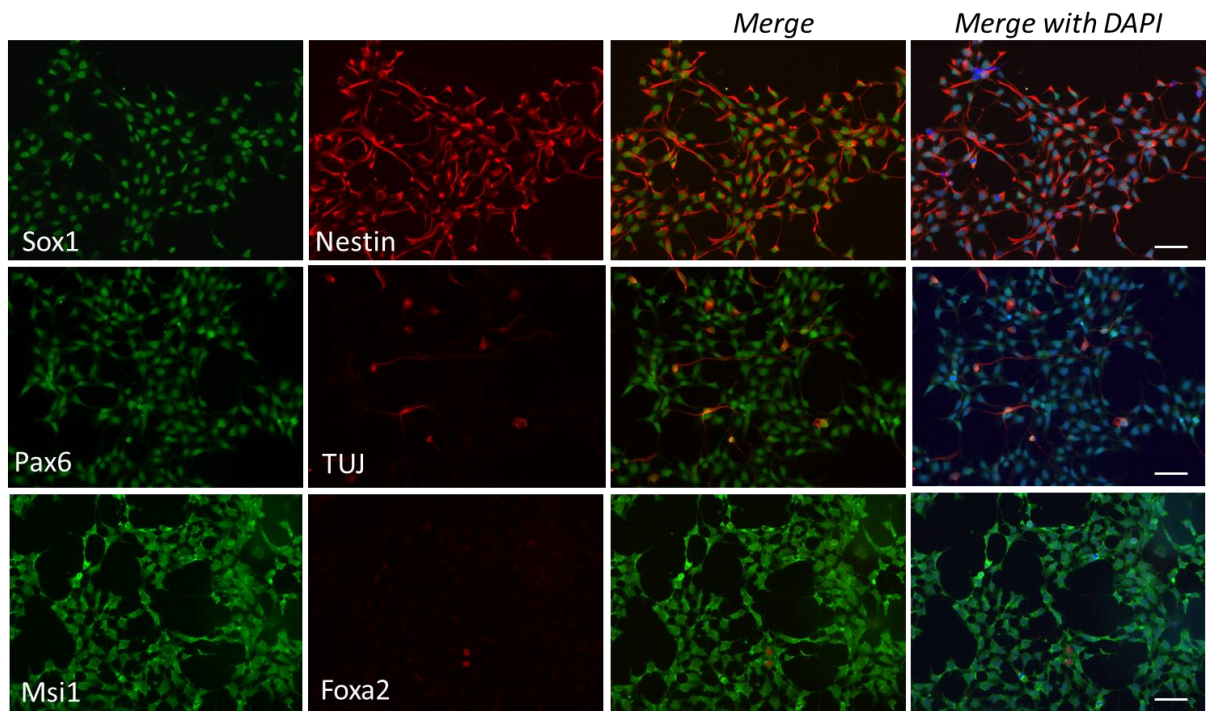


Figura 22 - Marcadores de diferenciação de hiPSCs em células-tronco neurais. Células-tronco neurais em passagem 2 são positivas para Sox1, Nestina (Nestin), Pax6 e Musashi (Msi1) e negativas para Foxa2, com presença de algumas células positivas para β III tubulina (TUJ) correspondentes a neurônios imaturos. Núcleos marcados com DAPI em azul. *Merge*: sobreposição de imagens dos canais vermelho e verde. *Merge with DAPI*: sobreposição de imagens dos canais vermelho, verde e azul (correspondente ao DAPI). Barras: 50 μ m.

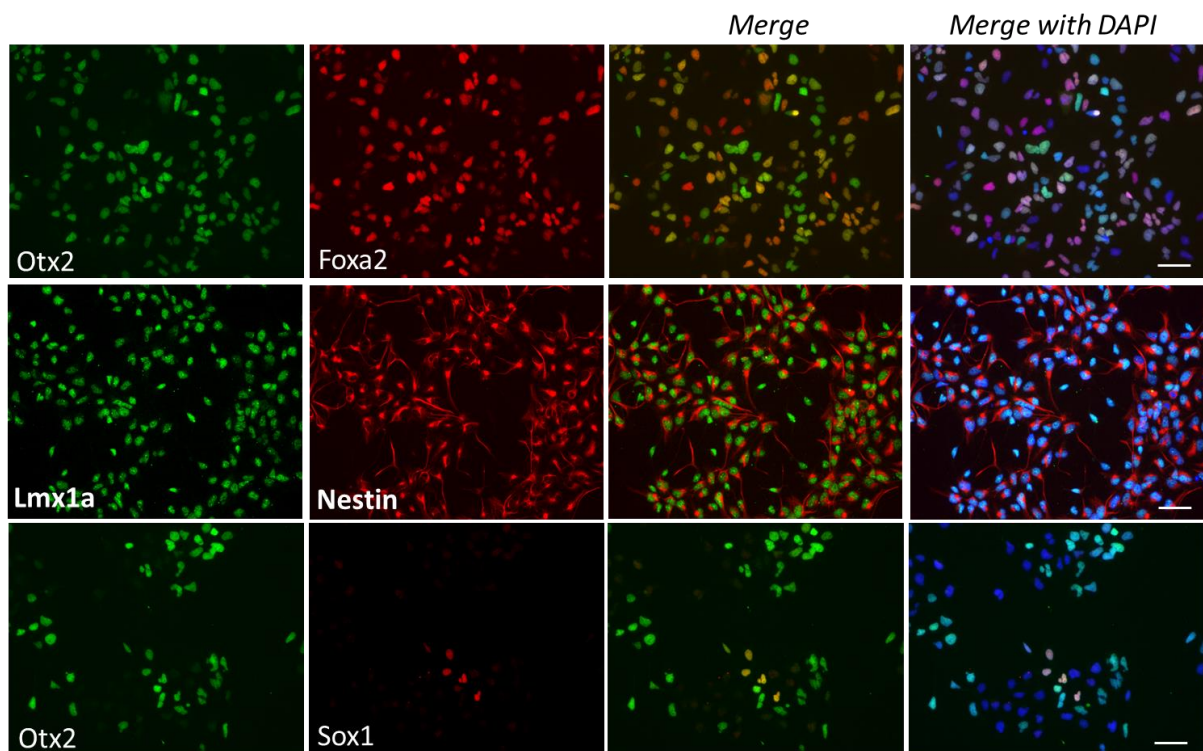


Figura 23 - Marcadores de diferenciação de hiPSCs em *floor plate progenitors*. *Floor plate progenitors* em passagem 2 foram positivas para Otx2, Foxa2, Lmx1a, Nestina (Nestin), e negativas para Sox1 em sua maioria. Núcleos marcados com DAPI em azul. *Merge*: sobreposição de imagens dos canais vermelho e verde. *Merge with DAPI*: sobreposição de imagens dos canais vermelho, verde e azul (correspondente ao DAPI). Barras: 50 μ m.

FPPs foram induzidas à diferenciação em neurônios dopaminérgicos com a finalidade de comprovar o potencial das mesmas em dar origem à linhagem neuronal dopaminérgica. Sob as condições do protocolo, foi possível diferenciar os FPPs em neurônios em sua maioria, porém com eficiência inferior ao esperado (60% de acordo com protocolo) em gerar células com marcador dopaminérgico (tirosina hidroxilase) (Figura 24). Neste sentido, faz-se necessária uma padronização mais rigorosa desta última etapa da diferenciação. Devido a esta heterogeneidade na geração predominantemente de apenas um tipo neuronal desde o início do projeto, optou-se por seguir com apenas as populações de precursores neurais: as células-tronco neurais (NSCs), e os progenitores da placa basal do tubo neural (FPPs), um estado mais comprometido de diferenciação neural.

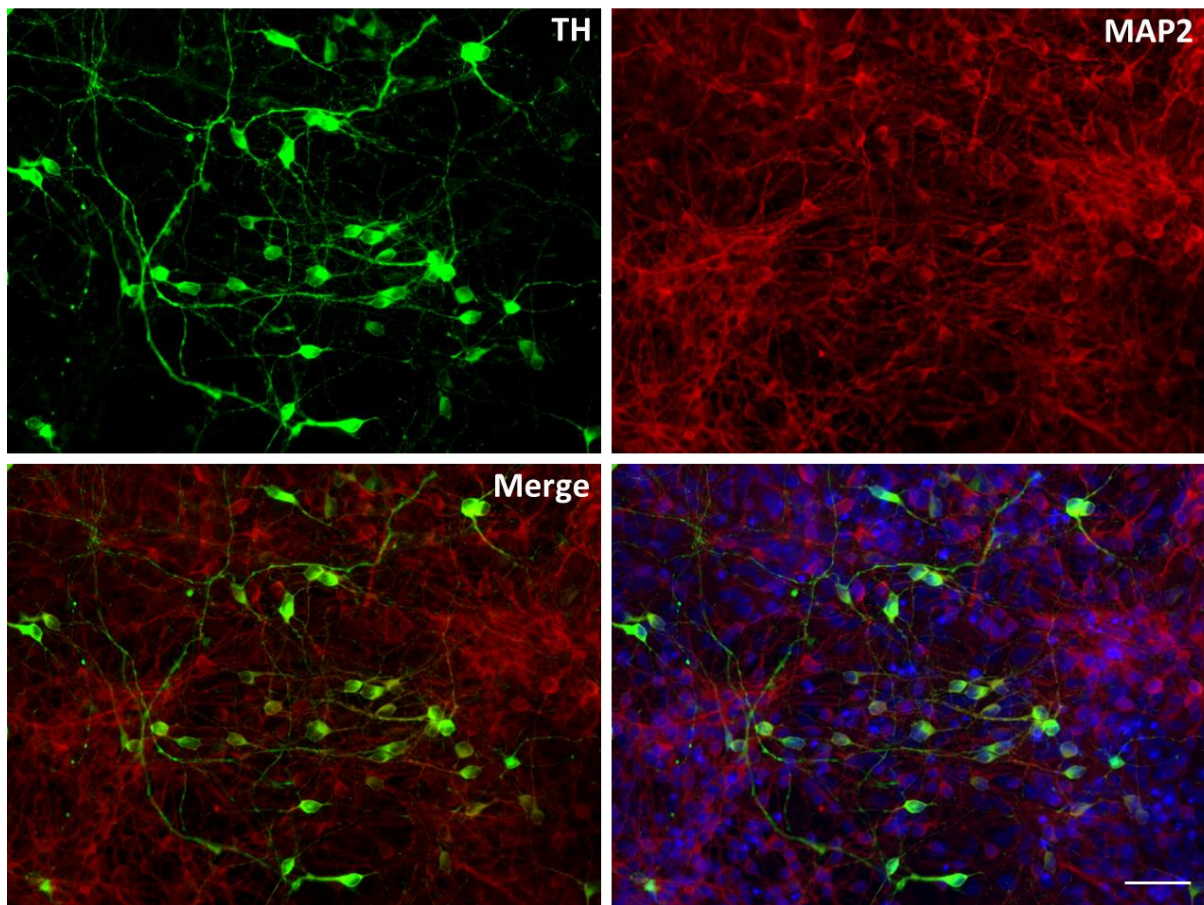


Figura 24 – Diferenciação de hiPSCs em neurônios dopaminérgicos. Neurônios dopaminérgicos após 14 dias do início da indução da diferenciação de FPPs em neurônios mostraram ser positivos para marcador tirosina hidroxilase (TH) em meio a neurônios maduros positivos para *microtubule associated protein 2* (MAP2). Núcleos marcados com DAPI, em azul. Imagens inferiores referem à sobreposição de imagens dos canais vermelho e verde e, à direita, sobreposição de imagens dos canais vermelho, verde e azul (correspondente ao DAPI). Barra: 50 μ m.

4.2.2 Padronização do isolamento de VEs e extração de RNA de VEs em hiPSCs

O *kit* de isolamento de VEs, *exoEasy*, baseia-se em coluna de afinidade, o qual retém membranas, motivo pelo qual procedeu-se com etapas de centrifugação e filtração para eliminação de *debris* celulares. No que diz respeito à RNAs extracelulares, este *kit* permite uma seleção para RNAs presentes em VEs, deixando passar no *flow through* RNAs exógenos encontrados em complexos proteicos ou lipoproteínas. Na ultracentrifugação, estes complexos exógenos de RNA também podem ser obtidos juntamente com as VEs, o que reflete em análises posteriores.

Inicialmente, testes de extração de RNA foram realizados com meio de hiPSCs. Como o rendimento de RNA utilizando-se o *kit* *exoEasy* (para isolar

vesículas) foi muito acima do esperado, o isolamento de RNA de VEs foi realizado em paralelo (exatamente ao mesmo tempo, partindo com o mesmo volume de meio) com o método de ultracentrifugação para fins comparativos. A concentração de RNA de VEs após ultracentrifugação foi de 10,7 ng/μL e com o kit foi de 40 ng/μL, portanto, optou-se pelo uso *kit* da coluna, pela facilidade e rapidez.

Um teste seguinte para comprovar a eficácia do *kit* foi proceder com o mesmo volume e protocolo de isolamento de VEs/extração de RNA utilizando-se apenas meio fresco de hiPSCs (que não entrou em contato com células) e D-PBS (comercial e aberto novo para este teste). Esses seriam utilizados como “controles negativos”, uma vez que RNAs não são esperados em DPBS e meios puros, apesar de evidências mostrarem presença de RNAs em meios frescos de células-tronco tumorais (WEI et al., 2016). Após extração de RNA, as concentrações tanto para DPBS como para meio fresco não foram detectáveis e, pelo Bioanalyzer, o perfil de RNA foi praticamente nulo (Figura 25). Após confirmação da eficiência do *kit* para o objetivo em questão, as amostras do projeto (3 populações celulares, hiPSCs, NSCs e FPPs, intra e extracelular, em triplicata biológica, num total de 18 amostras) foram submetidas a extração de RNA e processamento seguinte para realização do perfil de miRNAs.

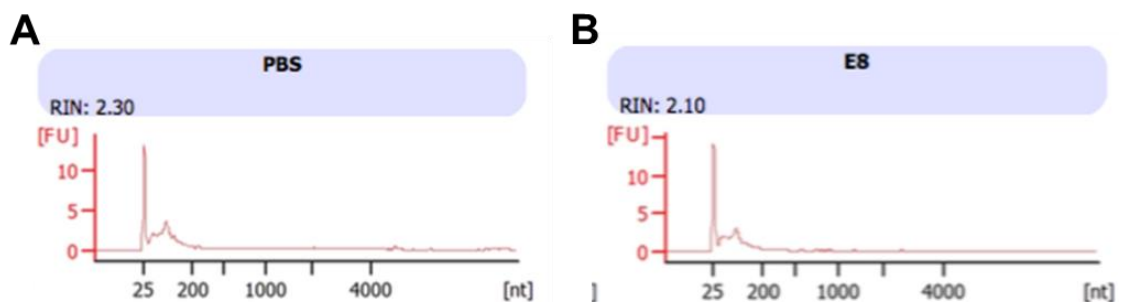


Figura 25 - Análise por Bioanalyzer de RNAs extraídos após protocolo de isolamento de vesículas de DPBS e meio E8. DPBS (A) e meio de cultivo de hiPSCs (Essential 8 – E8) (B) foram submetidos ao isolamento de VEs utilizando ExoEasy e em seguida extração de RNA. Pico 25 nt representa marcador de tamanho molecular. Pequeno pico caracterizando pequenos RNAs foi praticamente não detectável.

4.2.3 Caracterização de RNA intracelulares e de VEs de hiPSCs, NSCs ou FPPs

A coleta de meios condicionados se difere entre as populações celulares. As hiPSCs foram mantidas com troca diária de meio de cultivo, portanto, o

condicionamento do mesmo não ultrapassou 36 h e foi realizado preferencialmente nos dias 3 e/ou 4 após o dia de passagem das células. A passagem de NSCs ocorreu a cada 3-4 dias, dependendo da confluência, e a troca de meio foi realizada a cada 2 dias, portanto, o meio foi condicionado por cerca de 2 dias. No caso de FPPs, as células foram mantidas em 100% de confluência e a passagem ocorreu a cada 5 dias, com troca de meio a cada 2 dias. Assim como as NSCs, o meio condicionado de FPPs também correspondeu a cerca de 2 dias. Uma vez que o volume nem sempre foi suficiente para processamento imediato até etapa final para extração de RNA, os meios passaram pelas etapas iniciais de centrifugação e foram estocados a -80 °C.

O volume de meio usado para extração de RNA de VEs foi 32 mL para maioria dos casos, exceto por 2 amostras em que o volume foi de 27,5 mL. Este volume foi baseado na capacidade máxima sugerida pelo *kit* e, como a quantidade foi satisfatória para seguir para próximas etapas, não houve necessidade de um volume maior.

De acordo com a concentração de RNA de VEs (apresentadas na tabela 1) podemos observar que, nas condições de coleta apresentadas, foi possível obter uma média de 44,16 ng de RNA por mL de meio condicionado de hiPSCs, uma quantidade bem superior ao encontrado em meio de NSCs e FPPs.

Tabela 1 – Quantidade de RNA (ng) obtido por cada mL de meio condicionado de cada amostra biológica (1, 2 e 3) e cada população celular (hiPSCs, NSCs e FPPs).

Amostra Biológica	População celular	ng de RNA/mL de meio
1	hiPSCs	56,4
2	hiPSCs	41,72
3	hiPSCs	34,37
1	NSCs	16,25
2	NSCs	22,03
3	NSCs	16,72
1	FPPs	14,37
2	FPPs	8,9
3	FPPs	8,51

Outra característica peculiar observada entre cada população celular foi o perfil de tamanho de RNA de VEs. Como mostrado na figura 26, foi possível observar que a medida que a célula se tornou mais diferenciada, houve um aumento de RNAs maiores encontrados em VEs. Em hiPSCs, houve um enriquecimento evidente de pequenos RNAs, enquanto que em NSCs e FPPs, apesar de se observar o pico correspondente a pequenos RNAs, foi evidente a presença de picos de RNAs longos, os quais podem incluir diversos tipos, porém com perfil típico de RNA ribossomal (Figura 26). Interessante notar que o dado foi reproduzido entre os 3 indivíduos do estudo.

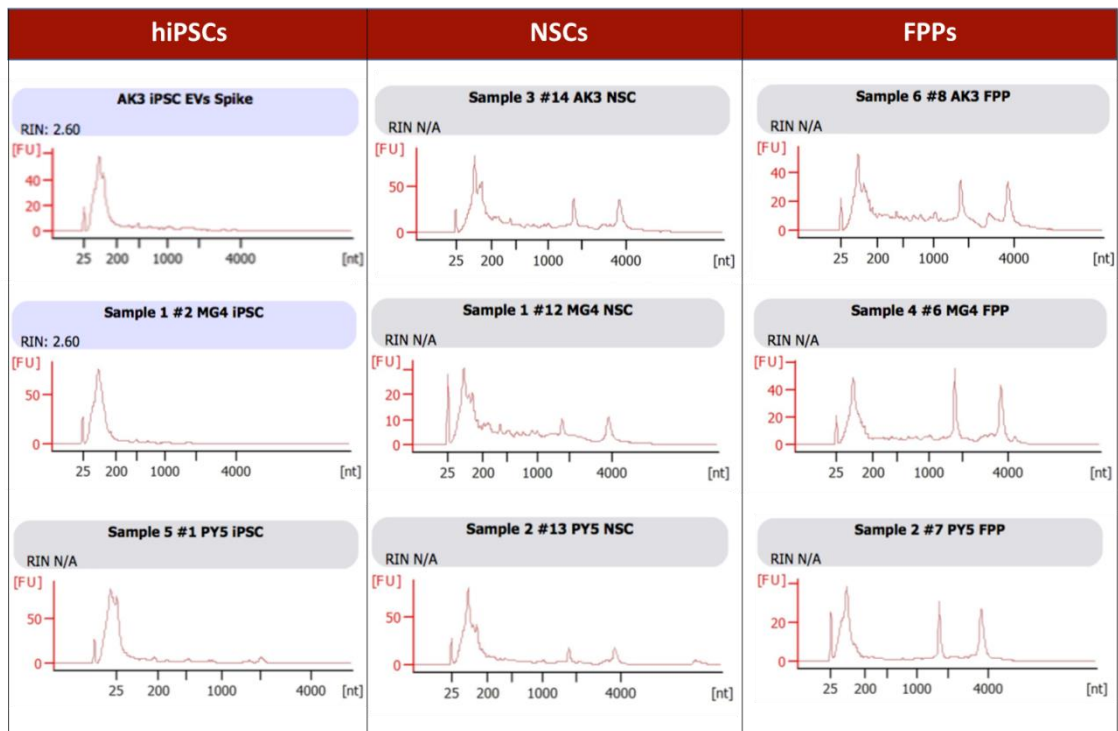


Figura 26 - Perfil do tamanho de RNAs de vesículas extracelulares de hiPSCs, NSCs e FPPs. Em NSCs e FPPs, picos de RNAs de tamanhos maiores foram bem evidentes. Marcador de tamanho molecular representado pelo pico a 25 nt. Eletroferogramas obtidos por análise de RNAs utilizando Agilent RNA 6000 Pico chip e o aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer. *nt: nucleotides, FU: fluorescence units*

Tendo em vista que os meios foram processados da mesma forma nas etapas iniciais de centrifugação, estocados todos da mesma maneira, o RNA de VEs isolado junto com seu correspondente celular em dias consecutivos os dados forneceram indícios que tal padrão fosse uma característica biológica de cada tipo de população celular. Além disso, o fato de se reproduzir na replicada biológica (nos

3 indivíduos diferentes) suporta esta hipótese de que células diferenciadas tendem a liberar RNAs maiores em vesículas.

4.2.4 Cenário geral do perfil de miRNA intracelulares e de VEs em iPSCs, NSCs e FPPs

As amostras de RNA tanto intracelulares como de VEs foram redosadas e submetidas, simultaneamente, à síntese de cDNA e logo em seguida de pré-amplificação de acordo com protocolo do fabricante (descrito na sessão 4.1.8 e 4.1.9 de Material e Métodos). A opção de se incluir a etapa de pré-amplificação foi devido ao fato da quantidade de RNA obtido de VEs ser inferior ao exigido pelo kit para realização do *array*. Para tanto, amostras de células e vesículas foram diluídas e um *input* de 10 ng foi utilizado na reação de transcrição reversa. As amostras de cDNA foram então utilizadas para realização do perfil de miRNAs.

Com a finalidade de obter uma análise comparativa especificamente de pequenos RNAs não codificantes do tipo miRNAs, optou-se por utilizar o ensaio de qPCR TaqMan (*TaqMan Array Human microRNA cards*) contendo um total de 758 alvos (754 miRNAs e 4 controles), baseados na cobertura de miRNAs depositados no Sanger miRBase v14. Com base no algoritmo Crt para determinação de Cqs e usando um Cq *cut off* 35, uma quantidade que variou entre 310-370 miRNAs não foi detectada nas amostras de um total de 758 alvos. Estes miRNAs não detectados foram incluídos na análise representada pelas figuras 27-29 nas quais a quantidade de miRNAs diferencialmente expressos em análises aos pares pode ser visualizada por Diagramas de Veen e em gráficos Volcano.

De modo geral, observou-se um maior número de miRNAs com expressão diferenciada entre iPSCs e NSCs ou FPPs, ou seja, uma alteração acentuada de perfil de miRNAs tanto intracelulares quanto de vesículas quando uma célula deixou de ser pluripotente e adquiriu um fenótipo neural (iPSCs x NSCs e iPSCs x FPPs) (Figuras 27 e 28 A, B, D, E). Ao se comparar duas populações celulares neurais, uma menos comprometida e com potencial de dar origem a astrócitos, oligodendrócitos e neurônios, e outra mais comprometida e progenitora de neurônios dopaminérgicos, foi possível observar uma alteração menos acentuada do perfil de miRNAs, sugerindo que uma vez adquirido o fenótipo neural, há um conjunto

pequeno de miRNAs que atuam regulando mecanismos de especificação neural (Figuras 27 e 28, C e F). Na análise entre conteúdo de VEs e intracelular, observou-se que a quantidade de miRNAs diferencialmente expressos foi semelhante em todos os tipos celulares (Figura 29). Estes dados serão discutidos em mais detalhes nas sessões que se seguem.

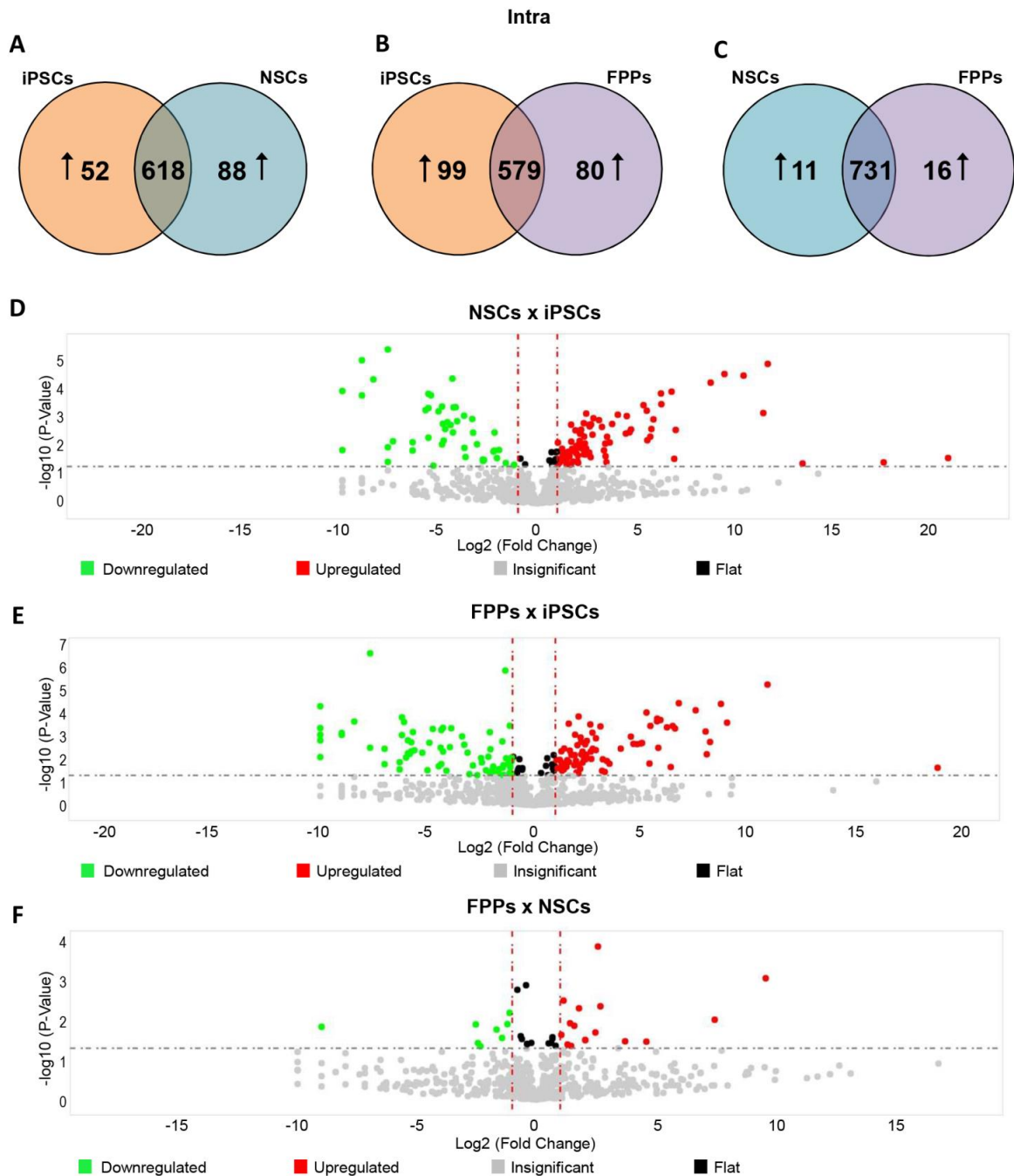


Figura 27 - Comparação de perfil de miRNAs intracelulares entre hiPSCs, NSCs e FFPs. Diagrama de Venn (A-C) e gráfico Volcano (D-F) mostram respectivamente quantidade e distribuição estatística de miRNA intracelulares diferencialmente expressos entre as populações celulares. A: quantidade de miRNAs mais expressos em iPSCs (círculo laranja) que em NSCs (círculo azul) e vice-

versa. B: quantidade de miRNAs mais expressos em iPSCs (círculo laranja) que em FPPs (círculo lilás) e vice-versa. C: quantidade de miRNAs mais expressos em NSCs (círculo azul) que em FPPs (círculo lilás) e vice-versa. D-F: em vermelho, miRNAs *upregulated* em NSCs (D) e FPPs (E) em relação a iPSCs e em FPPs (F) em relação a NSCs. Em verde, miRNAs *downregulated* nas mesmas comparações. Em preto, miRNAs com *fold change* inferior a 2, porém com estatística significativa. Em cinza, miRNAs não alterados.

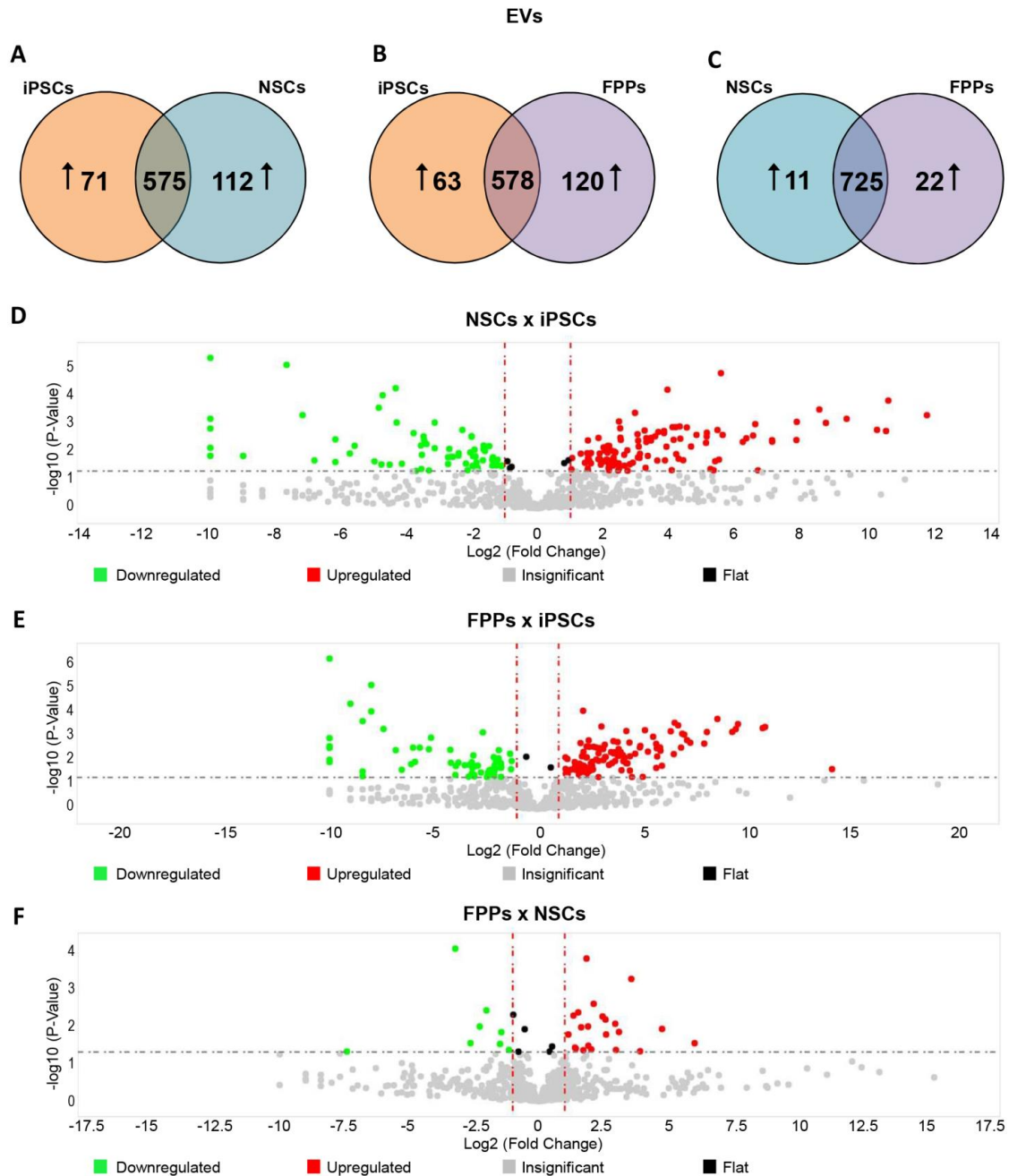


Figura 28 - Comparação de perfil de miRNAs de VEs entre hiPSCs, NSCs e FPPs. Diagrama de Venn (A-C) e gráfico Volcano (D-F) mostram respectivamente quantidade e distribuição estatística de miRNA de VEs diferencialmente expressos entre as populações celulares. A: quantidade de miRNAs mais expressos em VEs de iPSCs (círculo laranja) que em VEs de NSCs (círculo azul) e vice-versa. B: quantidade de miRNAs mais expressos em VEs de iPSCs (círculo laranja) que em VEs de FPPs (círculo lilás) e vice-versa. C: quantidade de miRNAs mais expressos em VEs de NSCs (círculo azul) que em VEs de FPPs (círculo lilás) e vice-versa. D-F: em vermelho, miRNAs *upregulated* em VEs de NSCs (D) e FPPs (E) em relação a iPSCs e em FPPs (F) em relação a NSCs. Em verde, miRNAs *downregulated* nas mesmas comparações. Em preto, miRNAs com *fold change* inferior a 2, porém com estatística significativa. Em cinza, miRNAs não alterados.

NSCs (D) e FPPs (E) em relação a VEs de iPSCs e em FPPs (F) em relação a NSCs. Em verde, miRNAs *downregulated* nas mesmas comparações. Em preto, miRNAs com *fold change* inferior a 2, porém com estatística significativa. Em cinza, miRNAs não alterados. EVs: *extracellular vesicles*.

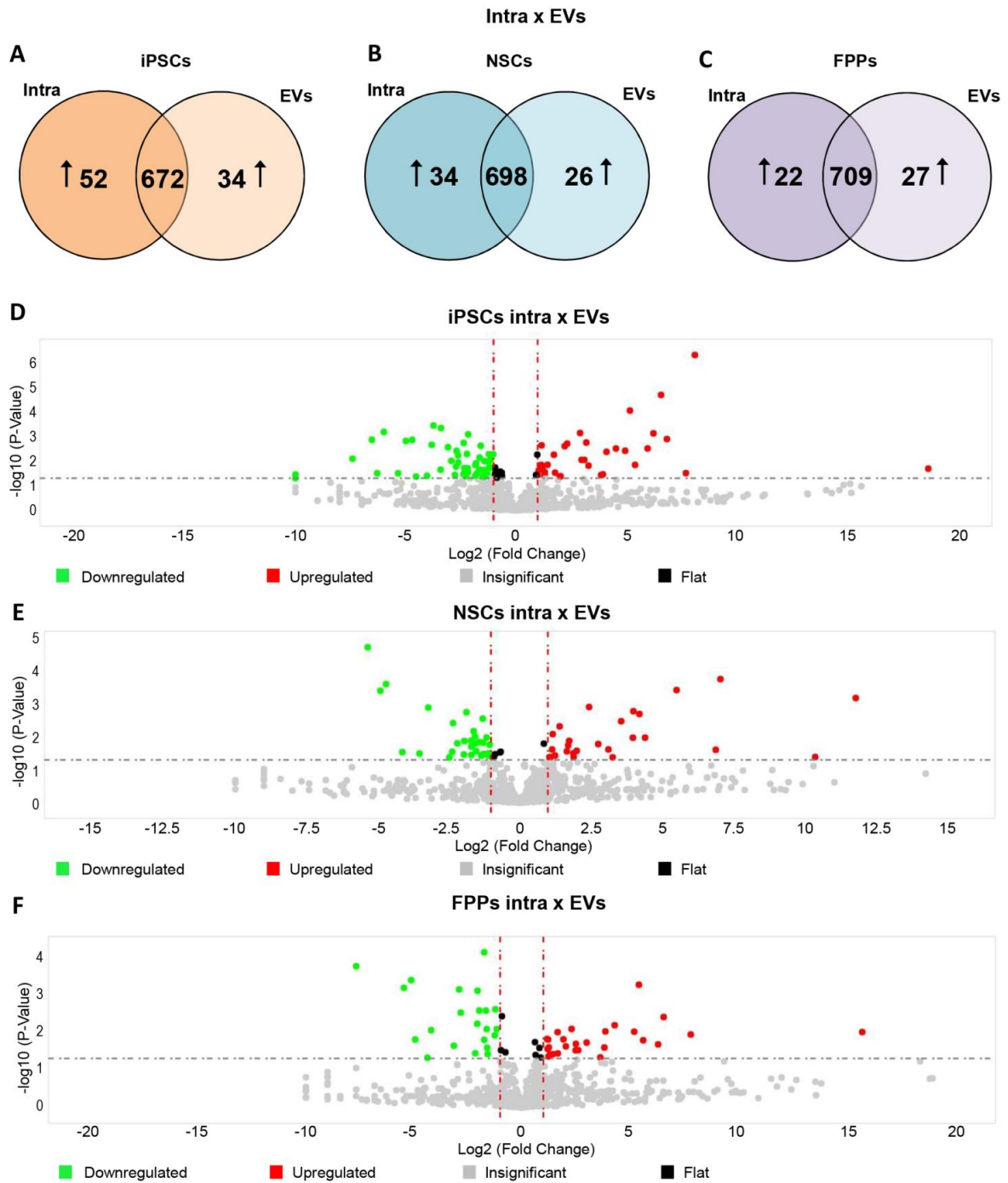


Figura 29 - Comparação de perfil de miRNAs de VEs em relação a miRNAs intracelulares em hiPSCs, NSCs e FPPs. Diagrama de Venn (A-C) e gráfico Volcano (D-F) mostram respectivamente

quantidade e distribuição estatística de miRNAs diferencialmente expressos entre vesículas e células de cada população celular. A: quantidade de miRNAs mais expressos no ambiente intracelular (intra) de iPSCs que em suas VEs e vice-versa. B: quantidade de miRNAs mais expressos no ambiente intracelular (intra) de NSCs que em suas VEs e vice-versa. C: quantidade de miRNAs mais expressos no ambiente intracelular (intra) de FPPs que em suas VEs e vice-versa D-F: em vermelho, miRNAs *upregulated* em VEs em relação ao conteúdo intracelular de hiPSCs (D), NSCs (E) e de FPPs (F). Em verde, miRNAs *downregulated* nas mesmas comparações. Em preto, miRNAs com *fold change* inferior a 2, porém estatisticamente significantes. Em cinza, miRNAs não alterados. EVs: *extracellular vesicles*.

4.2.5 Expressão diferencial de miRNAs entre hiPSCs, NSCs e FPPs

O perfil e função de miRNAs intracelulares na diferenciação neuronal é um assunto já bastante abordado na literatura tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. Vários padrões de mudança de expressão de miRNAs são esperados no processo de envolvimento de células pluripotentes para um fenótipo neural e os dados aqui apresentados corroboram com o que foi descrito anteriormente. Por exemplo, foi encontrado no presente estudo os miRNAs positivamente regulados mais comuns mediante diferenciação neural como miR-100, miR-124, miR-125, miR-135, let-7, miR-149, miR-181, miR-218, miR-219, miR-9 bem como os negativamente regulados mais comuns: miR-200, miR-302, miR-372, miR-367, os quais também estão envolvidos com manutenção de pluripotência (para revisão do assunto (SHENOY; BLELLOCH, 2014; STAPPERT; ROESE-KOERNER; BRÜSTLE, 2015)).

No que diz respeito ao conteúdo intracelular de miRNAs no desenvolvimento neural, o diferencial do presente estudo foi utilizar as FPPs como fase intermediária do modelo de diferenciação dopaminérgica. Até o momento não há perfil de miRNAs tanto por RNA Seq ou *arrays* que revelem um cenário geral de expressão de miRNAs neste modelo celular, apesar de se encontrar evidências e mecanismos de miRNAs específicos na especificação em neurônios dopaminérgicos. Algumas destas evidências relacionadas aos alterados miRNAs encontrados bem como novos miRNAs candidatos à regulação de tal etapa serão abordados a seguir.

4.2.6 miRNAs distinguem NSCs de FPPs

Apesar de já ser bem caracterizada a mudança de perfil de miRNAs no comprometimento neural de células-tronco pluripotentes, este trabalho revelou mais

especificamente a diferença de miRNAs entre células neurais multipotentes (NSCs) e células neurais comprometidas com a linhagem progenitora dopaminérgica (FPPs). Dentre os miRNAs *upregulated* em FPPs em relação a NSCs, pode-se destacar miR-181a (ou miR-181a-5p), miR-181a-2* (ou miR-181a-2-3p), miR-218, miR-642 e miR-885-5p.

De fato, miR-181 é uma família de miRNA anteriormente validada no envolvimento em processos neurais como neurogênese, plasticidade sináptica dentre outros (CHANDRASEKAR; DREYER, 2009; KRICHEVSKY et al., 2006; MISKA et al., 2004; SABA et al., 2012; SMIRNOVA et al., 2005). Alguns trabalhos mostram o envolvimento de alguns membros da família como o miR-181a e o miR-181a* (atualmente, miR-181a-5p e miR-181a-3p respectivamente) na diferenciação em linhagem neuronal dopaminérgica (SABA et al., 2012; STAPPERT et al., 2013). Stappert et al. (2013) mostraram o aumento de expressão dos mesmos na diferenciação de hESCs em “*long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells*” (lt-NES cells) e da transição destas células para diferenciação neuronal. Além disso, provaram que níveis de miR181a/a* estavam aumentados após diferenciação em neurônios dopaminérgicos e a presença ectópica de miR181a/a* favoreceu a geração deste mesmo tipo neuronal, não tendo efeito em neurônios gabaérgicos (STAPPERT et al., 2013). Saba et al. (2012) mostraram um enriquecimento de miRNA-181a no compartimento sinaptodendrítico do núcleo *accumbens* e validaram a subunidade GLuA2 de receptores AMPA como alvo do mesmo. Mostraram que miR-181a reduziu a presença de receptores AMPA na membrana, diminuiu o volume de espinhos dendríticos e diminuiu a frequência das *mini excitatory post-synaptic currents* (mEPSC) em cultura de neurônios hipocámpais. Além disso, mostraram que ativação de sinalização dopaminérgica (com agonista de dopamina) possibilitou um aumento da expressão de miR-181a maduro que, conseqüentemente, foi capaz de diminuir a expressão de GluA2. Interessantemente, dentre outros GluA, apenas GluA2 possui sítios de ligação canônicos na região 3' UTR para miR-181a, sugerindo que o miR-181a atua seletivamente em GluA2 para sua repressão traducional (SABA et al., 2012). Eles propõem que o aumento de miR-181 maduro em resposta à dopamina ocorra pelo aumento do processamento do miRNA precursor uma vez que detectaram um dos precursores de miR-181a, o pre-miR-

181a-2, mas não o pre-miR-181a-1, no compartimento sinaptodendrítico. Isso poderia indicar um transporte sinapto-dendrito ou um processamento local de pre-miR-181a-2 em resposta à sinalização dopaminérgica (SABA et al., 2012). Esta informação pode ser corroborada com dado de aumento de expressão de miR-181a-2* (também conhecido por miR-181a-2-3p) em FPPs no presente estudo.

O miRNA miR-218, encontrado mais expresso em FPPs em relação a NSCs no presente estudo, também já foi validado na diferenciação dopaminérgica. miR-218 regula a expressão de *Early B-cell fator 3* (Ebf3), um fator de transcrição altamente conservado que está amplamente envolvido, junto com outros membros Ebf, em processos do desenvolvimento neural. Foi demonstrado por Baek et al. (2014) que Ebf3 apresentou níveis de expressão aumentados a medida que mESC se diferenciaram em neurônios dopaminérgicos, e uma diminuição quando estes neurônios já estavam totalmente maduros e ativos, sugerindo um papel da proteína na fase terminal de diferenciação deste tipo neuronal. Além disso, eles mostraram que a indução da superexpressão de Ebf3 induziu diferenciação dopaminérgica ao passo que a inibição teve efeito oposto e identificaram miR-218 como molécula chave na regulação dos níveis de Ebf3. Este mesmo trabalho mostrou nível de expressão de miR-218 especificamente aumentado na fase terminal de diferenciação, corroborando com diminuição de Ebf3. Confirmaram o efeito oposto de inibidor e mimético de miR-218 sobre a expressão de Ebf3 e mostraram que a indução da inibição de miR-218 levou a um aumento de neurônios dopaminérgicos, contudo, não provaram que a superexpressão de miR-218 teve efeito inverso, os marcadores dopaminérgicos praticamente não alteraram (BAEK; CHOI; KIM, 2014). Este detalhe deixa em aberto a discussão sobre o real mecanismo de ação de miR-218 na diferenciação dopaminérgica.

Não há trabalhos até o momento relatando miR-642 ou miR-885-5p no processo de diferenciação em neurônios dopaminérgicos. O miR-642 foi descrito em mecanismos tumorais, agindo como regulador da expressão de *keratin 19* (KRT19) juntamente com *long non coding RNA* Linc00974 em modelo de hepatocarcinoma (TANG et al., 2014). O miR-642-5p atua no controle de crescimento celular em células de câncer de próstata via regulação da expressão da enzima *deoxyhypusine hydroxylase* (DOHH) e atividade de *eukaryotic translation initiation factor* (eIF5A)

(EPIS et al., 2012). O miR-642b-3p e miR-885-5p foram detectados em níveis elevados em plasma de pacientes com câncer pancreático (HUSSEIN et al., 2016). Por outro lado, miR-885-5p tem sido caracterizado em mecanismos neurais. Foi demonstrado que a citocina com efeitos neuroprotetores Eritropoietina (EPO) atua diminuindo expressão de miR-885-5p, o que correlacionou com aumento de mRNA alvos (*cyclin-dependent kinase* - CDK2 e *mini-chromosome maintenance protein* - MCM5) também induzidos por EPO em SH-SY5Y *neuronal-like cells* (ALURAL et al., 2014). Outro estudo mostrou que aumento de miR-885-5p leva à ativação da via de p53, inibe CDK2 e MCM5, interferindo na proliferação e sobrevivência celular, promovendo senescência celular, *cell cycle arrest* e apoptose em modelo de neuroblastoma. Considerando que miR-885-5p levou à saída de células do ciclo celular via ativação de p53 mantendo a sobrevivência das mesmas, o mesmo estudo hipotetizou uma possível função de miR-885-5p em processos do desenvolvimento como maturação neuronal (AFANASYEVA et al., 2011). A presença de miR-885-5p também foi caracterizada por inibir a via de sinalização Wnt/ β catenina por meio da redução de seu alvo CTNNB1 β -catenina, consequentemente atuando como supressor de metástase em hepatocarcinoma (ZHANG et al., 2016). Outro alvo descrito para miR-885-5p é o receptor de *insulin growth factor 1* (IGF1R), diretamente relacionado com expressão de marcadores de células-tronco e possui papéis importantes em processos relacionados ao desenvolvimento neural (ANNENKOV, 2009; MEIER et al., 2016). Utilizando modelo de células-tronco tumorais, mostraram que miR-885-5p foi induzido por TAp73 e agiu diminuindo seu alvo IGF1R, resultando na perda de traços de células-tronco (MEIER et al., 2016). O aumento de expressão de miR-885-5p em FPPs em relação a NSCs observado no presente trabalho fornece indícios para um possível mecanismo que o envolva, juntamente com os alvos acima descritos, no processo de diferenciação dopaminérgica.

4.2.7 Assinatura específica de miRNAs em VEs

Outro diferencial do trabalho foi o conteúdo de miRNAs em VEs de cada fase de diferenciação de células pluripotentes humanas. De acordo com dados da

literatura, confirmou-se que o perfil de miRNAs em VEs reflete o miRnoma de cada tipo celular, conseqüentemente, quando encontrou-se diferença entre as células também encontrou-se diferença quando comparadas apenas VEs entre si (BAGLIO et al., 2015; NUZHAT et al., 2015; PIGATI et al., 2010). Em alguns casos, porém, a diferença de expressão se distinguiu, por exemplo, NSCs expressaram 3,5 vezes mais miR-26b que iPSCs enquanto que vesículas de NSCs expressaram cerca de 11 vezes mais miR-26b que vesículas de iPSCs. Quando se comparou VEs de NSCs com NSCs intracelular, não houve diferença significativa na expressão de miR-26b, o mesmo aconteceu no caso de iPSCs. Isso sugere que, por algum motivo, NSCs liberam mais deste miRNA no meio extracelular que iPSCs, e portanto, miR-26b pode ter um papel mais específico no microambiente de NSCs que de iPSCs. Essa mesma observação foi encontrada para diversos outros miRNAs, como miR-20a, miR-15b, miR-532.

Ao se comparar miRNAs de VEs e intracelulares de cada população celular, observou-se um conjunto de miRNAs consistentemente *upregulated* em VEs nos três tipos celulares. Este conjunto inclui os miRNAs miR-1274A, miR-1274B, miR-1300, miR-886-5p, miR-886-3p. Contudo, todos estes miRNAs foram excluídos do banco de dados miRBase uma vez que foram identificados como fragmentos de outros tipos de RNAs. Em 2010, um estudo mostrou que miR-1274A, miR-1274B e miR-886-5p são produtos do processamento de RNA transportadores (tRNA), respectivamente, tRNA^{Lys3}, tRNA^{Lys5}, tRNA^{Ala} (SCHOPMAN et al., 2010). Fragmentos de RNA transportador (*Transfer RNA fragments* - tRFs) são fragmentos de 14-32 nucleotídeos derivados de tRNAs maduros ou precursores e são precisamente gerados independente da via de biogênese de miRNAs (LEE et al., 2009). Assim como precursores de miRNAs, tRNAs também formam estrutura em *stem-loop hairpin* e os tRFs podem se originar do *stem* do *hairpin*, uma característica típica de miRNAs maduros, possivelmente levando a uma interpretação errônea sobre a natureza destes fragmentos. Interessantemente, estes fragmentos pequenos também possuem função reguladora de expressão de mRNAs que se assemelha à função de miRNAs e têm sido encontrados em abundância em várias análises de sequenciamento de VEs quando comparados com tRNAs maduros (40-100 nt)

(BAGLIO et al., 2015; KEAM; HUTVAGNER, 2015; NOLTE' T HOEN et al., 2012; VOJTECH et al., 2014).

No caso de miR-886-3p e -5p, apesar destes pequenos RNAs maduros mostrarem estar presentes no meio intracelular, foram encontrados em maior quantidade em VEs no presente estudo. Inicialmente conhecido como miRNA precursor (pre-miR-886) ou um *vault* RNA (vtRNA2-1), estudos têm mostrado que nc886 (*non coding* 886, de ~100nt) não está envolvido com vias de miRNA ou como componente do complexo *vault*, um complexo ribonucleoproteico (LEE et al., 2011, 2014; LEE, 2015). Um trabalho demonstrou que este RNA possui uma vida média curta e gera os subprodutos maduros -3p e -5p com muita baixa eficiência quando comparado com miRNA convencional a ponto de não ser possível a detecção dos mesmos no ambiente intracelular, concluindo que o mesmo não geraria miRNAs maduros funcionais (LEE et al., 2011). Entretanto, evidências funcionais de nc886 revelaram o efeito regulador do mesmo sobre a expressão de proteínas como *Protein Kinase RNA-activated* (PKR) (JEON et al., 2012; KUNKEAW et al., 2013; LEE et al., 2011) e tem sido considerado supressor tumoral controlando oncogenes como FOS, NF-κB e MYC (LEE et al., 2014). Apesar destes achados, o mesmo estudo mencionado anteriormente que mostrou a natureza de miR-1274 como tRF, também mostrou que a sequência de miR-886-5p equivale a do tRNA^{Ala}, mas não descreveu sobre o miR-886-3p (SCHOPMAN et al., 2010). Nenhum outro estudo até o momento foi publicado caracterizando a natureza destes fragmentos como “miR-886-3p” e “-5p”, o que não descarta a possibilidade dos mesmos terem sido abordados com outra nomenclatura. De fato, quando se realiza busca por pareamento de bases pela ferramenta BLAST, a sequência de ambos possui 100% de identidade com o vault RNA vtRNA2-1.

O miRNA maduro miR-1300 foi removido do miRBase por ser caracterizado como fragmento do mRNA *Elongation factor 1-alpha* (EEF1A) (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0006360). EEF1A é uma subunidade do complexo de fator de alongação, membro do aparato de tradução proteica, responsável pela entrega enzimática de aminoacil tRNAs para o ribossomo, além de funcionar como GTPase, como *bundling* de actina, participar no processo de exportação nuclear e proteólise, dentre outros (review (MATEYAK; KINZY,

2010). EEF1A possui duas isoformas, EEF1A1 e EEF1A2, sendo a EEF1A2 expressa exclusivamente em tecido muscular, cardíaco e neuronal e apresentam controle de expressão altamente regulado. O mRNA de ambas apresentam elevada homologia no *open reading frame* (ORF), porém, se diferem nas regiões 3' e 5' UTRs, com presença de elementos como *cytoplasmic polyadenylation element* (CPE), *AU-rich element* (ARE) no mRNA de EEF1A1 sugerindo baixa estabilidade da isoforma. De fato, foi demonstrado que, apesar da proteína ser bem estável para ambas isoformas, o tempo de meia vida do mRNA se difere entre as mesmas, sendo EEF1A1 mais instável em relação a EEF1A2 (VISLOVUKH et al., 2013). Sustentando tal dado, confirmou-se pelo BLAST que a sequência de miR-1300 possui pareamento com 100% de identidade com a isoforma EEF1A1, porém não há trabalhos na literatura que descrevem sobre fragmentos de EEF1A ou que correlacionem miR-1300 com fragmento de EEF1A.

Dentre estes miRNAs consistentemente superexpressos em VEs, miR-1300 é o menos expresso nos três tipos celulares (apresentando Cqs acima de 31) e o único que não apresenta diferença entre os tipos celulares. Interessantemente, todos os outros, miR-1274A, miR-1274B, miR-886-5p e miR-886-3p, são mais expressos em iPSCs. Diante do exposto, um aspecto intrigante a ser explorado é o motivo pelo qual a célula gera estes fragmentos, sejam eles de tRNAs, vtRNAs ou mRNAs, para serem liberados imediatamente e o papel exercido pelos mesmos em mecanismos de diferenciação.

Apesar do conteúdo apresentado e discutido até o momento nesta versão da tese, muito tem a ser explorado no que diz respeito aos miRNAs diferencialmente expressos, à quantificação relativa dos níveis de expressão, à identificação *in silico* de mRNAs candidatos à regulação por tais miRNAs e ao contexto biológico geral de vias de sinalização potencialmente reguladas pelos miRNAs identificados. Todos estes aspectos estão sob análise e preparação em forma de manuscrito.

4.3 Conclusões

Diante do apresentado e discutido na parte 2 da tese, podemos concluir que:

- Perfil de tamanho de RNAs encontrados em VEs difere entre os tipos celulares, com VEs de células diferenciadas (NSCs e FPPs) apresentando picos de RNAs longos inexistentes em VEs de células pluripotentes (iPSCs).

- Células pluripotentes (iPSCs) liberam uma quantidade superior de RNAs que células diferenciadas (NSCs e FPPs) com base na massa de RNA por mL de meio coletado, apesar das condições de cultivo e coleta de meio condicionado de cada tipo celular.

- A alteração do perfil de miRNAs intracelulares e de VEs é mais acentuada quando células deixam o estado de pluripotência (iPSCs) e adquirem fenótipo neural (NSCs ou FPPs) do que entre células neurais que se distinguem pelo nível de diferenciação (NSCs e FPPs).

- Perfil de alteração de miRNAs de VEs reflete o perfil de alteração de expressão de miRNAs intracelulares durante a diferenciação.

- Alguns miRNAs intracelulares como miR-642 e miR-885-5p se encontram mais expressos em FPPs que NSCs, revelando possíveis novos alvos de estudo no contexto da diferenciação dopaminérgica.

- Os três tipos celulares apresentaram quantidade semelhante de miRNAs diferencialmente expressos em VEs quando comparados com miRNAs intracelulares.

- VEs apresentaram uma assinatura própria de pequenos RNAs, observada pelo enriquecimento de “miR-1274A”, “miR-1274B”, “miR-1300”, “miR-886-5p” e “miR-886-3p”, anteriormente considerados miRNAs, mas atualmente descritos como fragmentos de outros tipos de RNAs (tRNAs, mRNAs, vtRNAs).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O projeto teve início com intensa caracterização da biogênese e liberação de VEs derivados de células-tronco embrionárias murinas. Nessa primeira parte, coletamos diversas evidências de que este tipo de células-tronco pluripotentes liberam VEs, sendo os mesmos com tamanho entre 50-150 nm, forma *cup-shaped*, expressando marcadores típicos e enriquecidos em pequenos RNAs, como esperado. Além disso, mostramos a caracterização ultraestrutural e molecular, destacando eventos diretamente relacionados à biogênese de VEs (MVBs, *shedding vesicles*) e expressão de marcadores de via endocítica tanto em células-tronco pluripotentes como em blastocistos, respectivamente. O estudo teve seguimento com outra abordagem de modelo de células-tronco pluripotentes, as células-tronco pluripotentes induzidas humanas. Com este modelo seguimos com diferenciação em células-tronco neurais e em um nível mais avançado de comprometimento neural, as células progenitoras dopaminérgicas. O perfil de miRNAs, tanto intracelular como extracelular (em vesículas especificamente), foi então realizado nesses três tipos celulares.

A modulação de processos do desenvolvimento neural pela participação indispensável de pequenos RNAs não codificantes, como os miRNAs, é um fenômeno biológico já bem aceito e um assunto cada vez mais consolidado. Porém, desvendar o papel de cada um dos miRNAs nas complexas vias de sinalização que regem o desenvolvimento neuronal é um desafio que ainda permanece aberto para ser mais explorado. Neste contexto, devemos considerar que miRNAs também podem ser entregues por outras células do nicho de cada tipo celular ou podem ser liberados por cada tipo celular para constituir seu próprio microambiente, necessário para manutenção de um equilíbrio tanto intra como extracelular. Desta maneira, a contribuição deste estudo foi revelar novos potenciais miRNAs essenciais na diferenciação dopaminérgica e miRNAs (e outros pequenos RNAs) encontrados em VEs o que possibilitará um estudo aprofundado dos mesmos como sinais regulatórios extracelulares. Além disso, os dados de miRNAs de VEs oferecem uma base extremamente relevante para investigação de FPPs não apenas como progenitores dopaminérgicos, mas também como células neuroepiteliais da base do

tubo neural com atividade endocítica elevada, como células consideradas centro organizador no desenvolvimento e como células tidas como elemento fundamental no envio de sinais para o adequado cruzamento de neurônios pela linha medial no tubo neural. Todos estes fenômenos precisam ser estritamente controlados uma vez que a falha pode acarretar em implicações clínicas. Devido a isso, compreender melhor o funcionamento dos sinais que regulam tais eventos é de extrema importância não só na biologia molecular básica do neurodesenvolvimento, mas também como uso de miRNAs e/ou VEs em terapias independentes de células.

De fato, miRNAs específicos têm sido empregados com sucesso como métodos de reprogramação e diferenciação, justamente pelo impacto refinado dos mesmos sobre mRNA e vias específicas resultando em um controle minucioso do fenótipo celular. Por também serem biomarcadores de condições patológicas, os miRNAs se tornam potenciais alvos para terapias capazes de reestabelecer níveis normais dos mesmos. Assim, este trabalho fornece dados que auxiliam na compreensão da função de miRNAs e que sustentam o uso direto ou indireto de miRNAs na diferenciação neuronal dopaminérgica a partir de hiPSCs, um desafio persistente devido à elevada implicação em terapia celular de doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson.

VEs têm sido mostradas como ótimas ferramentas para fins terapêuticos por atuarem como veículos de entrega de biomoléculas moduladoras. Por refletirem o conteúdo de sua célula de origem, VEs de células-tronco são eficazes na indução de sobrevivência e proliferação celular dentre outros efeitos desencadeados pelas moléculas entregues para células/tecidos receptores. Estas características abrem caminhos para o uso de VEs de tipo celular específico como alternativa à terapia celular, uma vez que esta é passível de levar a consequências ainda não controladas (como tumor). Neste sentido, este estudo também oferece uma considerável contribuição ao caracterizar o perfil de miRNAs de cada tipo celular fornecendo indícios de como determinada fonte de VEs pode ser útil de acordo com seu conteúdo.

REFERÊNCIAS*

ABEMATSU, M.; SMITH, I.; NAKASHIMA, K. Mechanisms of neural stem cell fate determination: extracellular cues and intracellular programs. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 2, p. 267–277, 2006.

ABRANCHES, E. et al. Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: A road map to neurogenesis in the embryo. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6286, 2009.

AFANASYEVA, E. A et al. MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 6, p. 974–984, 2011.

AKERBLOM, M.; JAKOBSSON, J. MicroRNAs as Neuronal Fate Determinants. **Neuroscientist**, v. 20, n. 3, p. 235–242, 2014.

ALURAL, B. et al. EPO mediates neurotrophic, neuroprotective, anti-oxidant, and anti-apoptotic effects via downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y neuron-like cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 475, 2014.

ANDERSON, R. M. et al. Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. **Development**, v. 129, n. 21, p. 4975–4987, 2002.

ANNENKOV, A. The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis. **Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 3, p. 195–215, 2009.

ARANTES, C. et al. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **GLIA**, v. 57, n. 13, p. 1439–1449, 2009.

ARMANT, D. R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. **Developmental Biology**, v. 280, n. 2, 2005.

AUBERT, J. et al. Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1240–1245, 2002.

BAEK, S.; CHOI, H.; KIM, J. Ebf3-miR218 regulation is involved in the development of dopaminergic neurons. **Brain Research**, v. 1587, n. 1, p. 23–32, 2014.

BAGLIO, S. R. et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. **Stem cell research & therapy**, v. 6, p. 127, 2015.

BECLIN, C. et al. miR-200 family controls late steps of postnatal forebrain neurogenesis via Zeb2 inhibition. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35729, 2016.

BENVEGNÙ, S.; POGGIOLINI, I.; LEGNAME, G. Neurodevelopmental expression and localization of the cellular prion protein in the central nervous system of the mouse. **Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 11, p. 1879–1891, 2010.

BERALDO, F. H. et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB Journal**, v. 27, n. 9, p. 3594–3607, 2013.

BIAN, S.; XU, T. LE; SUN, T. Tuning the cell fate of neurons and glia by microRNAs. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 6, p. 928–934, 2013.

BIBEL, M. et al. Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1034–1043, 2007.

BOBRIE, A. et al. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 1, p. 18397, 2012.

BRISCOE, J. et al. A hedgehog-insensitive form of Patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of Sonic hedgehog in the neural tube. **Molecular Cell**, v. 7, n. 6, p. 1279–1291, 2001.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

- BRISCOE, J.; SMALL, S. Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. **Development**, v. 142, n. 23, p. 3996–4009, 2015.
- CAMUSSI, G.; DEREGIBUS, M. C.; CANTALUPPI, V. Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. **Biochemical Society transactions**, v. 41, n. 1, p. 283–287, 2013.
- CAPETIAN, P. et al. Plasmid-Based Generation of Induced Neural Stem Cells from Adult Human Fibroblasts. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p. 245, 2016.
- CAVINESS, V. S. Cell Output, Cell Cycle Duration and Neuronal Specification: a Model of Integrated Mechanisms of the Neocortical Proliferative Process. **Cerebral Cortex**, v. 13, n. 6, p. 592–598, 2003.
- CHAMBERS, S. M. et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 275–280, 2009.
- CHANDRASEKAR, V.; DREYER, J. L. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 42, n. 4, p. 350–362, 2009.
- CHO, A. et al. Calcineurin signaling regulates neural induction through antagonizing the BMP pathway. **Neuron**, v. 82, n. 1, p. 109–124, 2014.
- CHOI, D. S. et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. **Proteomics**, v.13, n. 10-11, p. 1554-1571, 2013.
- COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43-51, 2009.
- COLOMBO, M. et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **Journal of cell science**, v. 126, n. 24, p. 5553–5565, 2013.
- COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 30, n. 8, p. 255–289, 2014.
- CONTI, L. et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. **PLoS Biology**, v. 3, n. 9, p. 1594–1606, 2005.
- DE LOS ANGELES, A. et al. Hallmarks of pluripotency. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 469–478, 2015.
- DE MIGUEL, M. P.; FUENTES-JULIÁN, S.; ALCAINA, Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. **Stem Cell reviews**, v. 6, n. 4, p. 633–649, 2010.
- DESSAUD, E. et al. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 717–720, 2007.
- DESSAUD, E.; MCMAHON, A. P.; BRISCOE, J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. **Development**, v. 135, n. 15, p. 2489–2503, 2008.
- EIRAKU, M. et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 5, p. 519–532, 2008.
- ELKABETZ, Y.; STUDER, L. Human ESC-derived neural rosettes and neural stem cell progression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 73, p. 377–387, 2008.
- EPIS, M. R. et al. Regulation of expression of deoxyhypusine hydroxylase (DOHH), the enzyme that catalyzes the activation of eIF5A, by miR-331-3p and miR-642-5p in prostate cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35251–35259, 2012.
- ERLICH, R. B. et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **GLIA**, v. 55, n. 16, p. 1690–1698, 2007.
- FARH, K. K.-H. et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1817–1821, 2005.
- FONSECA, A. C. et al. Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human

- glioblastoma cells. **Neuroscience**, v. 200, p. 130–141, 2012.
- GEORGE, J. N. et al. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. **Blood**, v. 60, n. 4, p. 834–840, 1982.
- GERMAIN, N.; BANDA, E.; GRABEL, L. Embryonic stem cell neurogenesis and neural specification. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 535–542, 2010.
- GILDEA, J. J. et al. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 15, p. 89–94, 2014.
- GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 10, p. 777–788, 2005.
- GRAVES, P.; ZENG, Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 239–245, 2012.
- GREGORY, P. A. et al. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 10, p. 1686–1698, 2011.
- GREVE, T. S.; JUDSON, R. L.; BLELLOCH, R. microRNA control of mouse and human pluripotent stem cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 29, p. 213–239, 2013.
- GUAN, Y. et al. Function of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Supporting Cells in Neural Progenitor Cell Maturation and Long Term Cxpansion. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2013.
- HAGA, H. et al. Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, p. 24900, 2015.
- HAJJ, G. N. M. et al. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 17, p. 3211–3227, 2013.
- HANKE, M. et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. **Urologic oncology**, v. 28, n. 6, p. 655–61, 2010.
- HANSON, P. I.; CASHIKAR, A. Multivesicular Body Morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 337–362, 2012.
- HEIJNEN, H. F. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791–3799, 1999.
- HENNE, W. M.; BUCHKOVICH, N. J.; EMR, S. D. The ESCRT Pathway. v. 21, n. 1, p. 77-91. **Developmental Cell**, 2011.
- HERNANDEZ-ENRIQUEZ, B. et al. Floor plate-derived neuropilin-2 functions as a secreted semaphorin sink to facilitate commissural axon midline crossing. **Genes & development**, v. 29, n. 24, p. 2617–32, 2015.
- HICKS, S. D. et al. Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 52, 2016.
- HURLEY, J. H.; HANSON, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 8, p. 556–566, 2010.
- HUSSEIN, N. A. E. M. et al. Plasma miR-22-3p, miR-642b-3p and miR-885-5p as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 1, p. 1–11, 2016.
- JEON, S. H. et al. Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR. **FEBS Letters**, v. 586, n. 19, p. 3477–3484, 2012.
- JESSELL, T. M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes.

Nature Reviews Genetics, v. 1, n. 1, p. 20–29, 2000.

JI, F.; LV, X.; JIAO, J. The Role of microRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 2, p. 61–66, 2013.

KEAM, S.; HUTVAGNER, G. tRNA-Derived Fragments (tRFs): Emerging New Roles for an Ancient RNA in the Regulation of Gene Expression. **Life**, v. 5, n. 4, p. 1638–1651, 2015.

KELLER, S. et al. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. **Immunology Letters**, v. 107, n. 2, p.102-108, 2006.

KENNEDY, M. B. et al. Signaling Mechanisms Controlling Cell Fate and Embryonic Patterning. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**, v. 4, n. 8, p. a005975, 2014.

KEUNG, A. J.; KUMAR, S.; SCHAFFER, D. V. Presentation counts: microenvironmental regulation of stem cells by biophysical and material cues. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 26, p. 533–556, 2010.

KIM, Y.-K.; KIM, B.; KIM, V. N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 13, p. 1881-1889, 2016.

KINTNER, C. Neurogenesis in Embryos and in Adult Neural Stem Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 639–643, 2002.

KOSAKA, N. et al. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. **Silence**, v. 1, n. 1, p. 7, 2010.

KRICHEVSKY, A. M. et al. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. **Stem cells**, v. 24, n. 4, p. 857–864, 2006.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, 2010.

KSHITIZ et al. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. **Integrative Biology**, v. 4, n. 9, p. 1008–1018, 2012.

KUNKEAW, N. et al. Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3722–3731, 2013.

KUTEJOVA, E. et al. Neural Progenitors Adopt Specific Identities by Directly Repressing All Alternative Progenitor Transcriptional Programs. **Developmental Cell**, v. 36, n. 6, p. 639–653, 2016.

LAMB, T. M.; HARLAND, R. M. Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. **Development**, v. 121, n. 11, p. 3627–3636, 1995.

LE DRÉAU, G.; MARTÍ, E. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: A tale of three signals. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 12, p. 1471–1481, 2012.

LEE, K. et al. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. **RNA**, v. 17, n. 6, p. 1076–1089, 2011.

LEE, K.-S. et al. nc886, a non-coding RNA of anti-proliferative role, is suppressed by CpG DNA methylation in human gastric cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 11, p. 3944–3955, 2014.

LEE, Y. S. et al. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). **Genes Development**. v. 23, n. 22, p. 2639–2649, 2009.

LEE, Y. S. A Novel Type of Non-coding RNA, nc886, Implicated in Tumor Sensing and Suppression. **Genomics & Informatics**, v. 13, n. 2, p. 26, 2015.

LEK, M. et al. A homeodomain feedback circuit underlies step-function interpretation of a Shh morphogen gradient during ventral neural patterning. **Development**, v. 137, n. 23, p. 4051–4060, 2010.

LEROU, P. H.; DALEY, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. **Blood Reviews**, v. 19, n. 6, p. 321-331, 2005.

- LI, S. et al. MicroRNA-765 regulates neural stem cell proliferation and differentiation by modulating Hes1 expression. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 7, p. 3115–3123, 2016.
- LIMA, F. R. S. et al. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2164–2176, 2007.
- LIPCHINA, I. et al. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. **Genes & development**, v. 25, n. 20, p. 2173–2186, 2011.
- LIU, C. et al. Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 5, p. 433–444, 2010.
- LIU, J. et al. A reciprocal antagonism between miR-376c and TGF- signaling regulates neural differentiation of human pluripotent stem cells. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 11, p. 4642–4656, 2014.
- LONGSHAW, V. M. et al. Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 88, n. 3, p. 153–166, 2009.
- LUPO, G. et al. Multiple roles of Activin/Nodal, bone morphogenetic protein, fibroblast growth factor and Wnt/ β -catenin signalling in the anterior neural patterning of adherent human embryonic stem cell cultures. **Open Biology**, v. 3, n. 4, p. 120167, 2013.
- MATEYAK, M. K.; KINZY, T. G. eEF1A: Thinking outside the ribosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21209–21213, 2010.
- MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010.
- MEIER, C. et al. P73 and IGF1R regulate emergence of aggressive cancer stem-like features via miR-885-5p control. **Cancer Research**, v. 76, n. 2, p. 197–205, 2016.
- MISKA, E. A. et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. **Genome Biology**, v. 5, n. 9, p. R68, 2004.
- MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 30, p. 10513–10518, 2008.
- MOODY, S. A. et al. On becoming neural: what the embryo can tell us about differentiating neural stem cells. **American Journal of Stem Cells**, v. 2, n. 2, p. 74–94, 2013.
- MORGADO, A. L.; RODRIGUES, C. M. P.; SOLÁ, S. MicroRNA-145 Regulates Neural Stem Cell Differentiation Through the Sox2-Lin28/let-7 Signaling Pathway. **Stem cells**, v. 34, n. 5, p. 1386–1395, 2016.
- MORIZANE, A. et al. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 2, p. 117–126, 2011.
- NICKEL, W. Unconventional secretory routes: Direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. **Traffic**, v. 6, n. 8, p. 607–614, 2005.
- NISHIKAWA, S.; GOLDSTEIN, R. A.; NIERRAS, C. R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 725–729, 2008.
- NOLTE' T HOEN, E. N. M. et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 9272–9285, 2012.
- NUZHAT, Z. et al. Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer - liquid biopsies as indicators of tumour progression. **Oncotarget**, 2016. [Epub ahead of print].
- OKADA, Y. et al. Spatiotemporal Recapitulation of Central Nervous System Development by Murine Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 12, p. 3086–3098, 2008.

- OOSTERVEEN, T. et al. SoxB1-driven transcriptional network underlies neural-specific interpretation of morphogen signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 18, p. 7330–7335, 2013.
- PAP, E. et al. Highlights of a new type of intercellular communication: Microvesicle-based information transfer. **Inflammation Research**, v. 58, n. 1, p. 1–8, 2009.
- PARRA, L. L. M.; ZOU, Y. Sonic hedgehog induces response of commissural axons to Semaphorin repulsion during midline crossing. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 29–35, 2010.
- PATTERSON, M. et al. let-7 miRNAs can act through notch to regulate human gliogenesis. **Stem cell reports**, v. 3, n. 5, p. 758–773, 2014.
- PELÁEZ, N.; CARTHEW, R. W. Biological Robustness and the Role of MicroRNAs. A Network Perspective. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 99, p. 237–255, 2012.
- PELTON, T. A. et al. Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 2, p. 329–339, 2002.
- PHAM, J. T.; GALLICANO, G. I. Specification of neural cell fate and regulation of neural stem cell proliferation by microRNAs. **American journal of stem cells**, v. 1, n. 3, p. 182–195, 2012.
- PIGATI, L. et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13515, 2010.
- PRINSLOO, E. et al. Chaperoning stem cells: A role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation. **BioEssays**, v.31, n. 4, p. 370–377, 2009.
- PRZYBYLA, L. M.; VOLDMAN, J. Attenuation of extrinsic signaling reveals the importance of matrix remodeling on maintenance of embryonic stem cell self-renewal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 3, p. 835–840, 2012.
- PUENTE, L. G. et al. Identification of candidate regulators of embryonic stem cell differentiation by comparative phosphoprotein-affinity profiling. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 57–67, 2006.
- QUESENBERRY, P. J.; ALIOTTA, J. M. The paradoxical dynamism of marrow stem cells: Considerations of stem cells, niches, and microvesicles. **Stem Cell Reviews**, v. 4, n. 3, p. 137–147, 2008.
- RALSTON, A.; ROSSANT, J. The genetics of induced pluripotency. **Reproduction**, v. 139, n.1, p. 35–44, 2010.
- RANI, N. et al. A Primate lncRNA Mediates Notch Signaling during Neuronal Development by Sequestering miRNA. **Neuron**, v. 90, n. 6, p. 1174–1188, 2016.
- RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.
- RATAJCZAK, J. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, v. 20, n. 5, p. 847–856, 2006.
- RIBES, V. et al. Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. **Genes and Development**, v. 24, n. 11, p. 1186–1200, 2010.
- ROSA, A.; BRIVANLOU, A. H. Regulatory non-coding RNAs in pluripotent stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14346–14373, 2013.
- ROSA, A.; SPAGNOLI, F. M.; BRIVANLOU, A. H. The miR-430/427/302 Family Controls Mesendodermal Fate Specification via Species-Specific Target Selection. **Developmental Cell**, v. 16, n. 4, p. 517–527, 2009.
- ROXRUD, I.; STENMARK, H.; MALERØD, L. ESCRT & Co. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 102, n. 5, p. 293–318, 2010.
- ROY, N. S. et al. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by

- coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. **Nature Medicine**, v. 12, n. 11, p. 1259–1268, 2006.
- SABA, R. et al. Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. **Molecular and cellular biology**, v. 32, n. 3, p. 619–632, 2012.
- SACHDEVA, R. et al. Tracking differentiating neural progenitors in pluripotent cultures using microRNA-regulated lentiviral vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p. 11602–11607, 2010.
- SANCHEZ-DANES, A. et al. Efficient generation of A9 midbrain dopaminergic neurons by lentiviral delivery of LMX1A in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. **Human Gene Therapy**, v. 23, n. 1, p. 56–69, 2012.
- SANTOS, D. P.; KISKINIS, E. Generation of Spinal Motor Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. **Methods Molecular Biology**, v. 1538, p. 53–66, 2017.
- SANTOS, M. C. T. et al. miR-124, -128, and -137 Orchestrate Neural Differentiation by Acting on Overlapping Gene Sets Containing a Highly Connected Transcription Factor Network. **Stem Cells**, v. 34, n. 1, p. 220–232, 2016.
- SANTOS, T. G. et al. Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. **Stem cells**, v. 29, n. 7, p. 1126–1136, 2011.
- SASAI, N.; KUTEJOVA, E.; BRISCOE, J. Integration of signals along orthogonal axes of the vertebrate neural tube controls progenitor competence and increases cell diversity. **PLoS Biology**, v. 12, n. 7, p. e1001907, 2014.
- SCHOPMAN, N. C. T. et al. A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA. **RNA Biology**, v. 7, n. 5, p. 573–576, 2010.
- SETATI, M. M. et al. Leukemia inhibitory factor promotes Hsp90 association with STAT3 in mouse embryonic stem cells. **IUBMB Life**, v. 62, n. 1, p. 61–66, 2010.
- SHENG, G. Epiblast morphogenesis before gastrulation. **Developmental Biology**, v. 401, n. 1, p. 17–24, 2015.
- SHENOY, A.; BLELLOCH, R. H. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 9, p. 565–76, 2014.
- SHOJA-TAHERI, F.; DEMARCO, A.; MASTICK, G. S. Netrin1-DCC-Mediated Attraction Guides Post-Crossing Commissural Axons in the Hindbrain. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 33, p. 11707–11718, 2015.
- SKREKA, K. et al. Identification of differentially expressed non-coding RNAs in embryonic stem cell neural differentiation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 13, p. 6001–6015, 2012.
- SMIRNOVA, L. et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 1469–1477, 2005.
- SNOW, M. H. L. Gastrulation in the mouse: growth and regionalization of the epiblast. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 42, n. 2, p. 293–303, 1977.
- SOARES, I. N. et al. Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, p. 3253–70, 2013.
- SOLOZOBOVA, V.; WYVEKENS, N.; PRUSZAK, J. Lessons from the Embryonic Neural Stem Cell Niche for Neural Lineage Differentiation of Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 3, p. 813–829, 2012.
- STAPPERT, L. et al. MicroRNA-Based Promotion of Human Neuronal Differentiation and Subtype Specification. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59011, 2013.
- STAPPERT, L.; ROESE-KOERNER, B.; BRÜSTLE, O. The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. **Cell and Tissue Research**, v. 359, n. 1, p. 47–

64, 2015.

STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 513–25, 2009.

SUN, B. et al. N-Glycoproteome of E14.Tg2a Mouse Embryonic Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55722, 2013.

SZULWACH, K. E. et al. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 1, p. 127–141, 2010.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 107, n. 5, p. 861–872, 2007.

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, J. et al. A novel biomarker Linc00974 interacting with KRT19 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma. **Cell death & disease**, v. 5, n. 12, p. e1549, 2014.

THÉRY, C. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current protocols in cell biology**, Chapter 3, Unit 3.22, 2006.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 1998.

TREMBLAY, P. et al. Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. **Brain Research**, v. 1139, n. 1, p. 60–67, 2007.

TROPEPE, V. et al. Direct Neural Fate Specification from Embryonic Stem Cells. **Neuron**, v. 30, n. 1, p. 65–78, 2001.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.

VILLARROYA-BELTRI, C. et al. Sorting it out: Regulation of exosome loading. **Seminars in Cancer Biology**, v. 28, p. 3-13, 2014.

VISLOVUKH, A. A. et al. mRNAs coding for A1 and A2 Isoforms of translation factor eEF1 demonstrate different half-lives while A1 and A2 proteins are similarly stable in MCF7 cells. **Biopolymers and Cell**, v. 29, n. 5, p. 389–394, 2013.

VOJTECH, L. et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 11, p. 7290–7304, 2014.

WADDINGTON, C. H. Organisers and Genes. **Cambridge Univ. Press.**, p. 1905–1975, 1940.

WARREN, L. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. **Cell stem cell**, v. 7, n. 5, p. 618–30, 2010.

WEI, Z. et al. Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. **Scientific Reports**, v. 6, p. 31175, 2016.

WICHTERLE, H. et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. **Cell**, v. 110, n. 3, p. 385–397, 2002.

WITWER, K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, p. 20360, 2013.

WOLLERT, T. et al. Membrane scission by the ESCRT-III complex. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 172–177, 2009.

XIN, H. et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. **Stem Cells**, v. 30, n. 7, p. 1556–1564, 2012.

YAN, Y. et al. Pluripotent stem cell expansion and neural differentiation in 3-D scaffolds of tunable Poisson's ratio. **Acta Biomaterialia**, v. 49, p. 192-203, 2016.

- YING, Q.-L. et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 183–186, 2003.
- YING, Q. L.; SMITH, A. G. Defined Conditions for Neural Commitment and Differentiation. **Methods in Enzymology**, v. 365, p. 327-341, 2003.
- YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.
- YU, K.; MCGLYNN, S.; MATISE, M. P. Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. **Development**, v. 140, n. 7, p. 1594–1604, 2013.
- ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307–3316, 2002.
- ZHANG, Z. et al. miR-885-5p suppresses hepatocellular carcinoma metastasis and inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 75038–75051, 2016.
- ZHAO, C. et al. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 5, p. 1876–1881, 2010.
- ZHAO, P. et al. Neurogenin 2 enhances the generation of patient-specific induced neuronal cells. **Brain Research**, v. 1615, p. 51–60, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – MANUSCRITO SUBMETIDO

Journal: Stem Cells Review and Reports

Evidence of extracellular vesicles biogenesis and release in mouse embryonic stem cells: a potential mode of intercellular signaling to stemness maintenance

Running title: Extracellular vesicles in mouse embryonic stem cells

Lilian Cruz¹, Jenny Andrea Arevalo Romero¹, Tiago G. Santos and Marilene Hohmuth Lopes^{1*}

Disclosures

The authors declare that they have no conflicts of interest.

*Corresponding author: Marilene Hohmuth Lopes, e-mail: marilenehl@usp.br or

marilenehlopes@gmail.com; Laboratory of Neurobiology and Stem Cells, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 - Room 431 - 05508-000 Sao Paulo- Brazil

SUMMARY

Extracellular vesicles (EVs) released by mouse embryonic stem cells (mESCs) are considered a source of bioactive molecules able to modulate their microenvironment by acting on intercellular communication. Either intracellular endosomal machinery or their derived EVs have been considered a relevant system of signal circuits processing. Herein, we provided evidence that support these features in mESCs. By ultrastructural analysis, structures or organelles of the endosomal system were clearly evidenced such as coated pits and vesicles related to endocytosis, prominent rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, multivesicular bodies (MVBs) containing few or many intraluminal vesicles (ILVs) that could be released as exosomes to extracellular milieu. Besides, budding vesicles shed from the plasma membrane to the extracellular space suggest microvesicle biogenesis in mESCs. mESCs and mouse blastocyst express specific markers of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) system and mESCs present a peculiar distribution of the unconventional lipid LBPA. Ultrastructural analysis and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) of isolated EVs revealed a heterogeneous population of exosomes and microvesicles released by mESCs. These vesicles contain common EVs markers and also the co-chaperone stress inducible protein 1 (STI1) and its partner Hsp90. Overall, the present study sustains the potential function of the mESCs endocytic network and their EVs as considerable elements in stem cell biology.

Keywords mouse embryonic stem cells, extracellular vesicles, vesicles biogenesis, endosomal trafficking, transmission electron microscopy

INTRODUCTION

Embryonic stem cells (ESCs) are generally derived from the inner cell mass (ICM) of the pre-implantation embryo and are extensively used as a model to study the early mammalian development. ESCs are characterized by three peculiar features: pluripotency, self-renewal and limitless proliferation. The conservation of a pluripotent state is the result of a reciprocal effect between several signaling pathways such as transcriptional regulation circuitry, epigenetic control of gene expression, and singular cell cycle maintenance (1–3).

Within their microenvironment, ESCs are sensitive to multiple signals, exerting influences that collectively regulate their fate and their function in a spatiotemporal manner. These extrinsic cellular factors include soluble and immobilized factors, extracellular matrix molecules as well as signals presented by neighborhood cells. The adequate presentation of these numerous regulatory signals is necessary for the correct tissue development and homeostasis (4–7). Thus, the ESCs phenotype is continuously adjusted by the specific conditions of the microenvironment in which they are inserted.

There is growing evidence that point out for the role of vesicles released by different cell types to the extracellular environment as carriers of signals, including proteins, lipids and small RNAs (8–10). These extracellular vesicles (EVs) are considered novel members of cellular microenvironment since they can regulate specific intracellular signaling modulating target cell phenotype and function. These EVs include the most common defined nomenclatures, exosomes and microvesicles, that differ based on their biogenesis processes and biophysical properties, such as size and content (11).

Exosomes are small homogenous particles sizing between 40 to 100nm in diameter and are derived from the recycle endocytic pathway. They are intraluminal vesicles (ILVs) present inside of multivesicular bodies (MVBs) which can fuse with the plasma membrane and release their ILVs to the extracellular milieu as exosomes or also be directed to the degradation through lysosomes. The microvesicles are more heterogeneous population, sizing 50 to 1000nm in diameter and are produced

through direct budding from the plasma membrane, thus carrying the same components of the cell membrane of origin (12–16).

Although many efforts have been made to explain stem cell plasticity focused on external signaling molecules, receptors and target gene activation, some evidence suggest that signal transduction mediated by endosomes-like compartments and/or endosome-associated proteins may play a relevant role in the intracellular signal amplification and regulation (17–20). Hence, to investigate both the role of EVs from ESCs as microenvironment modulators and how the endocytic machinery works in ESCs might be crucial to elucidate the mechanisms required to control stem cell plasticity and reprogramming.

Here, we have demonstrated ultrastructural and biochemical evidence of vesicles biogenesis machinery in mouse ESCs (mESCs) and blastocysts and highlighted the importance of the endocytic processes and the participation of EVs as a potential and considerable players of stemness and cell fate commitment.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

E14.Tg2a mES cell line derived from *Mus Musculus* strain 129/Ola3 (American Type Culture Collection, ATCC; CRL-1821) was cultivated in a feeder cell independent manner. Briefly, cells were maintained on 0.1% gelatin-coated tissue culture dishes in GMEM (Invitrogen) medium supplemented with 2mM glutamine, 1mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 15% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco), 50 μ M β -mercaptoethanol, penicillin/streptomycin (1%) and 1000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (ESGRO[®] LIF; Millipore, Billerica, MA), pH7.4, at 37°C in a water-saturated atmosphere containing 5% CO₂. For conditioned medium preparation, FBS were ultracentrifuged at 100,000g for 16h for extracellular vesicles depletion (21) and used to prepare the medium as described

above.

Mouse embryos collection

Mice from both C57BL/6 and C57BL/6-Ola background were used for embryos collection. Briefly, 3.5-d.p.c pregnant mice were euthanized and the uterus removed. The uterine horns were flushed with HBSS into a Petri dish. The flushed embryos at late blastocyst stage were collected by using a mouth pipette and transferred to a paraformaldehyde (PFA) 4% solution for fixation. The current study was approved by the Ethical Committee for Animal Research of Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (protocol number 21/2013).

Isolation of EVs from mESCs medium

Conditioned medium was prepared as previously described (21). Briefly, E14.Tg2a cells, grown in 100mm culture dishes, were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and cultured in 15% exosome-depleted serum containing medium for 48 h. The supernatant was collected on ice and pre-cleared by centrifugation (300g for 10 min, 2,000g for 10 min, and 10,000g for 30 min). Purification of EVs was done by ultracentrifugation at 100,000g for 70 min in an SW40Ti rotor (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA). The pellet from ultracentrifugation was resuspended in PFA 4% for electron microscopy processing, in RIPA buffer for immunoblotting analysis.

Immunoblotting analysis

E14.Tg2a cells lysate were performed using RIPA buffer (50mM Tris HCl pH7.5; 150mM NaCl;

2mM EDTA; 0.5% Triton; 0.5% Sodium Deoxycholate) plus a protease inhibitor cocktail. The same buffer was used to resuspend EVs pellet, but it was not submitted to protein quantification. Protein extract was quantified by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard curve. Protein extract (4, 20 and 25µg) in sample buffer were separated by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel at a constant voltage of 120 V and transferred onto a nitrocellulose membrane in a semi-dry system (Trans-Blot Turbo System, Bio-Rad) for 7 min at constant amperage of 1.3 mA. For membrane blocking, 5% non-fat milk and 0.1% Tween 20 in TBS was added for 1h under agitation at room temperature. The membranes were then incubated with primary antibodies anti-flotilin (1:500; Abcam), mouse anti-HSP90 (1:1,000; Cell Signaling), rabbit anti-Alix, anti-Tsg101 or rabbit anti-STI1 (1:8,000) (22) overnight at 4°C. Membranes were then washed and probed with the respective peroxidase-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, Life Technologies), for 1h under agitation at room temperature. Reactions were developed using ECL (GE Life Sciences, Uppsala, Sweden), and membranes were exposed to Hyperfilm (GE).

Immunofluorescence assay

For immunodetection of pluripotency and endosomal trafficking machinery markers, E14.Tg2a cells were grown in Ibidi-Treat µ-slide (Ibidi, Martinsried, Germany) for 48h. Cells or embryos were fixed with 4% paraformaldehyde/sucrose in PBS for 15 min, washed three times with PBS and then incubated for 1h in a blocking solution containing 5% BSA, 0.3% Triton-X 100 diluted in PBS. Samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies raised against mouse anti-Oct3/4 (1:100, Santa Cruz), rabbit anti-Nanog (1:500, Cell Signaling), mouse anti-LBPA (1:20, Echelon), mouse anti-Alix, rabbit anti-Rab5, rabbit anti-flotilin, rabbit anti-VPS36 (1:50, Abcam), rabbit anti-Rab27b (1:100, Sigma) or rabbit anti-VPS4 (1:100, Sigma). Samples were washed three times with PBS, followed by 1h incubation with anti-rabbit Alexa-Fluor 488 and anti-mouse Alexa-Fluor 546 (1:500, Molecular Probes). Counterstaining of cell nuclei was achieved with 0.1% of 49,6-diamidino-2 phenylindole (DAPI). After washing with PBS,

embryos were kept in PBS and the slides wells were covered with anti-fade solution (glycerol:PBS pH9, 9:1) and examined on an Axio Vert. A1 Carl Zeiss epifluorescence microscope (Zeiss, Aalen, Germany) or on a confocal microscope (Leica TCS SP2 from A. C. Camargo Cancer Center or Zeiss LSM 780-NLO Multiphoton from Center of Facilities and Support to Research (CEFAP, ICB-USP)). Images were analysed using LSM software (Zeiss) or ImageJ (NIH).

Transmission electron microscopy

E14.Tg2a cells were cultured in ACLAR[®] Film pre-treated with poli-L-lysine (50µg/mL) for 48h. Cells were fixed in a mix of 1:1 medium:2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2) for 15min at room temperature, and then only in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2) for 2h. Briefly, samples were then, post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and dehydrated in a graded series of ethanol at 4°C. Samples were embedded with ethanol/epon mixtures and polymerized in pure Epon at 60°C. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed in a Jeol 100 CX II transmission electron microscope from Electron Microscopy Center of Federal University of São Paulo (CEME, UNIFESP) or Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences of University of São Paulo (ICB-USP) or Department of Biomaterials and Oral Biology, School of Dentistry (USP).

EVs obtained from ultracentrifugation were deposited onto Formvar-carbon-coated electron microscopy grids, fixed with a mixture of 2% paraformaldehyde and 0.125% of glutaraldehyde. Samples were contrasted and embedded in a mixture of methylcellulose and uranyl acetate, and observed under a Jeol 100 CX II transmission electron microscope from CEME.

EVs size and quantification

Cells were culture for 48h with EVs-depleted medium, and conditioned media were centrifuged as previously mentioned before analysis. The particle number and size of EVs was counted by a Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) device (Nanosight LM20, coupled to a CCD camera and a laser emitting a 60-mW beam at 405- nm wavelength).

RNA detection and quality

RNA from mESCs and EVs was isolated using Trizol (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's protocol. Detection, quality and size of RNA were performed using capillary electrophoresis (Agilent RNA 6000 Nano Kit for mESCs RNA and EVs RNA and Agilent Small RNA Analysis Kit for EVs RNA) according to the manufacturer's protocol (Agilent 2100 Bioanalyzer[®], Agilent Technologies, Foster City, CA, USA).

RESULTS

Ultrastructural analysis of ESCs morphology

Since little is known about the ultrastructure of mESCs, we first assessed their main structural features in details by transmission electron microscopy (TEM). Consistent to that observed by light microscopy during the routinely maintenance of mESCs (Figure 1A), these cells grow in an adherent monolayer way forming isolated colonies (Figure 1B and C). This morphology was preserved due to the use of a specific membrane (ACLAR Film) for mESCs plating to EM processing. We noted in a same colony different stages of cell cycle. For instance, we observed some nuclei with highly condensed chromatin and other with evident euchromatin, heterochromatin and nucleolus (Figure 1B, C and D).

The mESCs present a large nucleus that occupies most part of the intracellular space with a scarce cytoplasm (Figure 1D). We also observed numerous mitochondria distributed in the cytoplasm (Figures

1B) and a well-preserved peripheral cytoskeleton architecture represented by actin-rich layer in cell cortex (Figure 1G).

Ultrastructural analysis of endocytic events in ESCs

We then focused on describing ultrastructure of endocytic pathways and intracellular vesicle trafficking. Golgi apparatus was clearly apparent near to the nucleus with their cisternae and vesicles distributed in their vicinity (Figure 1E) and near the rough endoplasmic reticulum (RER) (Figure 1F).

It was common to see clathrin-mediated endocytosis in the plasma membrane as well as clathrin-coated endocytic vesicles in the cytoplasm (Figure 1H and I). In some cells, but not all, we noted events related to release of vesicles from the plasma membrane (Figure 1J and K), which could be referred to as microvesicles. In some cases, we can even observed a small region of membrane disturbance near the EV, suggesting that it has just been budded from the membrane (Figure 1K). This phenomenon suggests a mechanism of microvesicles formation. Events that resemble vesicles uptake were also presented in these cells (Figure 1L) indicating that mESCs may use EVs as intercellular communication and as a way to sense their microenvironment.

Since the endosomal network is evident and active in these cells, we decided to verify the existence of MVBs, structures related to exosomes biogenesis. As shown in the panels of the figure 2 (A-D), many evidence of MVBs in mESCs were collected. MVBs are spherical and limited by a double membrane and contain ILVs generated by invagination and scission from the limiting membrane of the endosome. MVBs may fuse with lysosome to degradation or with plasma membrane releasing ILVs to the extracellular environment, where they are called exosomes. MVBs contain a variable number of ILVs and are surrounded by and connected with tubular compartments (Figure 2C, D and H). The tubular extension connects the MVBs to endosomal protein sorting compartments, as evidenced by the proximity to RER and polyribosomes (Figure 2B, D and H). It was also noted the presence of vesicles in their vicinity

(Figure 2C, D, E and H). In some cases, it was observed endosomal structures with heterogeneous content consisting of many ILVs with other lamellar and electron dense structures (Figure 2J, K, L). Indeed, during the early steps of the endocytic pathway, ILVs are characterized to be small and homogeneous in size, but intraluminal membranes become pleiomorphic in late endosomes. Inside them, ILVs can mix with onion-like lamellae in merged multivesicular-multilamellar regions or domains (23, 24). This explains the presence of some MVBs with a heterogeneous content, which actually illustrate the pleiomorphic nature of late endosomes.

Altogether, this detailed ultrastructural analysis of mESCs confirmed the presence of both exosomes and microvesicles biogenesis supporting a function of these EVs for ESC biology.

Evidence of EVs biogenesis machinery in mESC and mouse blastocyst

Since we evidenced ultrastructures characteristics of endocytic pathway by TEM, we decide to evaluate specific molecular markers for the biogenesis machinery in mESCs and mouse embryos by immunofluorescence. The generation of ILVs inside of MVBs involves the action of components of the *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) (25–27). Vacuolar protein sorting 36 (VPS36), a member of ESCRT-II complex, and Rab27b, a small GTPase that acts in the vesicle transport to the membrane (28, 29), presented a punctate distribution throughout the mESCs cytoplasm (Figure 3A and B, respectively). Vacuolar protein sorting 4 (VPS4), accessory protein of ESCRT machinery, showed a diffused distribution in the cytoplasm, although it was expected as punctate form (Figure 3C). The mESCs pluripotent status was confirmed by Oct4 and Nanog expression in the nucleus (Figure 3).

The unconventional lipid, lysobisphosphatidic acid (LBPA), abundant in ILVs of late endosomes but not found in early endosomes (30, 31), was observed in the perinuclear region of mESCs, having either positive or negative cells in the same colony (Figure 3D).

In order to confirm the pattern of distribution of endocytic markers presented in mESCs we used freshly collected mouse embryos at early developmental stage (E3.5). This stage corresponds to the late blastocyst which contains the trophectoderm and the ICM from where ESCs can be derived. VPS4 and Rab27b presented same pattern as seen in mESCs (Figure 4). In addition, Alix, an ESCRT accessory protein, flotilin protein involved in endosomal trafficking events and Rab5, a Rab GTPase associated with the sorting endosome and endosomal fusion events were also visualized in the embryos, not only in ICM but also in trophectoderm (Figure 4).

The expression of these components related to vesicle biogenesis and trafficking strengthen the importance to consider the dynamic of endosomal compartmentalization to the ESCs biology and to the early developmental events.

EVs profile released by mESCs

In order to characterize the EVs secreted by mESCs, we used the mESCs medium to isolate EVs through ultracentrifugation protocol based on Théry et al., 2006 (21). TEM used to verify the ultrastructure of EVs indicated spherical, membrane-surrounded vesicles and revealed a cup-shaped morphology as commonly described for exosomes (Figure 5A and B). To determine vesicle size variation, we used NTA (Nanosight). This analysis showed that the majority of EVs detected sizes between 50–150 nm in diameter (Figure 5C), indicating vesicles ranging for exosomes. Through immunoblotting analysis we confirmed the presence of protein generally found in EVs such as Alix, heat shock protein 90 (HSP90), flotilin and Tsg101 (Figure 5D). It was also confirmed that mESCs EVs carry the co-chaperone stress inducible protein 1 (STI1) (Figure 5D), as do other EVs from distinct cell types (32). Ponceau staining revealed differential protein content in nitrocellulose membrane-bound EVs protein extracts compared to mESCs extracts (Figure 5D). Besides detection of proteins and specific markers, small RNAs was also detected (Figure 5E). The RNA profile analysis revealed that total RNA from EVs does not contain

ribosomal RNA (rRNA) as noted by the absence of the apparent peaks 18S and 28S rRNA, clearly seen in mESCs total RNA. This assay showed that the majority of total EVs-derived RNA is concentrated below 1kb revealing an enrichment of small RNAs in mESCs derived EVs (Figure 5E).

DISCUSSION

Embryonic stem cells have been extensively applied as developmental model studies due to their particular features of pluripotency, self-renewal and limitless proliferation, which characterize them as highly plastic cells. Many efforts have been made to reveal the molecular mechanism of the pluripotency state of ESCs and cell fate commitment. How these cells sense and process the information from their microenvironment, how they communicate with neighborhood cells and in which moment and why they decide to commit to a specific phenotype and not to another one are still unanswered questions and under intense debate.

Regarding this scene, EVs have emerged as noticeable transfers of information between cells, due to their capacity to transport specific molecules of their origin cell in autocrine and/or paracrine ways. These molecules involve since proteins and bioactive lipids to small RNAs like microRNA, that upon target cell uptake may play a role in intracellular signaling such as mRNA silencing or signal networks (in)activation. In the context of stem cells (embryonic or adult) plasticity, EVs potentially supports a mechanism to regulate target cell phenotype, then cell fate choice and cell fate switching (33–36).

In this study, we provided a more detailed insight into the cellular and molecular characteristics of the mESCs focusing on endocytic pathways related to EVs biogenesis. Ultrastructural analysis of mESCs showed that these cells presented a high nuclei:cytoplasm ratio, with nuclei characterized by abundant euchromatin and sparse heterochromatic region. The colony of mESCs formed *in vitro* displayed some cells in mitosis showing the mESCs proliferative feature. Lipid droplets were rarely seen in the cytosol. The cytoplasm was characterized by the presence of high amount of mitochondria varying from small

rounded ones with few transverse cristae to more oval and pleiomorphic ones. The cells showed prominent RER with polyribosomes in the cytoplasm as well as smooth endoplasmic reticulum and Golgi complexes with secretory vesicles. These characteristics significantly illustrate the high capacity of protein synthesis and secretion and metabolic activity of mESCs.

The function of the endosomal trafficking system was evidenced by coated pits and vesicles indicating process of clathrin-mediated endocytosis, MVBs with a low or high quantity of ILVs resembling early, transient or late endosomes, MVBs with multilamellar and multivesicular content resembling late endosomes and MVBs with tubular extensions that connect them to endosomal protein sorting compartments (37, 38). In fact, the MVBs are also considered a source of ILVs that are released as exosomes upon fusion of MVBs with the plasma membrane. The presence of MVBs together with apparent budding vesicles shed from plasma membrane to the extracellular milieu strongly supports the feature of ESCs as potential source of exosomes and microvesicles.

Moreover, we also assessed the distribution of specific markers of exosome biogenesis pathway in mESCs. We observed that VPS36 and Rab27b appeared throughout the cytoplasm in a punctate form, VPS4 was diffuse and LBPA was highly expressed and aggregated in the perinuclear region in some cells and in others appeared smaller and spread in the cytoplasm. The expression of these molecules supports the presence of the machinery involved in the exosome biogenesis or at least in the endosomal transport machinery. Some of these molecules are members of the ESCRT system. ESCRT complexes are composed for four members (ESCRT-0, -I, -II and -III), and other accessory proteins (VPS4, VTA1, ALIX). Briefly, ESCRT-0 acts in the clustering of ubiquitinated cargo in the endosomal membrane. ESCRT-I (Tsg101, Vps28, Vps37, MVB12, and UBAP1) and ESCRT-II (VPS36, VPS22, VPS25) are responsible for membrane budding, and ESCRT-III (CHMP 1-7, IST1) cleaves the budded membrane by fission (25–27, 39, 40). LBPA is an unconventional phospholipid recently found to interact specifically with ALIX and thereby may play a direct role in the ESCRT-dependent ILVs formation within late endosomes (31, 41, 42). Although it has been described only in ILVs of late endosomes destined to

lysosomes (43), one study showed that LBPA can be present in exosomes as ALIX does (44). Nevertheless, we cannot state which destination the LBPA-positive ILVs of mESCs will take.

In the context of ESCs biology, much attention is given to transcriptional factor networks and epigenetic modulation; however, some findings have provided clues that components of the transport machinery can promote rapid spatial and temporal control over stem cell signaling networks. For instance, LIF, a factor routinely used as ESCs medium component, maintains the pluripotent state of ESCs by JAK/STAT pathway activation, which ends on STAT3 translocation to the nucleus (45–48). A recent work showed that the endosomal protein Asrij interacts with STAT3 to aid its activation and therefore controlling circuits that maintain stemness (49). Another example is related to Wnt signaling. The canonical Wnt pathway requires inhibition of GSK3 activity, and this contributes to pluripotent state of ESCs, justifying the use of GSK3 inhibitor for ESCs maintenance together with ERK inhibitor (“2i medium”) (50, 51). Because the way of GSK3 inhibition was incompletely understood, Taelman et al, evidenced that, indeed, Wnt signaling leads to the sequestration of GSK3 from the cytosol into MVBs, separating this enzyme from its cytosolic substrates (52).

After confirmed the existence of EVs machinery in mESCs, the structural analysis of EVs purified by ultracentrifugation revealed the double-membrane rounded shaped vesicles. NTA technology showed that the majority of EVs isolated by the ultracentrifugation protocol used in this study range from 50-150nm. Based on the size, these data suggest that the EVs are mostly exosomes, albeit microvesicles were also detected, which enable to state that it is an exosome-enriched heterogeneous population of mESCs EVs.

Some studies have demonstrated the capacity of ESCs-derived EVs to induce epigenetic reprogramming of target differentiated cells, such as adult hematopoietic stem/progenitor cells, murine embryonic fibroblasts, retinal progenitor Muller cells through proteins, mRNA and miRNA delivery (33, 53, 54). They proved that the horizontal transfer of protein/RNA-based information induces

morphological and transcriptomal changes towards a more de-differentiated and stemness phenotype. EVs also carry morphogens and other molecules important for embryonic development like Wnt, Hedgehog and the Notch-ligand Delta, which were also found in MVBs (34, 55–58). These molecules can regulate processes including body axis patterning, cell proliferation, cell polarity and migration, stem cell renewal, cell fate specification, among others during development (59–62).

Here, we showed that mESCs-derived EVs expressed flotilin, HSP90, Alix and Tsg101 as expected. STI1 was also present in mESCs EVs, corroborating previous works that demonstrated this co-chaperone in EVs from other cell types such as astrocytes (32). As a co-chaperone, STI1 regulates HSP90 and HSP70 activity, by binding to both in a complex responsible for the correct folding of target proteins (63–65). Like STI1, HSP70 and HSP90 are found in EVs, but it still unknown if they are complexed inside the EVs or if STI1 acts as a co-chaperone when released through EVs (66, 67). Many studies show that, when secreted, STI1 is able to bind prion protein (PrP^c) on cell surface and modulates mechanisms that controls neural plasticity during embryonic development and adulthood (68, 69). In neural stem cells, STI1 regulates the self-renewal and cell proliferation in a PrP^c dependent- manner (70). Remarkably, Hajj and co-workers showed that part of STI1 is carried in the outer leaflet of astrocytes-derived EVs and demonstrated that this condition potentiates STI1 effects upon PrP^c dependent activation of ERK in neurons (32). Furthermore, STI1 is related to ESCs pluripotency maintenance since it modulates different process like nuclear translocation of the transcriptional factor STAT3 as well as regulation of embryoid bodies formation from ESCs (71–73). Thereby, the confirmation of secreted STI1 by mESCs-derived EVs reinforces the importance of this protein in modulation of processes related to the embryonic development.

In summary, we have characterized elements that support the existence of vesicle biogenesis machinery in mESCs. We demonstrated since the presence of vesicles biogenesis structures and their molecular markers until the nature of isolated EVs. A schematic overview of ESCs-derived EVs as components of ESC microenvironment and their possible target cell effects is illustrated in Figure 6.

Hence, this study provided basis to speculate a highly active endosomal trafficking for signaling circuits in mESCs and pointed out mESCs as potential source of bioactive EVs.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr. Vilma R. Martins, Research Superintendent of International Research Center at A. C. Camargo Cancer Center and her group, specially, Marcos Vinicios Salles Dias and Fernanda Giudice for technical support in NanoSight equipment. We also are thankful to Camila Lopes Ramos from Sirio-Libanês Hospital Teaching and Research Institute for technical support in RNA assays. We also thank Mario Costa Cruz (CEFAP-USP, Confocal Microscopy technician); Gaspar Ferreira de Lima, Edson Rocha de Oliveira, Victor E. Arana-Chavez, Márcia Tanakai, André Aguilera and Rita S. (CEME) for technical assistance in electron microscopy.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processes numbers: No. 11/13906-2 and No. 2013/22078-1).

REFERENCES

1. Nichols J, Smith A (2011) The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* 138(1):3–8.
2. Nichols J, Smith A (2012) Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(8):a008128.
3. Li M, Belmonte JCI (2017) Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nat Rev Genet.* doi:10.1038/nrg.2016.156.
4. Quesenberry PJ, Aliotta JM (2008) The paradoxical dynamism of marrow stem cells: Considerations of stem cells, niches, and microvesicles. *Stem Cell Rev* 4(3):137–147.
5. Keung AJ, Kumar S, Schaffer D V (2010) Presentation counts: microenvironmental regulation of stem cells by biophysical and material cues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:533–556.

6. Camussi G, Deregibus MC, Cantaluppi V (2013) Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochem Soc Trans* 41(1):283–287.
7. Sthanam LK, et al. (2017) Biophysical regulation of mouse embryonic stem cell fate and genomic integrity by feeder derived matrices. *Biomaterials* 119:9–22.
8. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS (2013) Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 13(10–11):1554–1571.
9. Phinney DG, et al. (2015) Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun* 6:8472.
10. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM (2016) Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003.
11. Witwer KW, et al. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell vesicles* 2:1–25.
12. Nickel W (2005) Unconventional secretory routes: Direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6(8):607–614.
13. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19(2):43–51.
14. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73(10):1907–1920.
15. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200(4):373–383.
16. Kowal J, et al. (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8):E968-77.
17. Sorkin A, von Zastrow M (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(8):600–614.
18. Scita G, Di Fiore PP (2010) The endocytic matrix. *Nature* 463(7280):464–473.
19. Dobrowolski R, De Robertis EM (2011) Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(1):53–60.
20. Li L, et al. (2010) A unique interplay between Rap1 and E-cadherin in the endocytic pathway regulates self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28(2):247–57.
21. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3.22.
22. Zanata SM, et al. (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21(13):3307–3316.

23. Kobayashi T, et al. (2002) Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem* 277(35):32157–32164.
24. Bissig C, Gruenberg J (2013) Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(10):a016816.
25. Hurley JH, Hanson PI (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8):556–66.
26. Hanson PI, Cashikar A (2012) Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28(1):337–362.
27. Wollert T, Wunder C, Lippincott-schwartz J, Hurley JH, H J (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458(7235):172–7.
28. Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):513–25.
29. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M (2014) Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 28(1):3–13.
30. Kobayashi T, et al. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392(6672):193–197.
31. Bissig C, Gruenberg J (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol* 24(1):19–25.
32. Hajj GNM, et al. (2013) The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 70(17):3211–3227.
33. Ratajczak J, et al. (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20(5):847–856.
34. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E (2008) Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* 18(5):199–209.
35. Yuan A, et al. (2009) Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles. *PLoS One* 4(3):e4722.
36. Khan M, et al. (2015) Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circ Res* 117(1):52–64.
37. Murk JL, Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ (2002) The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin Cell Dev Biol* 13(4):303–311.
38. Von Bartheld CS, Altick AL (2011) Multivesicular bodies in neurons: Distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog Neurobiol* 93(3):313–340.

39. Roxrud I, Stenmark H, Malerød L (2010) ESCRT & Co. *Biol Cell* 102(5):293–318.
40. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT Pathway. *Dev Cell* 21(1):77–91.
41. Matsuo H, et al. (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303(5657):531–4.
42. Thomas Falguie`res, Pierre-Philippe Luyet, Christin Bissig CCS, Marie-Claire Velluz and JG (2008) In Vitro Budding of Intraluminal Vesicles into Late Endosomes Is Regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell* 19:4942–4955.
43. Denzer K, et al. (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165:1259–1265.
44. Wubbolts R, et al. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278(13):10963–10972.
45. Nichols J, Smith A (2012) Pluripotency in the embryo and in culture [review]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(8):1–14.
46. Williams RL, et al. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336(6200):684–687.
47. Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE (1999) Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):2846–51.
48. Xu H, Ang Y-S, Sevilla A, Lemischka IR, Ma'ayan A (2014) Construction and validation of a regulatory network for pluripotency and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *PLoS Comput Biol* 10(8):e1003777.
49. Sinha A, Khadilkar RJ, Vinay KS, Sinha AR, Inamdar MS (2013) Conserved regulation of the JAK/STAT pathway by the endosomal protein asrij maintains stem cell potency. *Cell Rep* 4(4):649–658.
50. Ying Q-L, et al. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453(May):519–23.
51. Dunn S-J, Martello G, Yordanov B, Emmott S, Smith a G (2014) Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* 344(6188):1156–60.
52. Taelman VF, et al. (2010) Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143(7):1136–1148.
53. Yuan A, et al. (2009) Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* 4(3). doi:10.1371/journal.pone.0004722.
54. Katsman D, Stackpole EJ, Domin DR, Farber DB (2012) Embryonic stem cell-derived microvesicles induce gene expression changes in Müller cells of the retina. *PLoS One*

7(11):e50417.

55. Dudu V, Pantazis P, González-Gaitán M (2004) Membrane traffic during embryonic development: Epithelial formation, cell fate decisions and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 16(4):407–414.
56. Matussek T, et al. (2014) The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature* 516(7529):99–103.
57. Zhang L, Wrana JL (2014) The emerging role of exosomes in Wnt secretion and transport. *Curr Opin Genet Dev* 27:14–19.
58. Parchure A, Vyas N, Ferguson C, Parton RG, Mayor S (2015) Oligomerization and endocytosis of Hedgehog is necessary for its efficient exovesicular secretion. *Mol Biol Cell* 26(25):4700–4717.
59. Rogers KW, Schier AF (2011) Morphogen Gradients: From Generation to Interpretation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27(1):377–407.
60. Wilcockson SG, Sutcliffe C, Ashe HL (2016) Control of signaling molecule range during developmental patterning. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-016-2433-5.
61. Desrochers LM, Bordeleau F, Reinhart-King CA, Cerione RA, Antonyak MA (2016) Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nat Commun* 7:11958.
62. McGough IJ, Vincent J-P (2016) Exosomes in developmental signalling. *Development* 143(14):2482–2493.
63. Lässle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR (1997) Stress-inducible, murine protein mSTI1: Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272(3):1876–1884.
64. Lee C-T, Graf C, Mayer FJ, Richter SM, Mayer MP (2012) Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. *EMBO J* 31(6):1518–1528.
65. Schmid AB, et al. (2012) The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. *EMBO J* 31(6):1506–17.
66. Lancaster GI, Febbraio MA (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: A novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 280(24):23349–23355.
67. McCready J, et al. (2010) Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10(1):294.
68. Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, DeArmond SJ (2007) Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res* 1139(1):60–67.
69. Benvegnù S, Poggiolini I, Legname G (2010) Neurodevelopmental expression and localization of the cellular prion protein in the central nervous system of the mouse. *J Comp Neurol* 518(11):1879–1891.

70. Santos TG, et al. (2011) Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells* 29(7):1126–36.
71. Longshaw VM, Baxter M, Prewitz M, Blatch GL (2009) Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. *Eur J Cell Biol* 88(3):153–166.
72. Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL (2009) Chaperoning stem cells: A role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? *BioEssays* 31(4):370–377.
73. Setati MM, et al. (2010) Leukemia inhibitory factor promotes Hsp90 association with STAT3 in mouse embryonic stem cells. *IUBMB Life* 62(1):61–66.

LEGENDS

FIGURE 1: Ultrastructural analysis of mouse embryonic stem cells (mESCs). A-D: Overview of mESCs characteristics. **A:** Light microscopy image from a routinely mESCs culture showing the isolated colonies formed after 48h. **B and C:** Overview of a mESCs group near the colony border (asterisc). Note mitochondria (arrow in B) and mitotic events in some cells (arrow in C). **D:** Zoom in for a ESC of a colony. Note the high nucleus:cytoplasm ratio (N=nucleolus, H=heterochromatin, E=euchromatin). **E:** Golgi apparatus with organized cisternae and transport vesicles (arrow head). **F:** Vesicles (arrow head) near rough endoplasmic reticulum (RER) (arrow). **G:** Preserved cytoskeleton architecture in membrane vicinity (arrow indicates actin-rich layer). **H-L:** Endocytosis and/or exocytosis events. **H:** Coated pits indicating clathrin-mediated endocytosis (arrow). Note mitochondria with round and oval shape (asterisc). **I:** Coated vesicles in the cytoplasm (arrow). **J and K:** Shedding vesicles from the plasma membrane. **J:** Budding of vesicles (arrow). Note the RER (arrow head) and a lipid droplet (asterisc). **K:** Moment of vesicle release. Note the membrane integrity deformation (arrow), possibly due to microvesicle budding. **L:** Uptake or release of vesicles. Scale bars: A: 50 μ m; B, D, E, J: 2 μ m; C: 5 μ m; F, G, I: 0,5 μ m; H: 0,2 μ m; K, L: 100nm.

FIGURE 2: Ultrastructural evidence of multivesicular bodies (MVBs) and late endosomes. **A:** Double membrane MVB (arrow) with two cup-shaped double membrane intraluminal vesicles (ILVs). **B:** MVB near the plasma membrane (black arrow). Polyribosomes indicated by white arrow. **C:** MVB (arrow) with tubular extension (arrow head). **D:** Two MBVs (arrows) with high amount of ILVs. Note the tubular extension of the MVB on the top (arrow head). White arrow: Polyribosomes. **E, G and H:** MVB (black arrow) with surrounding vesicles. **F:** MVB (arrow) with few ILVs. **I-L:** MVB (arrow) with high quantity of ILVs and more pleiomorphic shape. **K-L:** Lamellar structures (arrow head in L) and heterogeneous content in MVBs characterize late endosomes. Scale bars: A, B, D: 500nm; C, E, H-L: 200nm; F,G: 2 μ m.

FIGURE 3: Machinery of extracellular vesicles (EVs) biogenesis of mouse embryonic stem cells (mESCs). **A:** mESCs were immunostained with anti-vacuolar protein sorting 36 (VPS36), member of ESCRT-II; **B:** anti-Rab27b, a Rab GTPase that regulates vesicles exocytosis; **C:** anti-vacuolar protein sorting 4 (VPS4), an AAA ATPase that participates of the ESCRT machinery and **D:** anti-lysobisphosphatidic acid (LBPA), considered a marker of intraluminal vesicles. Nanog and Oct4 were used as marker of pluripotent state of mESCs. Bars: 10 μ m.

FIGURE 4: Extracellular vesicles (EVs) biogenesis markers in mouse embryos. Embryos in blastocyst stage from both C57BL/6 or C57BL/6-Ola background were immunostained with anti-Alix, an ESCRT accessory protein; anti-flotilin, protein involved in endosomal trafficking events; anti-vacuolar protein sorting 4 (VPS4), an AAA ATPase that participates of the ESCRT machinery; anti-Rab5, a Rab GTPase associated with the sorting endosome and endosomal fusion events; anti-Rab27b, a Rab GTPase that regulates vesicles exocytosis. Nanog and Oct4 were used as marker of pluripotent state. Bars: 10 μ m.

FIGURE 5: Characterization of mESCs-derived extracellular vesicles isolated by ultracentrifugation. **A-B:** Ultrastructural morphology showing round double-membrane cup-shaped vesicles. **C:** Size and quantification of EVs by NTA technique showing high amount of EVs with diameter ranging from 50 to 150nm. Bars indicate mean \pm SEM for two independent experiments. **D:** Immunoblotting detection of Alix, heat shock protein 90 (HSP90), stress-inducible protein 1 (STI1), flotilin and Tsg101 in both cell extract (mESCs) and EVs extract (EVs). Profile of the total protein extracts of mESCs and EVs visualized by the Ponceau staining of the membrane. **E:** Bioanalyzer data of total RNA isolated from mESCs and EVs showing the size distribution of RNA. The two main peaks in mESCs RNA correspond to 18S (1900nt) and 28S (4700nt) ribosomal RNA, respectively. EVs-derived RNA is more enriched in small RNA (peak from 30 to 250nt) and peaks of rRNA are not evident in EVs total RNA. FU: fluorescence units. nt: nucleotides.

FIGURE 6: Extracellular vesicles (EVs) as potential modulators of stem cell niche. EVs include microvesicles (in purple) shed from the cell membrane (1), as well as exosomes (in blue) found inside multivesicular bodies (MVBs) formed through endocytic pathway (2). MVBs fuse with membrane and release the exosomes (3) or can be directed to degradation through lysosomes. In the microenvironment, EVs can achieve a target cell and delivery their content through plasma membrane fusion (4) or be internalized and fuse with the delimiting membrane of an endocytic compartment (5). The release of their content inside the recipient cell may modulate effects upon stemness status (6). N: nucleus, Lys: lysosome.

Figure 1

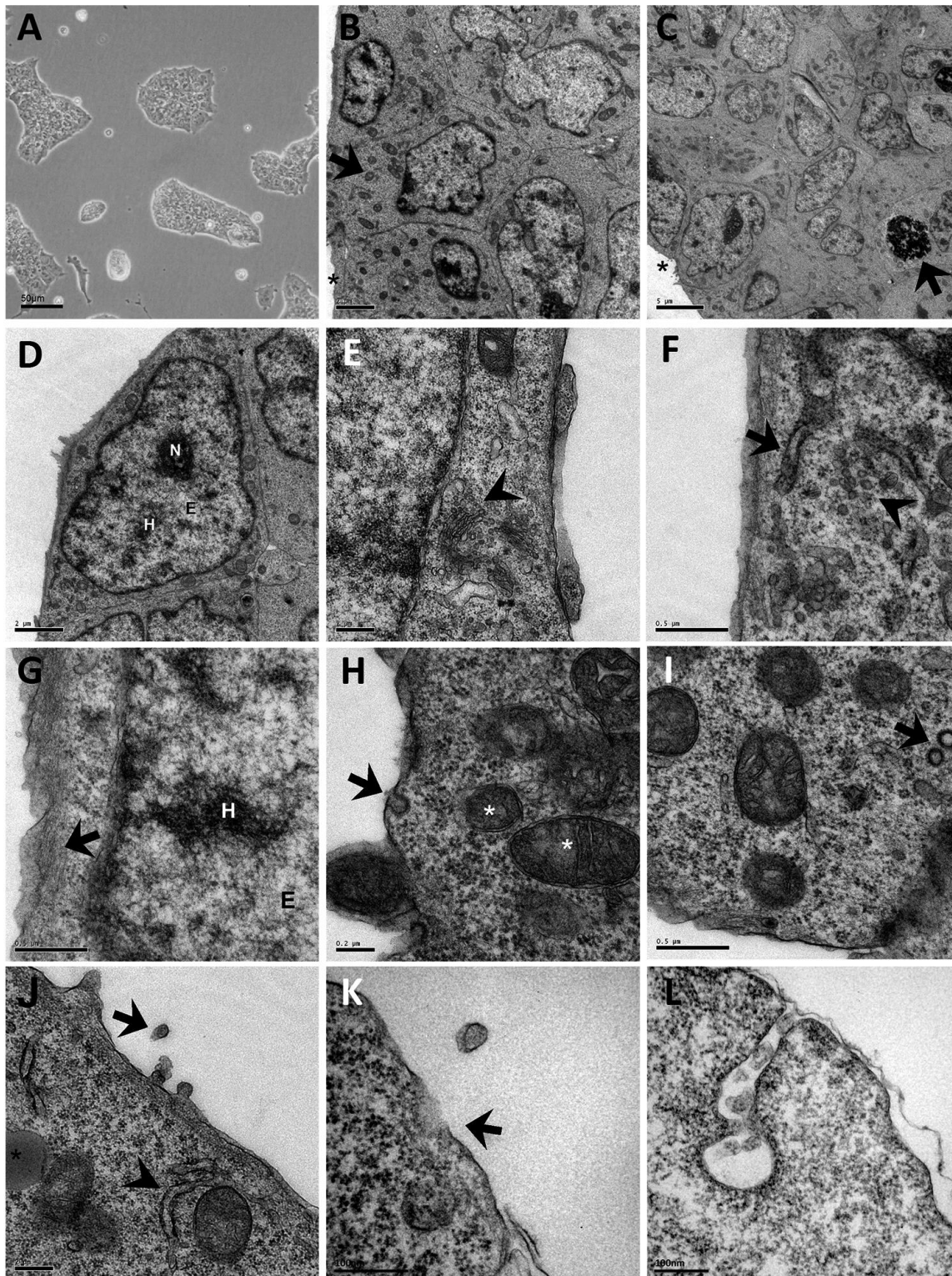


Figure 2

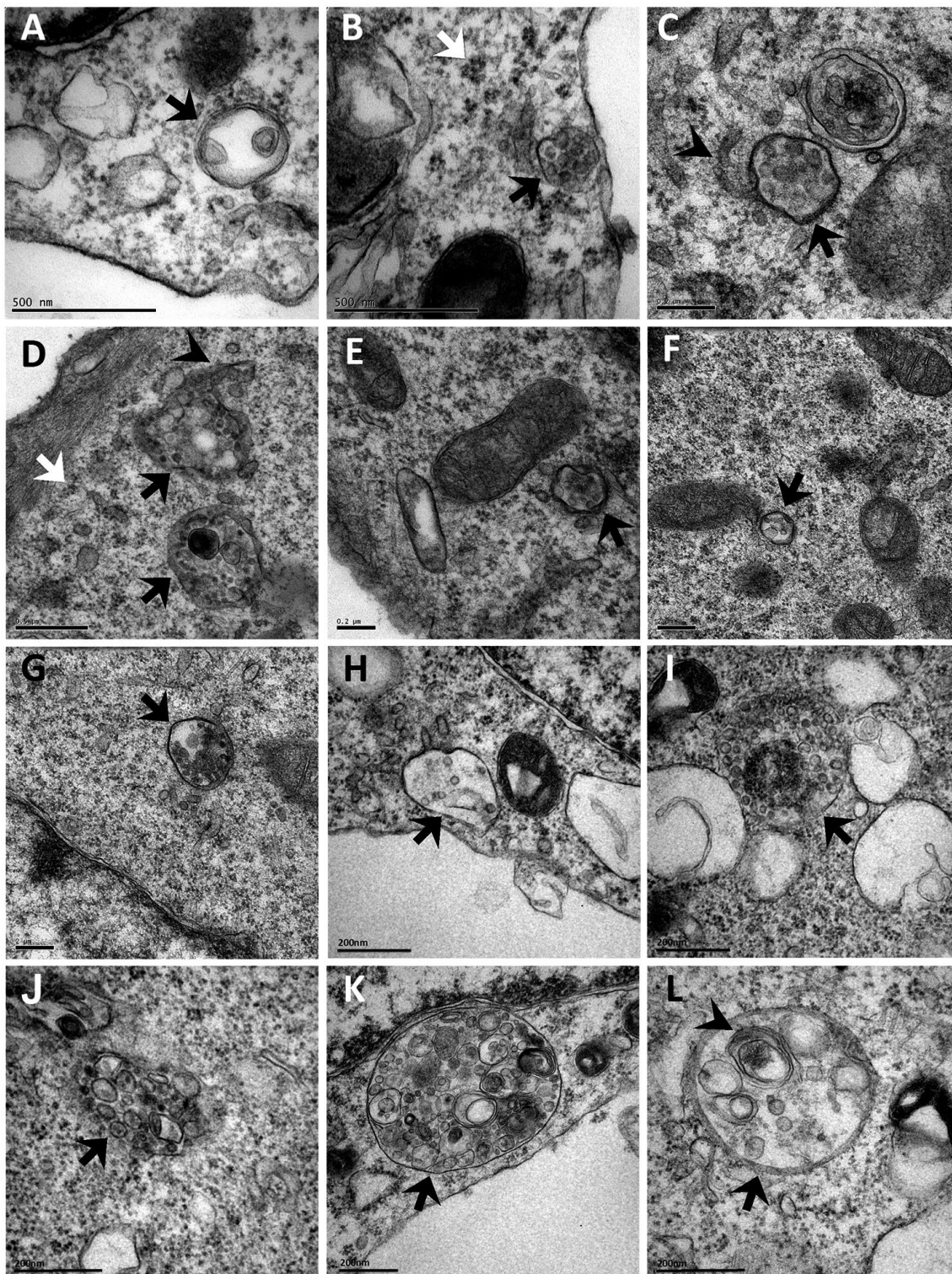


Figure 3

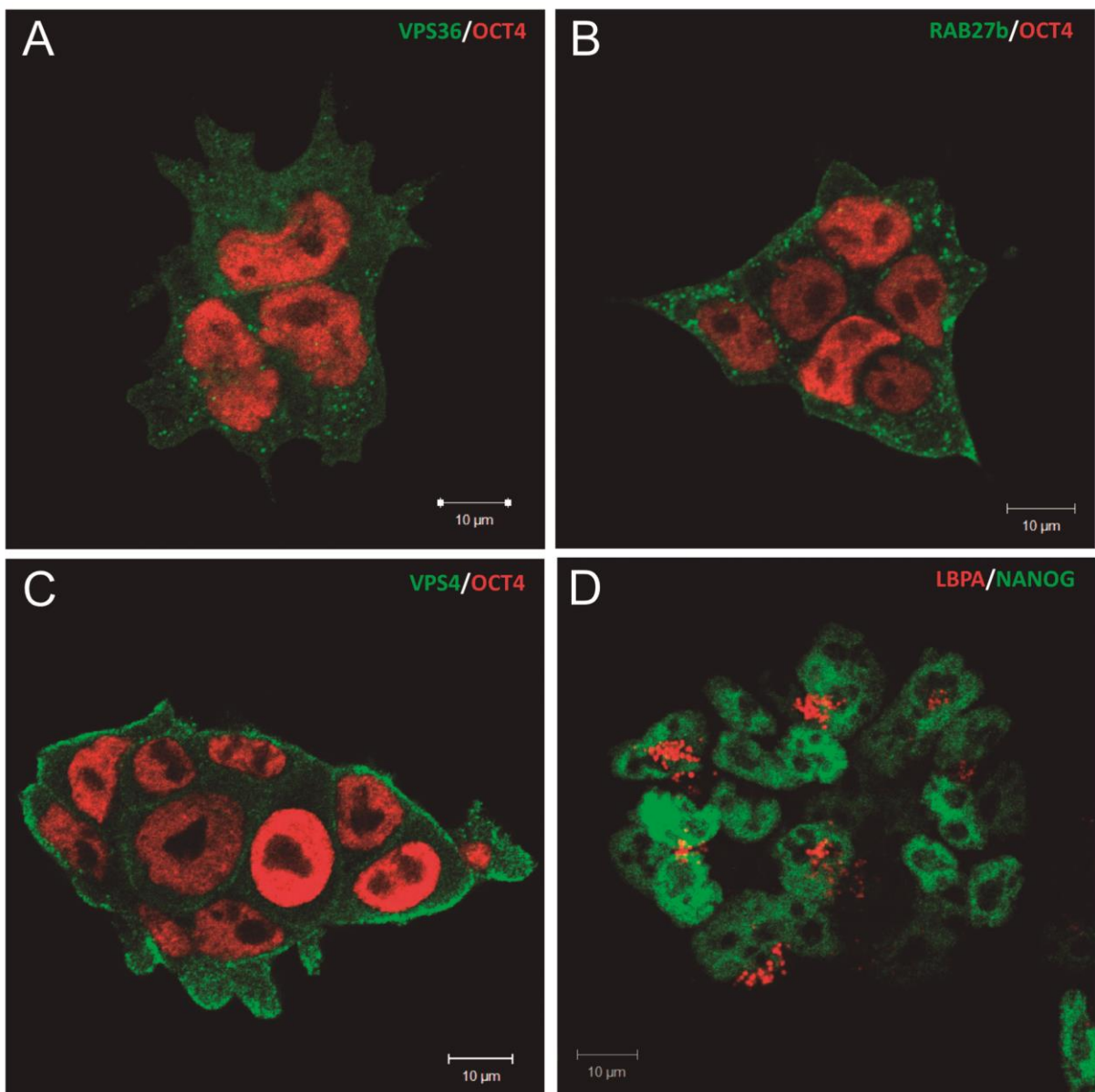


Figure 4

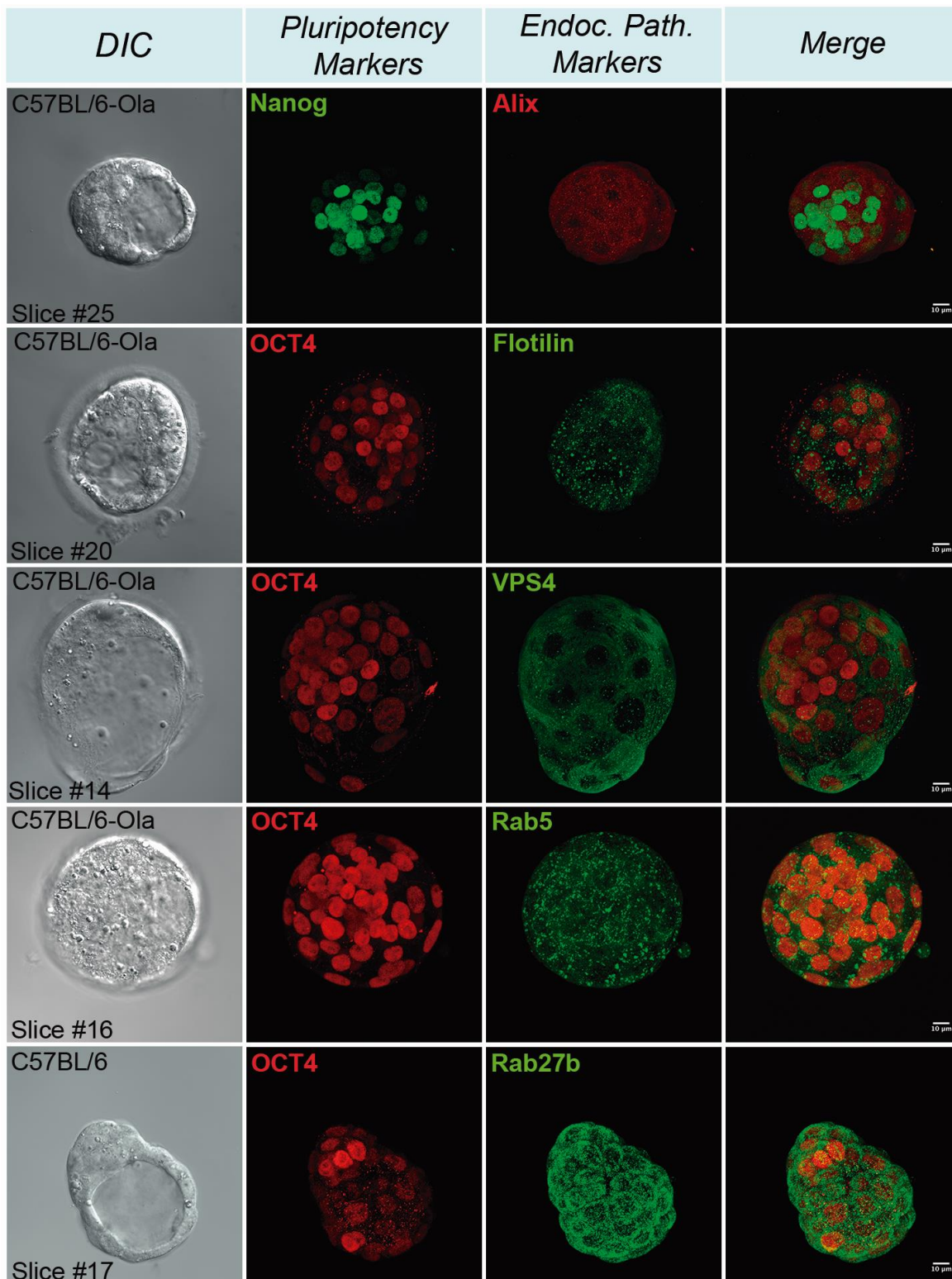


Figure 5

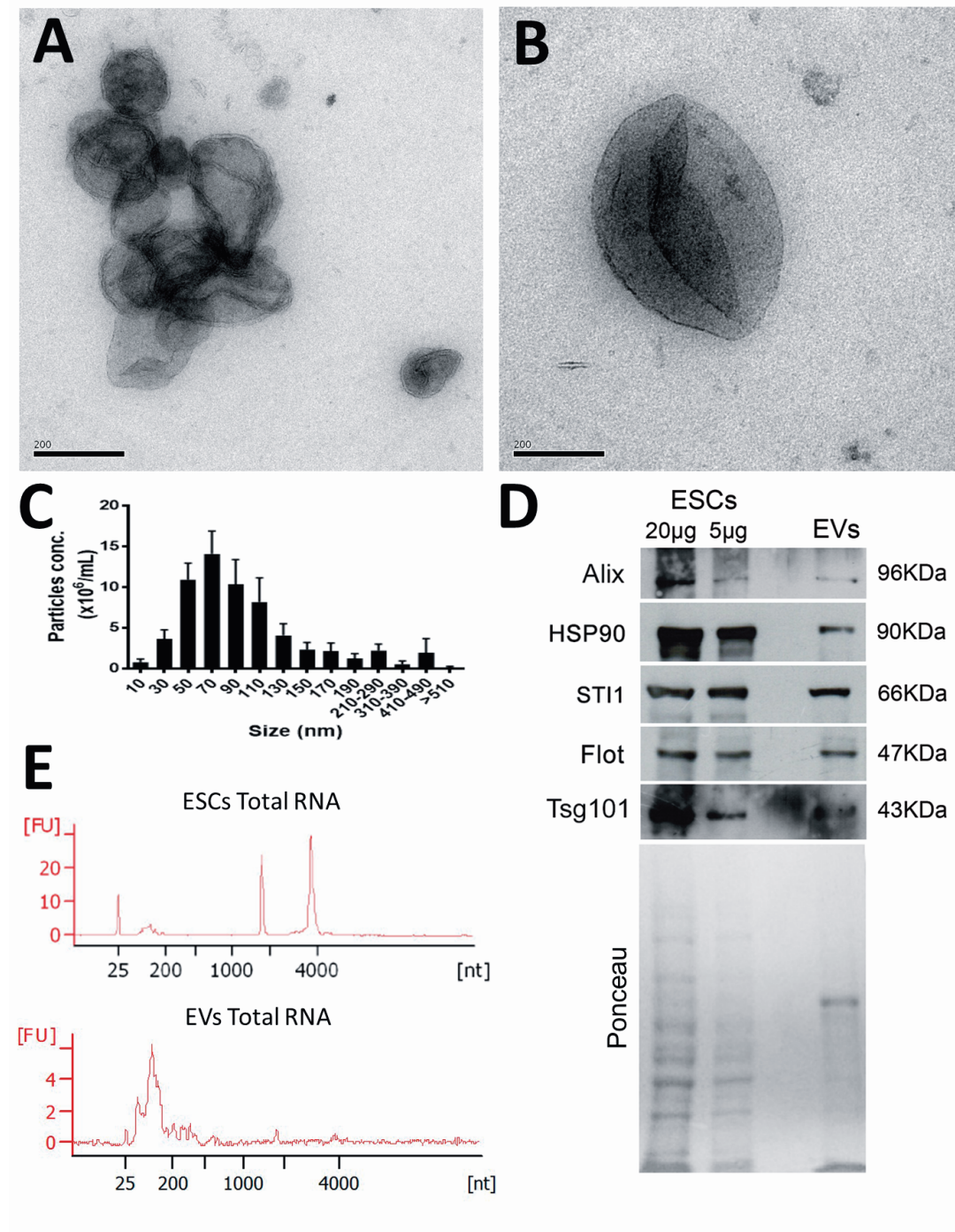
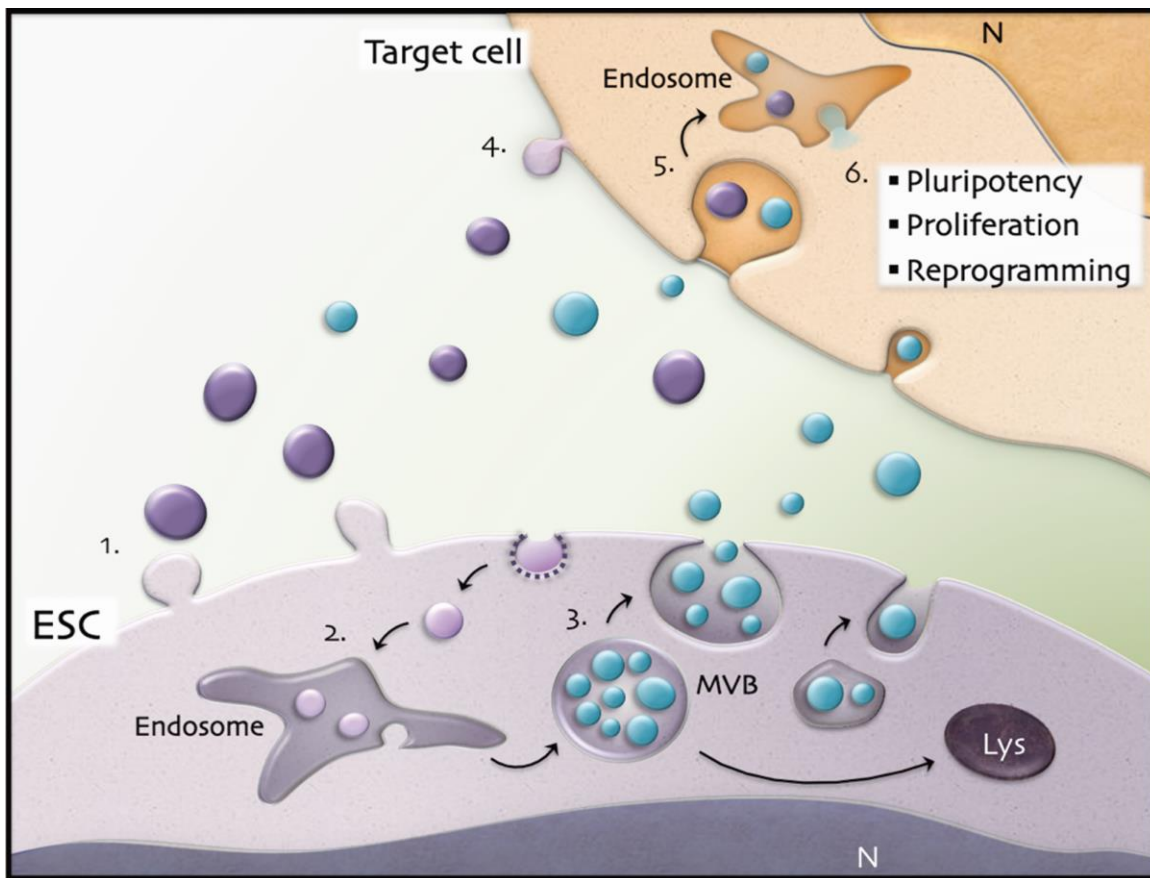


Figure 6



ANEXO B – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

*Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net
Young Perspectives for Old Diseases, 2014, 000-000* 1

CHAPTER 15

Stem Cell Applications for Neurodegenerative Diseases

Marilene Hohmuth Lopes^{*} and Lilian Cruz

Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil

Abstract: Notwithstanding the past decades of research, efficient treatments for neurodegenerative diseases do not exist. However, stem cell therapies have become increasingly attractive options for a broad spectrum of human neurodegenerative diseases. Diverse classes of stem cells, such as embryonic stem cells (ESCs), neural stem cells (NSCs), mesenchymal stem cells (MSCs) and induced pluripotent stem cells (iPS) can be useful as a source material for understanding the basic biology of cellular differentiation, disease modeling, and provide novel sources for autologous cellular therapies in neurodegenerative diseases. Indeed, the transplantation of stem cells or their derivatives and the mobilization of endogenous stem cells have been proposed in animal models of neurodegenerative disease as therapeutic mechanisms to restore function. In this chapter, we discuss some general issues relating to the scientific basis of stem cell– based therapies and their prospects in neurological disorders including Parkinson’s disease, Alzheimer’s disease, Huntington’s disease and Amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords: Alzheimer’s disease, Amyotrophic lateral sclerosis, embryonic stem cells, Huntington’s Disease, induced pluripotent stem cells (iPS), mesenchymal stem cells (MSC), neural stem cells (NPC), neurotrophic factors, Parkinson’s Disease, neural progenitor cells, stem cells, treatment, cell therapy.

15.1. INTRODUCTION

Despite decades of research, effective treatments for neurodegenerative diseases do not exist. However, cellular therapies present themselves as new attractive options and the application of stem cell research for a broad spectrum of human neurodegenerative diseases is rapidly growing.

As the functional units for growth and regeneration in many, though not all tissues, stem cells hold a position of significant importance for maintaining proper

***Address correspondence to Marilene Hohmuth Lopes:** Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, room 428. Zipcode: 05508-900 Sao Paulo- Brazil; Tel: 55 11 3091 0921 (off) 11 3091 7778 (Lab); E-mails: marilenehl@usp.br; marilenehlopes@gmail.com.

Glaucia Hajj (Ed)

All rights reserved-© 2014 Bentham Science Publishers

tissue function. Stem cells are defined as undifferentiated cells with prolonged self-renewal capacity, and depending on their origin, are able to differentiate into multiple cellular lineages or all cell types of the body [1]. Mammalian stem cells can be classified according to cell types that they can generate, and by the strategy use for their derivation. Stem cell classes comprise of embryonic stem cells (ESCs), neural stem cells (NSCs), mesenchymal stem cells (MSCs) and induced pluripotent stem cells (iPS) [2, 3].

These diverse classes of stem cells can be a useful source material for understanding the basic biology of cellular differentiation, disease modeling, and provide novel sources for autologous cellular therapies in neurodegenerative diseases.

ESCs are derived from the inner cell mass of a developing blastocyst (early embryo) and can be experimentally isolated from mouse, monkey and human. These cells may be expanded in culture while retaining pluripotency and possess the capacity to give rise to various organs and tissues [4, 5]. When moral and ethical reasons are taken into account, the use of human embryonic stem cells in disease therapy is not justified, since other alternatives for regenerative medicine are already available and will be discussed below.

NSCs can be isolated from the fetal, neonatal, and adult neural tissues and propagate in culture [6, 7]. NSCs are multipotent cells capable to differentiate into three major cell types of CNS, neurons, astrocytes and oligodendrocytes. In humans, neuronal precursor cells in the adult brain have been found at two major NSC niches: the dentate gyrus of the hippocampus and the subventricular zone of the olfactory bulb, although a very small number of stem cells might also exist in other brain regions [8]. The proliferation and differentiation of NSCs are precisely regulated by a complex system composed of a large number of morphogens, growth factors, surrounding cells, transcription factors, among others. Neurons derived from these cells contribute to learning, memory, and the autonomous repair of the brain under pathological conditions (for review see [1]). Indeed, alterations in adult neurogenesis are frequently observed in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's diseases (AD), Parkinson's disease (PD), and Huntington's disease (HD) and the transplantation of neurons obtained from

NSCs cultured *in vitro* have been used for cellular replacement in neurological diseases to ameliorate neurodegeneration [1].

MSCs, can easily be obtained from various tissues, such as bone marrow, adipose tissue, placenta and umbilical cord, cartilage, and expanded vigorously until the tissues differentiate into specific cell lineages [9-19]. Transplantation of MSCs into the injured brain may provide therapeutic benefits. MSCs transplanted into the brain have been demonstrated to promote functional recovery by producing trophic factors that induce survival and regeneration of host neurons. MSCs are immunocompatible by nature and there are no ethical issues related to their use [20].

Recently, a new class of pluripotent stem cells, iPSCs (induced pluripotent stem cells), has been generated from adult somatic cells such as fibroblasts by introduction of embryogenesis-related transcription factors [21]. The original strategy utilized Oct 3/4, Klf, Sox2 and c-Myc [21], and various groups are now reprogramming adult somatic cells using several approaches to delivery embryonic transcription factors such as vector, virus, protein or RNA [22-24]. The iPSCs share many properties with human ESCs, such as morphology, the ability of indefinite growth and pluripotency, but they are not identical since they display differences in gene expression signatures [25]. iPSC cells now can be derived from a variety of cell lineages and are able to differentiate into certain cell types including neurons. Indeed, patient-specific iPSCs are already applied in disease modeling, drug testing and discovery and provide novel sources for autologous cellular therapies [26]. Hence, cellular reprogramming is the most promising approach due to the fact that it allows the generation of patient-specific stem cells, which in turn can be differentiated in neural lineages and open a vast new territory in looking for effective treatments for neurological diseases.

More recently, a study has shown that either human fibroblasts or iPS can efficiently be converted into functional induced neuronal cells (iN) through a forced expression of a combination of three neural lineage-specific transcription factors, *Ascl1*, *Brn2* and *Myt1l* [27]. Moreover, human fibroblast can be effectively reprogrammed into dopaminergic neuron-like cells by expression of five transcriptional factors *Mash1*, *Ng2*, *Sox2*, *Nurr1*, and *Pitx3* [28]. Concerning possible clinical applications, the major disadvantage of iNs is the

lack of expandability, generating a limited cell number. Indeed, several open questions have arisen with iNCs, but they represent great promises for both cell replacement and cell modeling of neurodegenerative diseases.

Indeed, the transplantation of stem cells or their derivatives and the mobilization of endogenous stem cells have been proposed in animal models of neurodegenerative disease as therapeutic mechanisms to restore function [29]. For instance, it might be possible to replace lost neurons or glial cells by transplantation of stem cell pre-differentiated *in vitro* to different stages of maturation. The stimulation of endogenous neural stem cells to form new neurons or glial cells in the adult CNS can represent an alternative for cell replacement. Additionally, a functional enhancement might be achieved with the release of neuroprotective molecules by grafted stem cells [30].

There is also evidence from clinical trials that cell replacement in human neurological diseases can lead to symptomatic relief [29].

Here, we discuss some general issues relating to the scientific basis of stem cell-based therapies and their prospects in PD, AD, HD and ALS disorders.

15.2. PARKINSON'S DISEASE

Parkinson's disease results from the extensive loss of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra [31, 32]. Current treatment options include therapies that propose to increase dopamine levels by providing a dopamine precursor L-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA), but long-term administration of L-DOPA has become increasingly ineffective with PD progression [33]. More recently, surgical deep brain stimulation has been adopted as a successful treatment for PD patients [34].

Contrarily, cellular approaches for PD focus on the cell replacement of lost DA neurons. Since the late 1980s, successful cellular therapies for PD have utilized human fetal ventral midbrain tissue as a source of DA neurons to transplant into the striatum of PD patients with advanced disease [35-38]. However, potential limitation of using fetal tissue for transplantation includes ethical concerns and religious questions, and the ability to obtain adequate amounts of fetal tissues for

treatment. In addition, reports have pointed out that the survival of transplanted fetal mesencephalic cells in the patients' brain was very low [39]. To circumvent these difficulties, ESCs, iPSCs, MSCs or NSCs have been utilized for large-scale generation of neurons with DA phenotype as a practical and effective alternative for transplantation.

Although there are also considerable safety concerns for ESCs related to their potential for tumor formation or neural overgrowth, previous studies have described that DA neurons derived from ESCs have shown efficacy in PD animal models. DA neurons were generated from mouse ESCs after treatment with specific mitogens and signaling molecules such as fibroblast growth factor 8 (FGF8) and sonic hedgehog, [40, 41], have shown electrophysiological and behavioral properties expected of neurons from the midbrain. Additionally, the modulation of Nurr1 [42, 43] or Bcl-XL [44] expression in murine ES cells or co-culture with a mouse bone marrow stromal cell line [45] induces midbrain dopaminergic neurons. In a very recent study, transgenic mouse ESCs line induced at the middle stage (Nurr1 positive cells) of DA differentiation was particularly suitable for grafting since it had the greatest amount of DA neuron survival and behavioral improvement in parkinsonian mice [46].

Interestingly, the striatum transplantation of DA neurons generated from monkey ES cells attenuated neurological symptoms in a primate model for PD [47]. DA neurons were also generated from undifferentiated human NSCs derived from fetal brain and induced behavioral improvement in parkinsonian monkeys [48]. Recently, studies have reported that functional human DA neurons can efficiently be engrafted in animal models of Parkinson's inducing clear behavior recovery [49-51].

Diverse evidence has shown that the transplantation of NSCs cultured *in vitro* into brain damage areas may be an ideal vehicle for cell replacement and production of neurotrophic factors to protect injured neurons and/or to stimulate neuronal growth in patients with neurological diseases [2, 52]. Distinct research groups have described that immortalized hNSC generated from fetal human brain cells infected with a retroviral vector encoding v-myc oncogene shows multipotent differentiation properties, due their capacity of neural differentiation *in vitro* and *in vivo* [52, 53]. Indeed, both immortalized human and mouse NSC lines, HB1.F3

and C17.2 respectively, transduced with tyrosine hydroxylase (TH) and GTP cyclohydrolase 1 (GTPCH1) genes, for production of L-DOPA, induced functional improvement in a rat model of PD following transplantation into the striatum [54-56].

Another approach based on the use of patient-specific DA neurons derived from iPS cells may provide an ideal cellular source for transplantation therapy for PD since it would eliminate ethical concerns associated with ES cells and their progeny and would avoid immune reactions. However, before application can be considered in patients, the production, growth and functionality of the DA neurons derived from iPS cells and also the potential risk of teratoma formation *in vivo* should be determined [57, 58].

A study has reported that DA neurons generated from iPS cells derived from fibroblasts functionally integrated in the host brain and were able to improve behavior in a rat model of Parkinson's disease upon transplantation into the adult brain [59]. Strikingly, a study that directly compared the differentiation and cellular properties of human iPSCs generated by different reprogramming methods, virus- and protein-based, showed that DA neurons derived from protein-based are functional, and when transplanted into striatum, significantly rescued motor deficits in a rodent PD model [60]. More recently, the combination of five transcriptional factors Mash1, Ngn2, Sox2, Nurr1, and Pitx3 can directly and effectively reprogram human fibroblasts into DA neuron-like cells. They also showed properties of DA uptake and production, exhibited DA neuron-specific electrophysiological profiles and provided symptomatic relief in a rat PD model [28].

Recent advances in deriving iPS cells from patients offer new possibilities for biomedical research and clinical applications for autologous transplantation. The generation of iPS cells from patients with PD has been described in three reports [61-63]. Patient-derived iPSCs from individuals with sporadic Parkinson's disease were differentiated into dopaminergic neurons but failed to show an obvious difference in phenotype compared to control cells [61]. Some evidence has shown that fibroblasts from genetic PD (mutations in the PINK1 gene) can be reprogrammed and differentiated into dopaminergic neurons, indicating that mutation did not affect the ability of patient fibroblasts to be induced into iPS

cells [62]. Thus, this approach could be used to investigate the function of endogenous mutations and for further studies of PD pathogenesis [62]. In another study, DA neurons generated from iPS cells from PD patients could be transplanted into the PD animal model and survive in high numbers, showing arborization and mediated functional effects in an animal model of PD [63].

Although studies maintain cellular replacement based on DA neurons derived from iPS cells [64] or DA neurons directly converted from fibroblasts [28] as a viable approach for treating PD, environmental enrichment may also support existing DA neurons to prevent further degeneration. Neurotrophic factor-based therapy through direct delivery or viral-based systems demonstrated the potential for excellent ameliorative properties in PD [65, 66]. Remarkably, transplantation of MSCs and NPCs, genetically modified to produce growth factors such as BDNF, VEGF, GDNF, and IGF-I, protect both dopamine neurons and striatal neurons undergoing degeneration in rodent models of Parkinson's [67-73]. Thus, both cellular replacement and environmental enrichment present important consequences to improve efficacy for PD therapy [3].

15.3. ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease (AD), the most frequent form of dementia, is characterized by degeneration and loss of neurons and synapses throughout the brain, memory loss and cognitive decline [74]. The brain pathology in AD is characterized by intracellular neurofibrillary tangles (composed by phosphorylated tau protein) and extracellular deposition of plaques composed of amyloid β ($A\beta$) peptides, which represents a proteolytic cleavage product of larger amyloid precursor protein (APP) [74-76].

Based on the amyloid cascade hypothesis various "anti-amyloid drugs" targeting different pathways of $A\beta$ production and/or aggregation have been developed and tested in clinical trials with AD patients. In general, these candidates have so far failed to produce the expected therapeutic breakthroughs. However, proteinases such as neprilysin, [77]; insulin degrading enzyme [78, 79]; cathepsin B [80] and plasmin [81] were successfully used as therapeutic agents to reduce $A\beta$ levels in the AD brain. Indeed, intracerebrally injected fibroblast

overexpressing human neprilysin revealed robust clearance of amyloid plaques at the site of engraftment in the brain of A β transgenic mice [82].

In this context, MSCs present a promising therapeutic vehicle to reduce A β deposits in AD patients. Intracerebral transplantation of BM-MSCs into double-transgenic mice (APP/PS1), a model of age-dependent AD, promoted microglial activation, rescued cognitive impairment, and reduced A β and tau pathology in the AD brain [83, 84]. Together, these results revealed that BM-MSCs, by unknown mechanism(s), are able to modulate microglial cells which in turn mediate A β reduction and rescue AD-like pathology [20]. Furthermore, *in vitro* co-culture of primary hippocampal neurons with MSCs from umbilical cord blood reduced the apoptosis induced by A β . Furthermore, in a mouse AD model, MSCs treatment causes restoration of learning/memory function [85].

Previous studies have described that nerve growth factor (NGF) is required to prevent the degeneration of cholinergic neurons and to enhance memory in AD-like animal models [86-89]. Indeed, a phase I clinical trial of *ex vivo* NGF gene delivery was performed in individuals with mild Alzheimer disease, implanting autologous fibroblasts genetically modified to express human NGF into the forebrain and the study analysis suggested improvement in the rate of cognitive decline [90]. In a chronic AD animal model, NSCs, stably transduced with hNGF, was engrafted into the cerebral cortex and presented a significant improvement in learning and memory function [91]. In other studies, the transplantation of mouse ESC-derived NPCs improves cognitive function in rat models of Alzheimer [92].

Therapeutic delivery of brain derived neurotrophic factor (BDNF) has also been explored as a promising candidate for Alzheimer's disease [93]. Aged transgenic mice that express pathogenic forms of amyloid precursor protein, presenilin, and tau presented an enhancement in cognitive function after brain transplantation with mouse NSCs expressing BDNF [94].

Remarkably, a range of recent studies have used NSCs as a valuable source of cells for cell replacement and gene transfer for AD therapy due to their migratory capacity after brain transplantation [95, 96]. In fact, iPS cells have not yet been used in AD therapy models. However, recently, primary fibroblasts from patients

with familial Alzheimer's disease have been reprogrammed and differentiated in functional neuronal cells, providing a human cell-based model of AD that would be crucial for drug discovery as well as for investigating mechanisms of the disease [97].

15.4. HUNTINGTON'S DISEASE

Huntington's disease is an autosomal dominant polyglutamine disorder characterized by the accumulation of the nucleotides CAG in the huntingtin gene. This disease causes cellular dysfunction and loss at numerous CNS sites including the striatum. HD manifests with involuntary motor activity, cognitive impairment and emotional disturbances. Despite the known genetic basis for HD, the mechanisms involved in the pathogenesis of HD remain essentially unknown and this impedes effective therapeutic interventions. A major motivation for research into the treatment of HD has centered on reparative strategies using cell replacement, manipulation of endogenous stem cells and/or neurogenesis, or trophic factor administration on the striatum [98].

A pioneer study of a human cellular therapy trial using fetal neural stem cells allografts showed motor and cognitive improvement in HD patients [99]. Earlier studies in HD animal models reported that fetal striatal grafts improve motor and cognitive dysfunction [100]. Interestingly, striatal grafts survived with apparent integration in the striatum of a transgenic mouse model of HD, which in turn presented modest behavioral effects after surgery [101]. The latter study is consistent with a clinical trial that demonstrates that grafts from human fetal striatal tissue in HD patients can survive and differentiate, and are unaffected by the disease process [102]. In addition, transplantation of striatal grafts of human fetal stem cells elicits behavioral and anatomical recovery in a rodent model of Huntington's disease [103]. Additionally, human ESC-derived neural precursors can lead to a behavioral recovery, as well as neuronal differentiation, in the pre-clinical model of HD [104].

Cell therapies in HD patients using human fetal-derived cells have shown clinical success. Nonetheless, a recent study has reported a graft overgrowth, composed by neurons and glia, in a HD patient who received fetal neural transplantation and

reminds researchers of the potential risk of mass lesion development with this procedure [105]. The use of fetal-derived striatal cells for transplantation into the degenerative adult brain are safe and partially effective in terms of functional response, although ethical and practical considerations in terms of cell source of human fetus-derived allografts should be regarded. Thus, alternative strategies for cell therapy using NSCs in HD have been initiated [106] in animal models of HD, although still only a few studies have demonstrated a functional outcome.

The implantation of NSCs into rat striatum of an HD rat model of prior to lesion formation demonstrated significantly improved motor performance and increased resistance to striatal neuron damage compared with control [107]. This data indicate that early intervention using cell transplantation could be effective in pre-clinical HD patients carrying the mutant HD gene. Thus, functional improvements confirmed by isolated cell types provide similar functional benefits to those observed with fetal tissue, although mechanisms of cellular therapy protection were not examined.

In another study, the transplantation of autologous bone marrow stem cells in the damaged striatum of a rat HD model significantly reduced working memory deficits [108], suggesting that growth factors could be released by transplants and allowing cell surviving. To address the role of environmental enrichment in cellular therapy for HD, NSCs/NPCs and MSCs have been genetically modified to overexpress and release neuroprotective trophic factors such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and glia cell-derived neurotrophic factor (GDNF) [109].

In an earlier transplantation study, genetically modified NSCs producing NGF or BDNF showed a protective effect of the neostriatum against excitotoxic damage [110]. NPCs expressing GDNF, transplanted into HD rodents, protect neurons and promoted functional recovery [67, 111]. In a recent study and according with NPSc data, MSCs overexpressed BDNF had also significant ameliorative effects on disease progression in a HD mouse model [112]. Collectively, the use of stem cells engineered to overexpress a range of neurotrophic factors in transplantation studies in HD models confers benefits reducing disease progression.

Although recent evidence has demonstrated improvements in motor and cognitive functions observed in HD animal models following stem cell transplantation, further studies are now required to address relevant questions regarding the availability and safety of stem cells for clinical trials.

15.5. AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), is a relentlessly neurodegenerative disorder characterized by degeneration and loss of motor neurons in the cerebral cortex, brain stem and spinal cord, leading to loss coordination and muscle strength. Multiple pathogenetic mechanisms are likely involved in ALS, which makes the development of conventional drug therapies difficult [113]. To date there is no effective treatment for ALS patients and stem cells represent a new therapeutic approach offering both cellular replacement and trophic support on motor neuron survival and function.

NPCs are normally produced in the CNS in response to the loss of motor neuron in ALS [114], but to date, endogenous NPC populations have proven insufficient to reverse the disease condition in ALS [114]. However, several studies have tested the capacity of exogenous stem cells transplanted into the lumbar spinal cord to rescue ALS animal models. There is increasing evidence that it is possible to generate functional motor neurons in culture from stem cells (ESCs and NPCs) able to populate the embryonic spinal cord, extend axons, and form synapses with target muscles [27, 115, 116]. The incorporation of NSCs, isolated from SVZ of the adult mice and differentiated into cholinergic neurons, into animal ALS spinal cords delayed onset of the disease [117, 118]. Human embryonic germ cells transplanted into the cerebrospinal fluid of rats with motor neuron injury migrated into the spinal cord restoring neurologic function *via* enhancement of host neuron survival and function [119]. NSCs grafts isolated from human fetal spinal cord were also effective in delaying the onset and disease progression in a mouse ALS model since these cells integrate into the diseased spinal cord and establish synaptic connections with host neurons, one of the most fundamental requirements for motor neuron replacement [120]. Recent evidence showed human spinal cord NSCs derived human fetus were transplanted into the spinal cord of rats in an ALS model, and the neurological function of NSC-transplanted

animals was well preserved, but disease onset was not different from the untreated controls and the overall animal survival was also not affected [121]. Interestingly, results of an ongoing phase I trial of intraspinal injections of fetal-derived neural stem cells in ALS-patients show that the treatment has no surgical complications and patients' clinical status was stable after transplantation with no evidence of disease progression [122]. A previous study described that iPSCs isolated from an ALS patient [123] that possess properties of embryonic stem cells, which were successfully directed to differentiate into motor neurons, could be an ideal cellular source for screening new drug candidates [123]. The potential of growth factors to mediate neuroprotection on motor neurons in ALS models have been investigated and three methods for growth factor delivery have been used: direct application, viral delivery and stem cell-based delivery. Several studies report stem cell production of growth factors including GDNF, BDNF, IGF, and VEGF [117, 120, 124]. These studies demonstrate that NPCs secreting growth factors integrate normally into the spinal cord, survive, differentiate and provide long-term production of growth factors, which support neuroprotection for existing neurons.

Several groups have demonstrated that intraparenchymal delivery of hMSCs is safe and can delay loss of motor neurons in ALS mouse model [125, 126]. hNPCs, modified to secrete GDNF, survived and improved maintenance of lumbar spinal cord neurons of ALS rodents model [127, 128].

A human cellular therapy trial has already demonstrated progress in ALS treatment by intraspinal cord injection of MSCs. Autologous transplantation of bone marrow-derived MSCs into the thoracic spinal cord showed no significant acute or late side effects and four of the patients showed significant slowing of the linear decline of forced vital capacity [129]. In fact, the development of new stem cell lines is required in attempt to expand our understanding about the potential use of stem cells in ALS.

15.6. CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVE

The development of cell-based therapies for neurodegenerative diseases that currently lack effective treatment is still at an early stage. However, as we have shown in this chapter, considerable progress has been made in this direction and a

continuous improvement in developing approaches to generate distinct type of neurons from human stem cells, for cell replacement therapy in neurodegenerative disorders, is needed. Strategies used to develop stem-cell based therapies for neurodegenerative diseases discussed in this chapter are illustrated in Fig. 1. Herein, we have shown that findings generated in the laboratory are now slowly being translated into timid clinical trials that have aimed either at cell replacement or at neural tissue delivery of therapeutic molecules using stem cells as a carrier. Still, many basic issues remain to be solved and mechanisms which regulate the proliferation, migration, differentiation survival and function of stem cells and their derivatives need to be elucidated. Despite the many challenges for cell therapy lying ahead, we are still optimistic that stem cells have great potential to cure human neurological diseases.

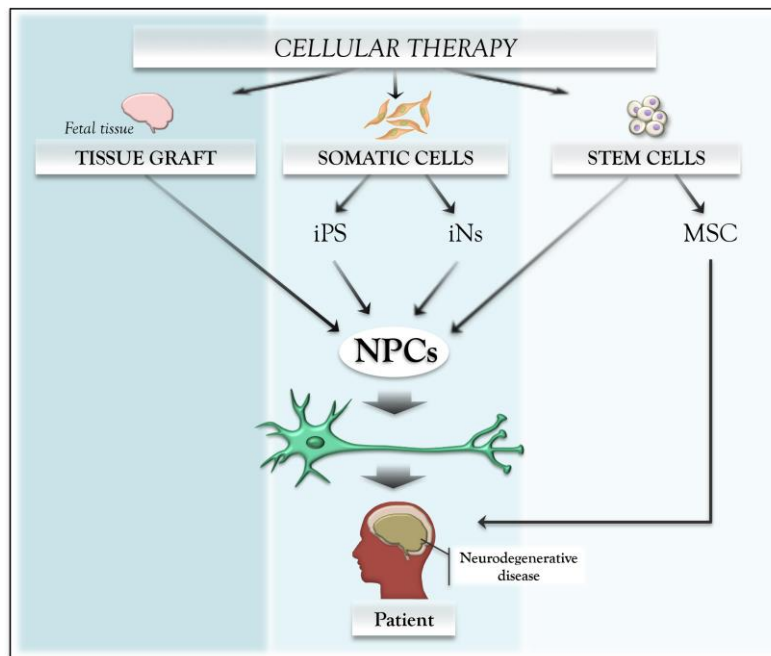


Figure 15: Cellular therapy for neurodegenerative diseases. Different sources of cells give rise to neural precursor cells (NPCs), the most common stem cell source to get neurons for neurodegenerative disorders cellular therapy. NPCs can be provided directly by fetal tissue graft or indirectly by somatic and stem cell differentiation. Genetic reprogramming of somatic cells originates induced neuronal (iN) cells directly or induced pluripotent stem cells (iPS) that can be differentiated into NPCs. Another class of stem cell, mesenchymal stem cells (MSC), can be directly used in patient treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by funds from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT)- Instituto de Neurociência Translacional- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). M.H.L is funded by FAPESP and INCT and L.C is funded by FAPESP and CNPq. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCE

- [1] Yao J, Mu Y, Gage FH. Neural stem cells: mechanisms and modeling. *Protein & cell*. 2012;3(4):251-61.
- [2] Dutta S, Singh G, Sreejith S, Mamidi MK, Husin JM, Datta I, *et al*. Cell therapy: the final frontier for treatment of neurological diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19(1):5-11.
- [3] Lunn JS, Sakowski SA, Hur J, Feldman EL. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Annals of neurology*. 2011;70(3):353-61.
- [4] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
- [5] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
- [6] Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, *et al*. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nature biotechnology*. 2001;19(5):475-9.
- [7] Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental biology*. 1996;175(1):1-13.
- [8] Rietze R, Poulin P, Weiss S. Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *The Journal of comparative neurology*. 2000;424(3):397-408.
- [9] Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie M, Sbarbati A, *et al*. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2008;17(5):909-16.
- [10] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
- [11] Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, *et al*. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem cells and development*. 2008;17(4):761-73.
- [12] Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2009;15(1):75-86.

- [13] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and tissue research*. 2007;327(3):449-62.
- [14] Zhang S, Muneta T, Morito T, Mochizuki T, Sekiya I. Autologous synovial fluid enhances migration of mesenchymal stem cells from synovium of osteoarthritis patients in tissue culture system. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(10):1413-8.
- [15] Mamidi MK, Pal R, Mori NA, Arumugam G, Thrichelvam ST, Noor PJ, *et al*. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(5):1353-63.
- [16] Janjanin S, Djouad F, Shanti RM, Baksh D, Gollapudi K, Prgomet D, *et al*. Human palatine tonsil: a new potential tissue source of multipotent mesenchymal progenitor cells. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(4):R83.
- [17] Jung M, Kaszap B, Redohl A, Steck E, Breusch S, Richter W, *et al*. Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell transplantation*. 2009;18(8):923-32.
- [18] Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, Mosna F, *et al*. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 2007;40(2):382-90.
- [19] Padovan CS, Jahn K, Birnbaum T, Reich P, Sostak P, Strupp M, *et al*. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell transplantation*. 2003;12(8):839-48.
- [20] Huang B, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targeted gene delivery vehicle for brain diseases. *Journal Control release*. 2012;162(2):464-73.
- [21] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
- [22] Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*. 2010;116(3):386-95.
- [23] Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(1):189-93.
- [24] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Brelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature biotechnology*. 2009;27(5):459-61.
- [25] Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, *et al*. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell*. 2009;5(1):111-23.
- [26] Li R, Bai Y, Liu T, Wang X, Wu Q. Induced pluripotency and direct reprogramming: a new window for treatment of neurodegenerative diseases. *Protein & cell*. 2013;4(6):415-24.
- [27] Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, *et al*. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. 2011;476(7359):220-3.
- [28] Liu X, Li F, Stubblefield EA, Blanchard B, Richards TL, Larson GA, *et al*. Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell research*. 2012;22(2):321-32.

- [29] Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature medicine*. 2004;10 Suppl:S42-50.
- [30] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(1):29-40.
- [31] Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England journal of medicine*. 1988;318(14):876-80.
- [32] Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet*. 1991;337(8753):1321-4.
- [33] Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 1998;339(15):1044-53.
- [34] Lyons MK. Deep brain stimulation: current and future clinical applications. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2011;86(7):662-72.
- [35] Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, *et al*. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*. 1990;247(4942):574-7.
- [36] Kordower JH, Goetz CG, Freeman TB, Olanow CW. Dopaminergic transplants in patients with Parkinson's disease: neuroanatomical correlates of clinical recovery. *Experimental neurology*. 1997;144(1):41-6.
- [37] Dunnett SB, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*. 1999;399(6738 Suppl):A32-9.
- [38] Lindvall O, Bjorklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2004;1(4):382-93.
- [39] Hagell P, Brundin P. Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2001;60(8):741-52.
- [40] Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2000;18(6):675-9.
- [41] Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, *et al*. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002;418(6893):50-6.
- [42] Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, *et al*. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature biotechnology*. 1999;17(7):653-9.
- [43] Chung S, Sonntag KC, Andersson T, Bjorklund LM, Park JJ, Kim DW, *et al*. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *The European journal of neuroscience*. 2002;16(10):1829-38.
- [44] Shim JW, Koh HC, Chang MY, Roh E, Choi CY, Oh YJ, *et al*. Enhanced *in vitro* midbrain dopamine neuron differentiation, dopaminergic function, neurite outgrowth, and 1-methyl-4-phenylpyridium resistance in mouse embryonic stem cells overexpressing Bcl-XL. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(4):843-52.
- [45] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, *et al*. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 2000;28(1):31-40.

- [46] Ganat YM, Calder EL, Kriks S, Nelander J, Tu EY, Jia F, *et al.* Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *The Journal of clinical investigation.* 2012;122(8):2928-39.
- [47] Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, *et al.* Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(1):102-9.
- [48] Redmond DE, Jr., Bjugstad KB, Teng YD, Ourednik V, Ourednik J, Wakeman DR, *et al.* Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(29):12175-80.
- [49] Cho MS, Lee YE, Kim JY, Chung S, Cho YH, Kim DS, *et al.* Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(9):3392-7.
- [50] Chung S, Moon JI, Leung A, Aldrich D, Lukianov S, Kitayama Y, *et al.* ES cell-derived renewable and functional midbrain dopaminergic progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(23):9703-8.
- [51] Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature.* 2011;480(7378):547-51.
- [52] Kim SU. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology.* 2004;24(3):159-71.
- [53] Kim SU, Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Bang JH, Lee HJ, *et al.* Production and characterization of immortal human neural stem cell line with multipotent differentiation property. *Methods in molecular biology.* 2008;438:103-21.
- [54] Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, *et al.* Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2006;26(48):12497-511.
- [55] Ryu MY, Lee MA, Ahn YH, Kim KS, Yoon SH, Snyder EY, *et al.* Brain transplantation of neural stem cells cotransduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 in Parkinsonian rats. *Cell transplantation.* 2005;14(4):193-202.
- [56] Kim SU, Park IH, Kim TH, Kim KS, Choi HB, Hong SH, *et al.* Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional improvement in animal models of Parkinson disease. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology.* 2006;26(2):129-40.
- [57] Young JE, Goldstein LS. Alzheimer's disease in a dish: promises and challenges of human stem cell models. *Human molecular genetics.* 2012;21(R1):R82-9.
- [58] Mattis VB, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet neurology.* 2011;10(4):383-94.
- [59] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(15):5856-61.
- [60] Rhee YH, Ko JY, Chang MY, Yi SH, Kim D, Kim CH, *et al.* Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(6):2326-35.

- [61] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136(5):964-77.
- [62] Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(16):5970-6.
- [63] Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, *et al.* Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(36):15921-6.
- [64] Studer L. Derivation of dopaminergic neurons from pluripotent stem cells. *Progress in brain research*. 2012;200:243-63.
- [65] Laganieri J, Kells AP, Lai JT, Guschin D, Paschon DE, Meng X, *et al.* An engineered zinc finger protein activator of the endogenous glial cell line-derived neurotrophic factor gene provides functional neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(49):16469-74.
- [66] Manfredsson FP, Okun MS, Mandel RJ. Gene therapy for neurological disorders: challenges and future prospects for the use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. *Current gene therapy*. 2009;9(5):375-88.
- [67] Behrstock S, Ebert AD, Klein S, Schmitt M, Moore JM, Svendsen CN. Lesion-induced increase in survival and migration of human neural progenitor cells releasing GDNF. *Cell transplantation*. 2008;17(7):753-62.
- [68] Xiong N, Zhang Z, Huang J, Chen C, Zhang Z, Jia M, *et al.* VEGF-expressing human umbilical cord mesenchymal stem cells, an improved therapy strategy for Parkinson's disease. *Gene therapy*. 2011;18(4):394-402.
- [69] Falk T, Zhang S, Sherman SJ. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*. 2009;4:49.
- [70] Eberling JL, Kells AP, Pivrotto P, Beyer J, Bringas J, Federoff HJ, *et al.* Functional effects of AAV2-GDNF on the dopaminergic nigrostriatal pathway in parkinsonian rhesus monkeys. *Human gene therapy*. 2009;20(5):511-8.
- [71] Garbayo E, Montero-Menei CN, Ansorena E, Lanciego JL, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. Effective GDNF brain delivery using microspheres--a promising strategy for Parkinson's disease. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2009;135(2):119-26.
- [72] Emborg ME, Ebert AD, Moirano J, Peng S, Suzuki M, Capowski E, *et al.* GDNF-secreting human neural progenitor cells increase tyrosine hydroxylase and VMAT2 expression in MPTP-treated cynomolgus monkeys. *Cell transplantation*. 2008;17(4):383-95.
- [73] Ebert AD, Beres AJ, Barber AE, Svendsen CN. Human neural progenitor cells over-expressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2008;209(1):213-23.
- [74] Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. 1983;219(4589):1184-90.
- [75] Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of neurology*. 1981;10(2):122-6.

- [76] Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217(4558):408-14.
- [77] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, *et al*. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science*. 2001;292(5521):1550-2.
- [78] Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, *et al*. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):4162-7.
- [79] Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, Dobbs N, Chow KM, Eckman CB, *et al*. Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(10):6221-6.
- [80] Mueller-Stieber S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, *et al*. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*. 2006;51(6):703-14.
- [81] Melchor JP, Pawlak R, Strickland S. The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (A β) degradation and inhibits A β -induced neurodegeneration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(26):8867-71.
- [82] Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, Lin L, Isacson O, Selkoe DJ. Reducing amyloid plaque burden *via ex vivo* gene delivery of an A β -degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS medicine*. 2007;4(8):e262.
- [83] Lee JK, Jin HK, Endo S, Schuchman EH, Carter JE, Bae JS. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem cells*. 2010;28(2):329-43.
- [84] Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neuroscience letters*. 2009;450(2):136-41.
- [85] Lee HJ, Lee JK, Lee H, Shin JW, Carter JE, Sakamoto T, *et al*. The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 2010;481(1):30-5.
- [86] Montero CN, Hefti F. Rescue of lesioned septal cholinergic neurons by nerve growth factor: specificity and requirement for chronic treatment. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988;8(8):2986-99.
- [87] Fischer W, Victorin K, Bjorklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*. 1987;329(6134):65-8.
- [88] Tuszynski MH, U HS, Amaral DG, Gage FH. Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990;10(11):3604-14.
- [89] Emerich DF, Winn SR, Harper J, Hammang JP, Baetge EE, Kordower JH. Implants of polymer-encapsulated human NGF-secreting cells in the nonhuman primate: rescue and sprouting of degenerating cholinergic basal forebrain neurons. *The Journal of comparative neurology*. 1994;349(1):148-64.

- [90] Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, *et al.* A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature medicine*. 2005;11(5):551-5.
- [91] Wu S, Sasaki A, Yoshimoto R, Kawahara Y, Manabe T, Kataoka K, *et al.* Neural stem cells improve learning and memory in rats with Alzheimer's disease. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2008;75(3):186-94.
- [92] Moghadam FH, Alaie H, Karbalaie K, Tanhaei S, Nasr Esfahani MH, Baharvand H. Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats. *Differentiation; research in biological diversity*. 2009;78(2-3):59-68.
- [93] Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, *et al.* Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature medicine*. 2009;15(3):331-7.
- [94] Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Muller FJ, Loring JF, *et al.* Neural stem cells improve cognition *via* BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(32):13594-9.
- [95] Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(10):2183-200.
- [96] Lee HJ, Kim KS, Kim EJ, Choi HB, Lee KH, Park IH, *et al.* Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem cells*. 2007;25(5):1204-12.
- [97] Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, *et al.* Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell*. 2011;146(3):359-71.
- [98] Clelland CD, Barker RA, Watts C. Cell therapy in Huntington disease. *Neurosurgical focus*. 2008;24(3-4):E9.
- [99] Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, *et al.* Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet*. 2000;356(9246):1975-9.
- [100] Nakao N, Itakura T. Fetal tissue transplants in animal models of Huntington's disease: the effects on damaged neuronal circuitry and behavioral deficits. *Progress in neurobiology*. 2000;61(3):313-38.
- [101] Dunnett SB, Carter RJ, Watts C, Torres EM, Mahal A, Mangiarini L, *et al.* Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Experimental neurology*. 1998;154(1):31-40.
- [102] Freeman TB, Cicchetti F, Hauser RA, Deacon TW, Li XJ, Hersch SM, *et al.* Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13877-82.
- [103] McBride JL, Behrstock SP, Chen EY, Jakel RJ, Siegel I, Svendsen CN, *et al.* Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *The Journal of comparative neurology*. 2004;475(2):211-9.
- [104] Song J, Lee ST, Kang W, Park JE, Chu K, Lee SE, *et al.* Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neuroscience letters*. 2007;423(1):58-61.

- [105] Keene CD, Chang RC, Leverenz JB, Kopyov O, Perlman S, Hevner RF, *et al.* A patient with Huntington's disease and long-surviving fetal neural transplants that developed mass lesions. *Acta neuropathologica*. 2009;117(3):329-38.
- [106] Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH. Animal models of Huntington's disease. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2007;48(4):356-73.
- [107] Ryu JK, Kim J, Cho SJ, Hatori K, Nagai A, Choi HB, *et al.* Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiology of disease*. 2004;16(1):68-77.
- [108] Lescaudron L, Unni D, Dunbar GL. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. *The International journal of neuroscience*. 2003;113(7):945-56.
- [109] Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2003;181(2):115-29.
- [110] Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(15):4604-16.
- [111] Ebert AD, Barber AE, Heins BM, Svendsen CN. *Ex vivo* delivery of GDNF maintains motor function and prevents neuronal loss in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Experimental neurology*. 2010;224(1):155-62.
- [112] Dey ND, Bombard MC, Roland BP, Davidson S, Lu M, Rossignol J, *et al.* Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the YAC 128 mouse model of Huntington's disease. *Behavioural brain research*. 2010;214(2):193-200.
- [113] Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006;52(1):39-59.
- [114] Chi L, Gan L, Luo C, Lien L, Liu R. Temporal response of neural progenitor cells to disease onset and progression in amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mice. *Stem cells and development*. 2007;16(4):579-88.
- [115] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 2002;110(3):385-97.
- [116] Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse VF, Brownstone RM. Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(36):7848-58.
- [117] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, *et al.* Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain*. 2007;130(Pt 5):1289-305.
- [118] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Del Bo R, Fortunato F, *et al.* Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssea-1)+/CXCR4+ stem cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(13):1860-2.
- [119] Kerr DA, Llado J, Shablott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, *et al.* Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(12):5131-40.

- [120] Xu L, Yan J, Chen D, Welsh AM, Hazel T, Johe K, *et al.* Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation*. 2006;82(7):865-75.
- [121] Hefferan MP, Galik J, Kakinohana O, Sekerkova G, Santucci C, Marsala S, *et al.* Human neural stem cell replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis by spinal transplantation. *PloS one*. 2012;7(8):e42614.
- [122] Glass JD, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, *et al.* 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.
- [123] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321(5893):1218-21.
- [124] Yan Q, Matheson C, Lopez OT. *In vivo* neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*. 1995;373(6512):341-4.
- [125] Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*. 2008;31(3):395-405.
- [126] Morita E, Watanabe Y, Ishimoto M, Nakano T, Kitayama M, Yasui K, *et al.* A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Experimental neurology*. 2008;213(2):431-8.
- [127] Klein SM, Behrstock S, McHugh J, Hoffmann K, Wallace K, Suzuki M, *et al.* GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Human gene therapy*. 2005;16(4):509-21.
- [128] Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Klein SM, Aebischer P, *et al.* GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PloS one*. 2007;2(8):e689.
- [129] Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Experimental neurology*. 2010;223(1):229-37.

ANEXO C – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **021** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marilene Hohmuth Lopes** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo funcional da Co-Chaperonina ST11 na biologia de células tronco embrionárias murinas*" do qual participam o(s) aluno(s) **Jenny Andrea Arévalo Romero , Angela del Ry Menezes, Felipe Pozetti**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.08.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP