

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

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, interessantemente, 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.

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 trofotoderma (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 espinais 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.

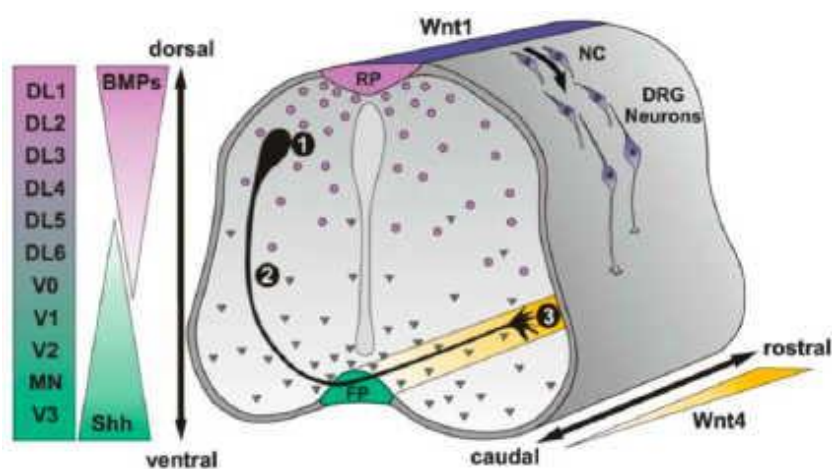


Figura 1 - Esquema do tubo neural com destaque para localização e funções de progenitores dopaminérgicos da base do tubo. À esquerda, gradiente dorso-ventral controlado dos morfógenos BMP e Shh determinam subtipos neurais (DL1-V3). Axônios

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).

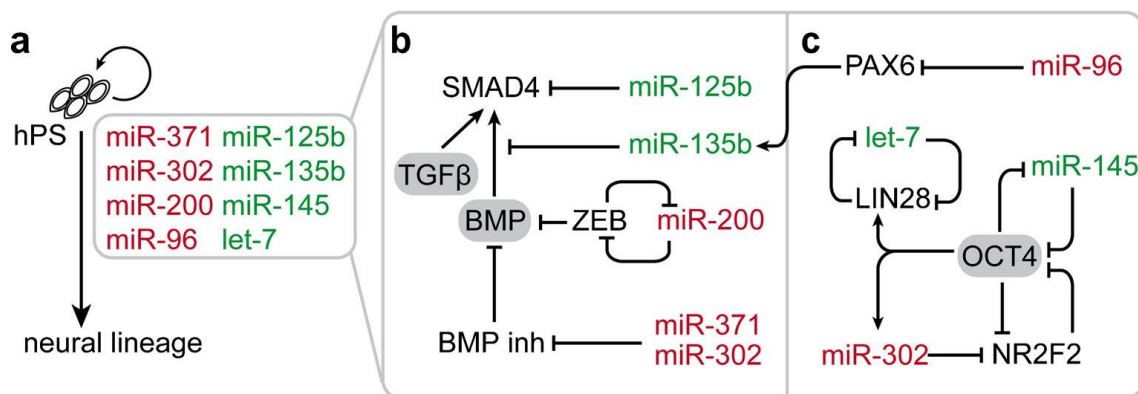


Figura 2 - Esquema de miRNAs e moléculas alvo na indução ou repressão da diferenciação neural. a) Lista de miRNAs que atuam positivamente (em verde) ou negativamente (em vermelho) na indução neural. b) atuação de miRNAs que regulam a diferenciação neural ao influenciar a atividade da via BMP/ TGF β . 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; STOOORVOGEL, 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.

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.

4.3 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).

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.
- 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 Expansion. **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.; STOORVOGEL, 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.