UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KELLY CRISTINE SANTOS ROBALLO

**Comunicação exossomal na transdiferenciação de células-tronco
em cocultivo com células neuronais**

**Pirassununga
2017**

KELLY CRISTINE SANTOS ROBALLO

**Comunicação exossomal na transdiferenciação de células-tronco
em cocultivo com células neuronais**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Coorientador: Juliano Coelho da Silveira

**Pirassununga
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R628c Roballo, Kelly Cristine Santos
Comunicação exossomal na transdiferenciação de
células-tronco em cocultivo com células neuronais /
Kelly Cristine Santos Roballo ; orientador Carlos
Eduardo Ambrósio ; coorientador Juliano Coelho da
Silveira. -- Pirassununga, 2017.
159 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Transdiferenciação. 2. Sistema nervoso. 3.
Expressão gênica. 4. Comunicação celular. 5.
Exossomo. I. Ambrósio, Carlos Eduardo , orient. II.
Coelho da Silveira, Juliano, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Kelly Cristine Santos Roballo

Título: Comunicação exossomal na transdiferenciação de células-tronco em cocultivo com células neuronais

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, por ser meu herói, sempre me apoiar, me amar, e por estar ao meu lado incondicionalmente. À minha mãe, por nunca ter desistido de mim e ter lutado até o fim para que eu pudesse estar aqui hoje, e por ainda hoje continuar dando o seu melhor por mim. E aos dois, por terem me dado vida, amor, princípios, e por terem me ensinado a sempre ser humilde e buscar o equilíbrio na vida.

À minha irmã, Carla (Carlota Joaquina), por me ensinar o que é se dedicar ao próximo diariamente sem julgamento e com humildade, sempre fazendo o melhor, e acima de tudo nunca desistir, mesmo quando não se tem mais forças.

Ao meu melhor amigo e companheiro das aventuras da vida, Eric M. Penicka, por cuidar sempre de mim mesmo longe, pela paciência e companheirismo, por ter me ensinado a sair da minha zona de conforto e ser alguém melhor, e sempre buscar construir coisas boas na vida pensando no hoje. Obrigada por dar cores e trilha sonora às experiências que vivemos.

Aos meus avós, por terem cuidado de mim, e sempre me ensinado que a vida é uma trajetória de conhecimentos, e que a experiência é um aprendizado que se adquire com o tempo, sendo que o tempo, este não se controla. Porém, o que fazemos hoje sempre se refletirá amanhã.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, minha base espiritual, e amparo desta trajetória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2015/17897-9), ao Centro de Inovação e Disseminação de Pesquisa CEPID-(FAPESP) (Processo nº 2013/08135-2), e à CAPES por possibilitarem a execução deste estudo.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, SP e ao biotério do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP por todo o apoio e ajuda.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, e seu corpo docente, direção, administração, e todo o pessoal que trabalha para manter esta instituição diariamente, por dar estrutura e permitir realizar meus estudos e experimentos.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Ambrósio (Caju), pela orientação, mentoria, apoio e confiança não apenas nestes anos de doutorado, mas também por todos os anos anteriores. É uma grande honra poder trabalhar com o senhor, foram muitos aprendizados e grandes momentos de crescimento pessoal e científico.

Ao Dr. Juliano Coelho da Silveira (Ju Gaúcho), pela coorientação, por sempre me apoiar, discutir os experimentos e principalmente por me ouvir e também puxar minha orelha sempre quando necessário.

Às minhas amigas Aline F. Souza e Naira C. G. Pieri (as bests) por me ajudarem incondicionalmente, pela irmandade, por me aguentarem, e me apoiarem a todo o momento. Os dias com vocês são os melhores.

À minha amiga Martini (Dra. Fabiana F. Bressan), por sempre achar um tempinho para mim, sempre estar disposta a me ajudar e por trazer calma em momentos de tormentas pessoais e científicas.

À minha amiga Vanessa O., agora a mami do Lorenzo, por ter me ajudado nesta trajetória, por ouvir todos os meus desabafos, e sempre estar ao meu lado. À minha irmã de alma Prof. Dr. Fabiana Leoneli por sempre acreditar em mim.

À Vitoria P. Mattos (IC), por me ajudar nestes meses finais, por se dedicar, por sempre querer aprender, por me lembrar o quanto o amor a ciência é para poucos, e por todos os aprendizados que tive a seu lado.

Ao Rodrigo Barreto, Tiago Milanin e Arina Rocchetti (Nina) por serem parte dos bests, por sempre me ouvirem mesmo que por cinco minutos, e por sempre me lembrarem do valor da amizade, pois com amigos tudo fica mais fácil.

À Prof. Dr. Daniele dos Santos Martins, que me ajudou intensamente nos experimentos *in vivo* e também nas dúvidas da vida, seu apoio foi primordial.

À Dr. Valéria M. Lara (Val), por ter me ajudado em todos os momentos em que me senti perdida “cientificamente” e “espiritualmente”, além de sempre trazer o chá que nos aquecia e renovava a energia em nossas tardes.

À Gabriella Mamede (roomie), por me aguentar diariamente, e sempre saber o que falar, e me aconselhar, mostrando o lado bom de tudo.

Aos meus colegas de laboratório, Alessandra P., Ingrid G., Jessica O., Luciana M., Lina C. B., Patrícia Luz, Letícia P. e Felipe A. Ros, Camila G. Gomes e aos meus colegas de outros laboratórios, Hugo, Lais, Juliano, Fernanda e Aninha por toda a ajuda e momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Adriano Carregaro, Jeffeson Codeiro e pessoal da anestesia, por terem me ajudado com todo o protocolo anestésico do experimento *in vivo* e por terem me dado todo o suporte na anestesia.

Ao Prof. Dr. Ricardo Strefezzi e à Lidia Hildebrand Pulz por me ajudarem na reta final com as análises histopatológicas.

Ao Prof. Dr. Felipe Perecin e Prof. Dr. Flávio Meirelles por todos os questionamentos e ensinamentos. À Cleide Silva e Prof. Dr. Marcos R. Chiaratti, por me ajudarem de forma única fornecendo os animais deste estudo.

Aos animais utilizados neste experimento, devo respeito por terem sido instrumento de aprendizado e auxílio. E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e fizeram parte desta trajetória, muito obrigada.

**Ao meu orientador, Carlos Eduardo Ambrósio, pela confiança,
paciência, e por acreditar em mim. Não existem palavras que
expressem minha gratidão por ter me ajudado e orientado nesta
conquista, me proporcionando crescimento profissional e
espiritual.**

Agradeço especialmente

RESUMO

ROBALLO, K. C. S. **Comunicação exossomal na transdiferenciação de células-tronco em cocultivo com células neuronais**. 2017. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Células neuronais cocultivadas com células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) podem induzir estas últimas à transdiferenciação neuronal. No entanto, os processos de comunicação celular envolvidos nessa indução, e a funcionalidade da ADSC transdiferenciada *in vivo*, são desconhecidos. Recentemente, um novo tipo de comunicação celular mediada por vesículas extracelulares são indicados na modulação de diferentes eventos celulares como a diferenciação. Portanto, a hipótese, nesta proposta, foi identificar se o processo de diferenciação celular é mediado por vesículas extracelulares e se as células diferenciadas são capazes de atuar na regeneração de tecidos nas lesões do sistema nervoso periférico. Para tal, essa pesquisa foi dividida em duas fases: a primeira consiste no processo *in vitro*, com o objetivo de observar o processo de transição da ADSC para a linhagem neuronal e analisar a função da comunicação celular no processo de diferenciação; a segunda consistiu na avaliação *in vivo* da possível funcionalidade das ADSC diferenciadas. O camundongo foi o modelo animal utilizado (C57BL/6 e FVB). As ADSC e as células neuronais foram isoladas, cultivadas em cultivo primário e cocultivadas durante três, sete e 14 dias. Para a comprovação das mudanças fenotípicas das ADSC, realizou-se a imunolocalização com beta tubulina III e SNAP25 e PCR em tempo real (RT-qPCR) dos genes *Map2* e *Snap25*. Seguido de análises de genes relacionados com a neurogênese. Adicionalmente, as vesículas extracelulares foram isoladas e utilizados para análises *in vitro* da diferenciação e análises gênicas e funcionais. Como resultado, verificou-se que as ADSC em cocultivo com neurônios podem se diferenciar em neuronais-like. Além disso, comprovou-se a comunicação por vesículas extracelulares entre neurônios e ADSC, e as vesículas extracelulares foram correlacionadas neste processo, pelo transporte da proteína SNAP25. Após estes resultados prosseguiu-se para a segunda fase deste trabalho, a etapa *in vivo*, que incidiu na utilização das ADSC cocultivadas por sete dias e avaliação funcional local e sistêmica no processo de regeneração do nervo ciático após neurotome. Como resultado desta etapa as células-tronco cocultivadas modularam a lesão, e proporcionaram uma melhoria na funcionalidade após lesão. Conclui-se, através desta pesquisa, que as ADSC diferenciadas em neuronais-like, sob indução dos neurônios e suas vesículas extracelulares podem ser uma fonte celular alternativa no auxílio na regeneração de nervos periféricos.

Palavras-chave: Transdiferenciação. Sistema nervoso. Expressão gênica. Comunicação celular. Exossomo.

ABSTRACT

ROBALLO, K. C. S. **Exosome communication in the transdifferentiation of stem cells in co-culture with neuronal cells**. 2017. 159 f. Thesis (PhD in Science) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Neuronal cells co-cultured with stem cells derived from adipose tissue (ADSC) can induce the latter to neuronal transdifferentiation. However, the cellular communication processes involved in this induction, and the functionality of the transdifferentiated ADSC *in vivo*, are unknown. Recently, a new type of cellular communication measured by extracellular vesicles was indicated in the modulation of different cellular events like differentiation. Therefore, the hypothesis in this proposal was to identify if the process of cellular differentiation is mediated by extracellular vesicles and if the differentiated cells are able to act in the regeneration of tissues in the lesions of the peripheral nervous system. For this, the research was divided in two phases: the first one consisted of the *in vitro* process, with the objective of observing the transition process of the ADSC to the neuronal lineage and analyzing the cellular communication function in the differentiation process; the second consisted in the *in vivo* evaluation of the possible functionality of the differentiated ADSCs. Murine was the animal model used (C57BL/6 and FVB). ADSCs and neuronal cells were isolated, cultured in primary culture and co-cultured for three, seven and 14 days. To confirm the phenotypic changes of ADSC, immunolocalization with beta tubulin III and SNAP25 and real-time PCR (RT-qPCR) of the *Map2* and *Snap25* genes was performed, followed by analysis of genes related to neurogenesis. In addition, extracellular vesicles were isolated and used for *in vitro* differentiation and gene and functional analysis. As a result, it has been found that ADSCs in co-culture with neurons can differentiate into neuronal-like. The communication by extracellular vesicles between neurons and ADSCs was verified, and the extracellular vesicles were correlated in the differentiation process by the transport of the protein SNAP25. After these results, the second phase of this work was continued, the *in vivo* step, which focused on the use of the co-cultivated ADSCs for seven days and functional local and systemic evaluation in the process of sciatic nerve regeneration after neurotmesis. As a result of this step, the co-cultured stem cells modulated the lesion and provided an improvement in functionality after injury. It is concluded that ADSCs can transdifferentiate neuronal lines in co-culture with neurons, the extracellular vesicles play a certain role in this process and the transdifferentiated ADSC may be an alternative to aid in the regeneration of peripheral nerves.

Keywords: Transdifferentiation. Nervous system. Gene expression. Cellular communication. Exosome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genes e miRNAs relacionados com a neurogênese adulta.....	29
Figura 2 - Delineamento experimental.....	43
Figura 3 – Modelo esquemático experimental do Estudo 1 “Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”.....	44
Figura 4 - Cocultivo com insertos.....	48
Figura 5 - Modelo esquemático experimental Estudo 2- “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”.....	55
Figura 6 - Isolamento de exossomos através do ExoQuick.....	56
Figura 7 - Indução da transdiferenciação por fatores solúveis ou vesículas extracelulares originadas do meio de cultivo das células neuronais.....	61
Figura 8 - Modelo esquemático experimental Estudo 3 - “Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”.....	64
Figura 9 - Análise da bioluminescência captada pelo In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS.....	65
Figura 10 - Delineamento dos grupos do estudo 3.....	67
Figura 11 - Procedimento cirurgico.....	67
Figura 12 – Índice de funcionalidade do nervo ciático (SFI).....	71
Figura 13 - Equação do índice do nervo ciático.....	72
Figura 14 - Cultivo primário das células-tronco do tecido adiposo (ADSC) e das células neuronais.....	74
Figura 15 - Cultivo células neuronais.....	75
Figura 16 - Caracterização de ADSC como célula tronco mesenquimal.....	76
Figura 17 - Marcação por imunocitoquímica para as proteínas beta tubulina III (TUBIII) e SNAP25.....	77
Figura 18 – Morfologia da ADSC cocultivada.....	78

Figura 19 - Porcentagem de ADSC-CC positivas para TUBIII e SNAP25.....	79
Figura 20 - Porcentagem de ADSC-CC positivas para TUB III e SNAP25 quantificadas por citometria de fluxo.....	80
Figura 21 - Nível de transcritos de mRNA nas células-tronco após os períodos de indução por cocultivo com inserto.....	81
Figura 22 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na manutenção, proliferação e especificação das NSC.....	82
Figura 23 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios.....	83
Figura 24 - Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade.....	84
Figura 25 - Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese.....	85
Figura 26 - Avaliação do miRNAs estudados nas ADSC-CC.....	86
Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão para análise da morfologia das pequenas vesículas extracelulares isoladas (Exossomos).....	87
Figura 28 - Análise do tamanho e concentração das vesículas extracelulares.....	88
Figura 29 - Western blotting das proteínas ALIX (95kDa) e CD63 (~55 kDa) exclusivas de vesículas extracelulares.....	89
Figura 30 - Western blotting das proteínas SNAP25 nas vesículas extracelulares isoladas.....	90
Figura 31 - Plot e histograma da citometria de fluxo das ADSC GFP+.....	91
Figura 32 - Rastreamento de imagens de vesículas extracelulares.....	92
Figura 33 - Comunicação via vesículas extracelulares entre as BRC e ADSC em cultivo direto.....	93
Figura 34 - Vesículas extracelulares nas células com indícios de diferenciação.....	94
Figura 35 - Marcação para SNAP5 nos diferentes tratamentos realizados para a indução da transdiferenciação neuronal.....	96
Figura 36 - Porcentagem de células positivas para SNAP25 após três dias de indução nos diferentes tipos de indução.....	97

Figura 37 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na manutenção, proliferação e especificação das NSC	99
Figura 38 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na manutenção, proliferação e especificação das NSC.....	101
Figura 39 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios.....	102
Figura 40 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios.....	103
Figura 41 - Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade.....	104
Figura 42 - Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade.....	105
Figura 43 - Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese.....	106
Figura 44 - Avaliação do miRNAs estudados nas células-tronco do tecido adiposo, induzidas via cocultivo, ou indução via vesículas extracelulares no dia três de cultivo.....	108
Figura 45 - Avaliação do miRNAs estudados nas células-tronco do tecido adiposo, induzidas via cocultivo, ou indução via vesículas extracelulares no dia sete de cultivo.....	109
Figura 46 - Análise dos componentes principais avaliados na neurogênese adulta nas ADSC que receberam EVs (ADSC-EVs).....	109
Figura 47 - Avaliação da aplicação das ADSC-CC D7 In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS.....	113
Figura 48 - Avaliação da aplicação das células In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS- Houve três perfis de comportamento celular in vivo.....	114
Figura 49- Avaliação da quantidade de células no local da lesão com o passar do tempo.....	115
Figura 50 - Avaliação do índice do nervo ciático (SFI) - Diferenças entre o SFI nos grupos avaliados.....	116

Figura 51 - Peso do Músculo Gastrocnêmio.....	117
Figura 52 - Análise morfológica do músculo Gastrocnêmio.....	118
Figura 53 - Histomorfometria do nervo ciático.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados no RT-qPCR.....	52
Tabela 2 - MiRNAs de murino e seus genes alvo.....	53
Tabela 3 - MiRNAs de murino analisados.....	54

LISTA DE SIGLAS

ADSC- sigla do inglês adipocyte derived stem cell (Células-tronco derivadas do tecido adiposo)

BDNF- sigla do inglês brain-derived neurotrophic factor (Fator neurotrófico derivado do cérebro)

BMSC - sigla do inglês bone marrow stem cell (células-tronco da medula óssea)

BRC- brain cells (neurônios)

BRCEXo- pequenas vesículas extracelulares de neurônios

BRCMV- grandes vesículas extracelulares de neurônios

CC- cocultivo

CD- cultivo direto

CREB- sigla do inglês cAMP response element-binding protein

CTR- controle

D10- dia dez

D14- dia quatorze

D2- dia dois

D3- dia três

D7- dia sete

DMEM- sigla do inglês Dulbecco Modified Eagle Medium

ELISA- sigla do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Exo- pequenas vesículas extracelulares (exossomos)

EZH2- sigla do inglês Enhancer de zeste homolog2

GDNF- sigla do inglês glial cell derived neurotrophic factor

GFP- sigla do inglês green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)

ISCT- sigla do inglês International Society for Cellular Therapy (sociedade internacional de terapias celulares)

IVIS- sigla do inglês in Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS

MAP2- proteína associada ao conjunto de microtúbulos

MBD1- sigla do inglês Methyl-CpG-binding domain protein 1

MECP2- sigla do inglês Methyl-CpG-binding protein 2

MIB1- sigla do inglês Mind bomb1

MSC- sigla do inglês mesenchymal stem cell (células-tronco mesenquimais)

MV- grandes vesículas extracelulares (microvesículas)

NCAM- molécula de adesão celular neuronal

NSC- sigla do inglês neural stem cell (células-tronco neurais)

NUMBL- sigla do inglês Numb-like

PBS- sigla do inglês Phosphate-Buffered Saline

PFA- paraformaldeído

PNI - sigla do inglês peripheral nerve injury (lesão de nervo periférico)

PTBP1- sigla do inglês polypyrimidine tract binding protein 1

REST- sigla do inglês repressor Element 1 silencing transcription factor

SFI- sigla do inglês Sciatic functional index (índice do nervo ciático)

SNAP25- proteína da família, SNARE, associada ao sinaptossoma 25

TBST - sigla do inglês Tris Buffered Saline

TLX- sigla do inglês NR2E1 nuclear receptor subfamily 2 group E member 1

TUBIII- beta tubulina III

VE- Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1. Células-tronco do tecido adiposo	27
2.2. Principais genes e microRNAs (miRNA) relacionados com a neurogênese adulta, morfologia, e função dos neurônios	29
2.3. Comunicação celular no processo de diferenciação celular	32
2.4. Comunicação celular através de vesículas extracelulares	33
2.5. Comunicação celular através de exossomos	35
2.6. Modulação das vesículas extracelulares no sistema nervoso	36
2.7. Utilização de células-tronco na terapia regenerativa de lesão de nervos periféricos	37
3 HIPÓTESE GERAL.....	40
3.1 Hipótese de cada estudo.....	40
4 OBJETIVO GERAL.....	41
4.1 Objetivos específicos.....	41
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL	42
6 MATERIAIS E MÉTODOS	44
6.1. Estudo 1- “ Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos ”	44
6.1.1 Isolamento de neurônios e cultivo primário.....	45
6.1.2 Isolamento de células-tronco do tecido adiposo e cultivo primário	45
6.1.3 Caracterização da célula-tronco do tecido adiposo	46
6.1.4 Cocultivo com insertos	47
6.1.5 Imunocitoquímica	49
6.1.6 Quantificação de células imunopositivas na imunocitoquímica	49

6.1.7 Citometria de fluxo	50
6.1.8 RT-qPCR.....	50
6.1.9 Análise Estatística.....	54
6.2 Estudo 2- “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”	54
6.2.1 Caracterização das Vesículas Extracelulares do Cocultivo.....	55
6.2.2 Rastreamento das vesículas extracelulares.....	59
6.2.3 Rastreamento das vesículas extracelulares nas células com indicio de diferenciação.....	60
6.2.4 Papel das vesículas extracelulares na transdiferenciação das células-tronco do tecido adiposo.....	61
6.2.5 Análise Estatística dos dados do Estudo 2	63
6.3 Estudo 3 - “Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”	64
6.3.1 Preparação das células.....	65
6.3.2 Delineamento dos grupos do estudo 3.....	65
6.3.3 Animais.....	67
6.3.4 Procedimento cirúrgico	67
6.3.5 Avaliação da aplicação das células In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS.....	69
6.3.6 Avaliação da lesão do nervo ciático e funcionalidade do membro afetado.....	70
6.3.7 Análise Estatística.....	72
7 RESULTADOS	73
7.1 Estudo 1 - “ Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos ”	73
7.1.1 Isolamento e cultivo primário das células do cérebro e das células-tronco do tecido adiposo.....	73
7.1.2 Caracterização da célula-tronco do tecido adiposo	75

7.1.3 Imunocitoquímica	76
7.1.4 Quantificação de células imunopositivas na imunocitoquímica	78
7.1.5 Citometria de fluxo	79
7.1.6 Expressão dos genes Map2 e Snap25 nas células-tronco após os períodos de indução por cocultivo com inserto	80
7.1.7 Níveis de transcritos avaliados, que podem estar relacionados com a neurogênese adulta	81
7.1.8 Expressão de miRNAs relacionados com a neurogênese adulta	85
7.2 Estudo 2-“Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”	87
7.2.1 Caracterização da estrutura, morfologia e quantificação das vesículas extracelulares	87
7.2.2 Rastreamento das vesículas extracelulares	90
7.2.3 Rastreamento das vesículas extracelulares nas células com indícios de diferenciação	93
7.2.4 Papel das vesículas extracelulares na transdiferenciação das células-tronco do tecido adiposo	95
7.3 Estudo 3 - “Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”	112
7.3.1 Avaliação da aplicação das células In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS..	112
7.3.2 Avaliação da lesão do nervo ciático e funcionalidade do membro afetado.....	115
8 DISCUSSÃO	120
8.1 Estudo 1- “ Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”	120
8.2 Estudo 2 -“Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”	126
8.3 Estudo 3-“Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”	131

9 CONCLUSÃO	135
9.1 Estudo 1 - “Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”	135
9.2 Estudo 2 -“Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”	135
9.3 Estudo 3 -“Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”	135
9.4 Conclusão Geral	135
REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE.....	149
APÊNDICE A - Detalhamento da imunocitoquímica do estudo 1, para os marcadores neuronais TUBIII e SNAP25	149
ANEXO	158
ANEXO A – Artigo Submetido	158
ANEXO B – Parecer do comitê de Ética.....	159

1 INTRODUÇÃO

Mecanismos que envolvem as interações entre as células e a atividade intracelular podem ser estudados através das vias metabólicas (KELL et al., 2005), das interações celulares e ambientais (LANE et al., 2014), e atualmente pela comunicação celular mediada por vesículas extracelulares (VE) (VALADI et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

O processo de diferenciação das células-tronco pode ser realizado por vários mecanismos. Dentre esses, destacam-se interação direta, célula-a-célula, e indireta, via fatores secretados (LANE et al., 2014; RATAJCZAK; WYSOCZYNSKI et al., 2006). Ressaltando, também as alterações extracelulares e intracelulares (hipóxia e variações de glicose) (LANE et al., 2014), os fatores físicos como a topografia celular e matriz extracelular, e as vesículas extracelulares, que podem também influenciar no processo de diferenciação celular das células-tronco (LANE et al., 2014; VALADI et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

No caso das vesículas extracelulares (pequenas vesículas extracelulares-exossomos, e grandes vesículas extracelulares- microvesículas), estas auxiliam na interação celular, participando das vias metabólicas celulares que mantêm o organismo em funcionamento (LANE et al., 2014; MAAS et al., 2017; ZHANG et al., 2015). Essas vesículas podem carrear internamente microRNAs, RNA mensageiros, DNA e proteínas (DE GASSART et al., 2004; VLASSOV et al., 2012), que podem modular a célula receptora, induzindo à diferenciação celular (HUANG et al., 2016).

Além disso, o conteúdo de tais vesículas pode modular alterações na célula receptora, assim como a célula receptora pode liberar vesículas, estabelecendo uma comunicação bidirecional, que pode auxiliar em processos regenerativos (BONAFEDE et al., 2016; KALANI et al., 2014; QUESENBERRY et al., 2015) ampliando a gama de possíveis alternativas terapêuticas para a regeneração tecidual, como de tecidos do sistema nervoso (CAMUSSI et al., 2011; CAMUSSI, 2017).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC - sigla em inglês para adipocyte derived stem cell) são células-tronco mesenquimais (MSC - sigla em inglês

para mesenchymal stem cell), com capacidade de se diferenciar em linhagens mesodérmicas como condrócitos (DU et al., 2016; TECHNAU et al., 2011), osteoblastos (BARBA et al., 2013; HANADA et al., 1997), adipócitos (BAGLIONI et al., 2009; LOCKE; WINDSOR; DUNBAR, 2009), e do ectodérmica como células neuronais (ADAMS; ARRUDA; LARKIN, 2012; FRANCO LAMBERT et al., 2009). Ademais, essas células produzem fatores de crescimento e fatores solúveis que podem mediar a neuroproteção (CHUNG et al., 2012; MOON et al., 2014; VOULGARI-KOKOTA et al., 2012), imunomodular a resposta imune, além de produzirem componentes que auxiliam na reparação tecidual (BALAJI; KESWANI; CROMBLEHOLME, 2012; BRONZI et al., 2010; DU et al., 2016; TECHNAU et al., 2011; VOULGARI-KOKOTA et al., 2012).

No processo de diferenciação neuronal muitos protocolos preconizam a utilização de fatores de crescimento (BRONZI et al., 2010), indutores (ERCOLIN et al., 2016; MARESCHI et al., 2006) e meio neurogênico (BAGLIONI et al., 2009; DHANASEKARAN et al., 2013; GOLDMAN, 2016; PRABHAKARAN et al., 2009). No entanto, pesquisas têm utilizado o cocultivo com insertos (transwell) de células-tronco com outros tipos celulares, e demonstraram aumento na taxa de diferenciação, devido a fatores secretados pelas células (BAHMANI et al., 2014; DARVISHI et al., 2017; ROBALLO et al., 2013; ZHANG et al., 2017), e aumento da proliferação celular (ZHANG et al., 2017), tornando esse sistema de cocultivo *in vitro* atrativo para estudos que visam interações celulares e a indução da diferenciação. Desta maneira, nesse trabalho propusemos utilizar como método de indução ao processo de diferenciação neuronal o cocultivo com insertos (transwell) de células neuronais como ADSC, e também utilizar este método de cocultivo para o estudo da comunicação mediada por vesículas extracelulares, ressaltando que não há outros estudos semelhantes ao proposto nesse trabalho.

Devido à escassez de estudos que analisam o processo de diferenciação neuronal das ADSC, de forma minuciosa e a nível molecular e se tais células após o processo de diferenciação possuem funcionalidade *in vivo*. Neste trabalho foi proposto: 1) O estudo da indução das células neuronais perante à ADSC, utilizando o cocultivo com o inserto que permitiu que as células tivessem comunicação sem

contato físico, ou seja, apenas comunicação via meio de cultivo quando em cultivo, e a quantificação e análise da transdiferenciação das ADSC induzidas *in vitro*; 2) Análise da transdiferenciação via comunicação celular por vesículas extracelulares; e 3) Análise da funcionalidade das células-tronco transdiferenciadas em linhagens neuronais *in vivo*, em lesões de nervos periféricos, como uma alternativa de terapia celular no auxílio ao progresso regenerativo em lesões de nervos periféricos. Para isso, foi utilizado o murino (*mus musculus*) como modelo animal.

Acreditamos que as células neuronais podem induzir a transdiferenciação das ADSC em linhagens neuronais, e as vesículas extracelulares estão relacionadas nesse processo. Por fim, como foco final desse estudo, acreditamos que há funcionalidade das ADSC quando transdiferenciadas em linhagens neuronais *in vivo*, em lesões de nervos periféricos, e estas células neuronais-*like* são uma alternativa para a terapia celular no auxílio do processo regenerativo em lesões de nervos periféricos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Células-tronco do tecido adiposo

Revisões de literatura assim como experimentos vêm demonstrando o grande potencial das ADSC na terapia celular regenerativa, devido à sua capacidade de diferenciação em linhagens da mesoderma, ectoderma e endoderma (GENTILE et al., 2012; VERONESI et al., 2014; WANKHADE et al., 2016). Além disso, sua distribuição no organismo facilita seu isolamento podendo ser coletada, por procedimentos pouco invasivos como por exemplo, por lipossucção ou biopsia (KISHI et al., 2010; PRUNET-MARCASSUS et al., 2006; TRAKTUEV et al., 2008).

Contudo, para que as ADSC sejam consideradas células-tronco a sociedade internacional de terapias celulares (ISCT) estabeleceu alguns critérios de caracterização celular, tais como: expressão positiva de marcadores de membrana específicos de células-tronco como, CD90 (Thy-1), CD73, e CD105 (endogлина) (DHANASEKARAN et al., 2013; DOMINICI et al., 2006), expressão negativa/ausente dos marcadores específicos de linhagens hematopoiéticas CD45 e CD34 e de linhagens endoteliais, CD31 (CHURCH et al., 2014).

Um outro aspecto que deve ser considerado para caracterização das ADSC e outras fontes de células-tronco mesenquimais é a capacidade de diferenciação em linhagens celulares mesodérmica como osteoblastos (HANADA et al., 1997), condrócitos (TECHNAU et al., 2011) e adipócitos (DU et al., 2016; GIMBLE; GUILAK, 2003;), assim como linhagens celulares ectodérmica como neurônios (ABDANIPOUR; TIRAIHI, 2012; DHANASEKARAN et al., 2013; FRANCO LAMBERT et al., 2009; HUANG et al., 2007; KURIHARA et al., 2014), células da glia (ZAVAN et al., 2010) e células de Schwann (LIU, F. et al., 2013; WANG et al., 2017; XU et al., 2008).

Com relação ao tipo de ADSC, Prunet-Marcassus et al. (2006) relatou que existem diferenças entre gordura branca ou gordura marrom, sendo que a gordura branca possui maior aplicabilidade terapêutica e plasticidade que a gordura marrom, o que a torna vantajosa quando se pensa em fonte de células-tronco, quando se

almeja células com maior plasticidade e capacidade de se diferenciar em outros tecidos.

A aplicabilidade terapêutica é um ponto importante a ser considerado quando se trabalha com células-tronco como terapia regenerativa. No caso das ADSC já foi demonstrado por Cooney et al. (2016), De Lombardo et al. (2009) e Delarosa e Lombardo (2010) sua capacidade de modulação e atuação no processo de regeneração em lesões de nervo periférico. A regeneração celular induzida pelas ADSC, deve-se ao fato dessas células serem imunoprivilegiadas, por terem menor expressão de MHC I, fato este, que as tornam uma valiosa fonte de células-tronco adultas para a terapia regenerativa do sistema nervoso periférico (BAGLIONI et al., 2009; CHURCH et al., 2014; GIMBLE; GUILAK, 2003; LOCKE; WINDSOR; DUNBAR, 2009; WANKHADE et al., 2016).

A plasticidade das ADSC em se diferenciarem em células neuronais-like, ainda não se tem certeza se as células neuronais poderiam induzi-las a este processo *in vivo*, e este processo ocorreria, por um via de ativação gênica semelhante a via envolvida *in vivo* na ativação das células-tronco neurais (NSC - sigla em inglês para neural stem cell) durante a neurogênese adulta (HSIEH; ZHAO, 2016).

Desta maneira, o sistema de cocultivo com inserto (também conhecido como transwell) se torna uma alternativa menos invasiva para este estudo minucioso, que se remete a uma situação *in vivo* mimetizada *in vitro* (HRDÝ et al., 2017). No caso do estudo da ativação do processo da transdiferenciação neuronal, este sistema torna viável avaliar se as ADSC sob indução das células do sistema nervoso central se diferenciariam em células neuronais-like e se a via de ativação gênica da diferenciação se assemelharia com a via envolvida na ativação das células-tronco neurais na neurogênese adulta (HSIEH; ZHAO, 2016).

2.2. Principais genes e microRNAs (miRNA) relacionados com a neurogênese adulta, morfologia, e função dos neurônios

A neurogênese adulta engloba vários processos de regulação das células-tronco neurais, sendo que muitos deles são controlados por genes, fatores de regulação da transcrição e miRNAs (GAO et al., 2011; HSIEH; ZHAO, 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Genes, fatores de transcrição e miRNAs relacionados com a neurogênese adulta

Fonte: Adaptado de HSIEH, J.; ZHAO, X. Genetics and epigenetics in adult neurogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, Woodbury, v. 8, n. 6, art. a018911, 2016.

Legenda: Representação dos genes, fatores de transcrição e micro RNAs relacionados com a neurogênese adulta das células tronco neurais (NSC), e indicação de cada etapa desse processo.

O início da neurogênese começa com a regulação do gene *numb-like* (*Numbl*), essencial para a neurogênese adulta em camundongos (PETERSEN et al., 2002; PETERSEN et al., 2004), sendo este gene responsável pela manutenção e autorrenovação das células-tronco neurais progenitoras independentemente de sua localização e origem (PETERSEN et al., 2002; PETERSEN et al., 2004). De acordo com Petersen et al. (2002) é um dos genes que mantém o nicho de NSC.

Dentre os genes que regulam os transcritos neste início de via há o gene da proteína ligante-CpC-metil (*Mbd1*), parte da família de proteínas epigenéticas “readers” que se ligam à metilação presente no DNA em regiões específicas, auxiliando na regulação da maquinaria de transcritos (HENDRICH; BIRD, 1998). *Mbd1* auxilia na neurogênese, reduzindo os níveis de diferenciação neuronal, neurogênese desreguladas e na manutenção dos genes neuronais (JOBE et al., 2017).

Outro gene essencial, neste começo é o gene repressor elemento 1- de silenciamento de fatores de transcrição (*Rest*), um dos mais importantes no silenciamento de genes neuronais, além de estar envolvido na quiescência e proliferação das células-tronco neurais presentes no cérebro (GAO et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2016). Ademais, também atua como um repressor de fatores de transcrição de uma gama de genes codificantes e não codificantes de proteínas relacionados à função neuronal (GAO et al., 2011; OTTO et al., 2007).

Ainda no início da via tem-se o gene da subfamília do receptor nuclear 2, membro do grupo 1 (*Nre1* ou também conhecido como *Tlx*), que é um receptor nuclear de fatores de transcrição dependente de ligantes que regulam a expressão de genes críticos envolvidos com a neurogênese adulta, sendo um gene essencial na regulação da proliferação e renovação de NSC (ISLAM; ZHANG, 2015; SHI et al., 2004; SUN et al., 2007). Há também potenciador de zeste homólogo 2 (*Ezh2*), que é pouco expresso em células neuronais, porém faz parte da neurogênese adulta (NEO et al., 2014; ZHANG, J. et al., 2014), e é um dos genes determinantes da diferenciação das NSC (SHER et al., 2008; NEO et al., 2014; ZHANG, J. et al., 2014).

Entre outros genes reguladores de fatores de transcrição, há um membro da família de genes repressores, da mesma família do *Mbd1*, o metil CpG ligante de proteína 2 (*MeCP2*), que por sua vez é expresso em neurônios (SETOGUCHI et al., 2006), e geralmente está envolvido com a sinapse (CHENG et al., 2017).

No sistema nervoso central, no processo de diferenciação de NSC ocorre a regulação de proteínas no processo de *splicing* (emendar), tais como a proteína de ligação, a polipirimidina (PTBP) (VUONG, C. K. et al., 2016), que reprime *splicing* específicos de mRNAs relacionados a genes neuronais (KEPPETIPOLA et al., 2012; VUONG, J. K. et al., 2016). Consequentemente, *Ptbp1* regula a transição de NSC para neurônios (ZHANG et al., 2016).

Um dos genes mais importantes relacionados com a manutenção das células neuronais é o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) que está envolvido na neurogênese das NSC (HSIEH; ZHAO, 2016). O *Bdnf* é uma neurotrofina secretada

pelos neurônios, associada com desenvolvimento e comunicação dos neurônios e com a proteção contra estresse oxidativo (HUANG; REICHARDT, 2001; SKAPER et al., 1998; WURZELMANN et al., 2017). Além disso, auxilia no crescimento axonal no processo de diferenciação celular das NSC (YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2010). Outro gene participante do crescimento axonal é o gene da proteína associada ao conjunto de microtúbulos (*Map2*), que está principalmente presente quando ocorre a formação dos neurônios, pois ele auxilia estruturalmente na formação axonal e é essencial para a morfologia e funcionalidade neuronal (SHIMAMURA et al., 2017).

Outra proteína relacionada à regulação da neurogênese é a Mind bomb1 (*Mib1*) ubiquitina ligase, que atua no final do processo da diferenciação neuronal (OSSIPOVA et al., 2009). Adicionalmente, no final do processo de neurogênese, é ativado o gene da proteína sensível ao elemento responsivo ao cálcio (*Creb*), que está relacionado com a atividade neuronal, maturação dos neurônios e regulação da sinapse (LANDEIRA et al., 2016), e o gene codificante da proteína da família SNARE, conhecida como proteína associada do sinaptossoma (*Snap25*) (ISLAMOV et al., 2015).

No caso dos miRNAs, sabe-se que são componentes formados com 20-22 nucleotídeos, não codificantes, de fita única, que podem reprimir a expressão de genes através inibição ou degradação de mRNAs (BARTEL, 2004; ELBASHIR et al., 2001), atuar no estado de pluripotência das células-tronco (TAY et al., 2008; LI et al., 2017), e modular a neurogênese adulta (HSIEH; ZHAO, 2016). Dentre os miRNAs que regulam a neurogênese estão o miR-195, miR-184, miR-9, miR-137, miR-124 e miR-132 (HSIEH; ZHAO, 2016), que podem regular genes das NSC envolvidos no controle de proliferação, diferenciação ou na decisão do tipo celular das NSC que vão se diferenciar (HSIEH; ZHAO, 2016).

Especificamente, o miR-195 tem como o gene alvo *Mbd1*, que quando reprimido resulta na proliferação das células neuronais progenitoras, e quando há baixos níveis de miR-195 tem-se o processo diferenciação neuronal (LIU, C. et al., 2013). O miR-184 pode ter sua expressão regulada por *Mbd1*, que resulta na

repressão da expressão de *Numbl*, e ativação do estado de diferenciação das NSC (LIU et al., 2010).

Outro miRNA importante é o miR-9, que regula o receptor nuclear *Tlx* no processo de decisão celular, que fará com que a célula tronco neural se estabeleça ou não em linhagem neuronal (ZHAO et al., 2009). Enquanto, o miR-137 pode controlar a morfologia dos neurônios (SMRT et al., 2010). Esse miRNA interage com *mind bomba 1* (*Mib1*), importante para o desenvolvimento neuronal e em conjunto trabalham na regulação da maturação e morfologia dos dendritos (SMRT et al., 2010).

Parte também da regulação da neurogênese, o miR-124 atua sobre genes que estão correlacionados com a diferenciação neuronal (MAKEYEV et al., 2007), como o *Ptbp1* (HSIEH; ZHAO, 2016), e *Ezh2* em neurônios que estão começando a se diferenciar (NEO et al., 2014), sendo o mais abundante no sistema nervoso central (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). O miR-132 tem sua atuação após a especificação celular, atuando muito mais no final da diferenciação e na maturação neuronal (HSIEH; ZHAO, 2016).

2.3. Comunicação celular no processo de diferenciação celular

As comunicações celulares são úteis para o estudo da dinâmica do organismo, utilizando os componentes secretados e recebidos pelas células para o ambiente externo, como proteínas e lipídios, entre outros, que podem atuar sobre outra célula (AEBERSOLD; MANN, 2003; HAN; GROSS, 2003; YATES, 2000). Esses componentes são fortes indicadores no entendimento da população celular que os secretou, provendo respostas sobre algumas particularidades celulares, e comportamento celular (ZHANG et al., 2015). Dependendo do sinal/componente recebido pela célula, processos intracelulares são iniciados, podendo resultar em transformações químicas e físicas no nível intracelular e extracelular (SINGH; HARRIS, 2005; THERY, 2011; THÉRY et al., 2002).

Há várias vias de comunicação celular, tais como: 1) a comunicação entre células próximas (sinal autócrino); 2) por meio de junções celulares (dependente do contato celular); 3) entre células relativamente próximas a células secretoras (sinal

parácrino), por exemplo a comunicação via vesículas extracelulares (VE); 4) entre células distantes (sinal endócrino) (BOBRIE et al., 2011; BONAFEDE et al., 2016; CAMUSSI et al., 2011; DE GASSART et al., 2004; HUANG et al., 2016; VALADI et al., 2007; VLASSOV et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

2.4. Comunicação celular através de vesículas extracelulares

A comunicação celular via vesículas extracelulares, vêm recebendo grande atenção devido ao seu papel modulador na célula receptora (AKERS et al., 2015; BÁTIZ et al., 2015; CAMUSSI et al., 2011; MATHIVANAN et al., 2010; ROOJ et al., 2016; STOORVOGEL et al., 2002). As vesículas extracelulares são componentes relacionados com a participação do processo de secreção celular (BÁTIZ et al., 2015). No interior delas pode conter proteínas, lipídios bioativos, miRNAs, DNA e alguns metabolismos regulatórios (BOBRIE et al., 2011; BONAFEDE et al., 2016; CAMUSSI et al., 2011; DE GASSART et al., 2004; FITZNER et al., 2011; GONG et al., 2017; HUANG et al., 2016; MARCUS; LEONARD, 2013; VALADI et al., 2007; VLASSOV et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

Para serem classificadas como vesículas extracelulares, estas vesículas devem ser isoladas de fluidos extracelulares. Podem ser classificadas pelas proteínas presentes, por exemplo, por apresentarem proteínas específicas de membranas, citosolicas, intracelulares e extracelulares (LOTVALL et al. 2014). Ou classificadas pelo seu tamanho, por exemplo, as pequenas vesículas (exossomos) de 30-150 nm de diâmetro, as grandes vesículas (microvesículas) possuem 100-1000 nm de diâmetro (DE GASSART et al., 2004; HEIJNEN et al., 1999; VALADI et al., 2007; ZHANG et al., 2015), e os corpos apoptóticos e os oncossomos, possuem até 2µm de diâmetro (DI VIZIO et al., 2009; MORELLO et al., 2013). Ou classificadas pela sua origem, por exemplo, os exossomos são primordialmente originados dos endossomos (VLASSOV et al., 2012), já as microvesículas são originadas da membrana plasmática (VLASSOV et al., 2012).

Uma característica distintiva das VEs está em seu papel de mediador de processos de curta e longa duração (CAMUSSI et al., 2011; COCUCCHI et al., 2009;

GONG et al., 2017; GOULD; RAPOSO, 2013; HUANG et al., 2016; TAKEDA; XU, 2015; VLASSOV et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Esforços têm sido feitos visando a compreensão do papel das VEs na secreção celular, neste sentido, como ocorre a liberação das VEs e o mecanismo envolvido nesse processo, como por exemplo, se as VEs são liberadas após a ruptura celular ou por outros mecanismos mais complexos (STOORVOGEL et al., 2002). Com o avanço das pesquisas, e os estudos cada vez mais acurados das VEs, já foi observado que elas podem ter funções diversas, sendo grandes mediadores de alterações celulares, como dito anteriormente (SINGH; HARRIS, 2005; VALADI et al., 2007; VLASSOV et al., 2012).

Um estudo realizado por Souza-Schorey e Clancy (2012) mostrou que a formação da VE se assemelha aos processos de vias alternativas de secreção de substâncias regulatórias, como citocinas e interleucinas. Um dos importantes aspectos relacionados às vesículas é a secreção de substâncias que resultam na interação com células e componentes do ambiente extracelular e fluidos corpóreos, o que expande a gama de comunicação celular de forma praticamente irrestrita (AKERS et al., 2015; BASSO; BONETTO, 2016; COLOMBO et al., 2014; QUESENBERRY et al., 2015; TANG et al., 2017).

A partir do momento que uma célula libera uma vesícula extracelular, esta poderá atuar em vários locais, criando uma plataforma única para a comunicação molecular entre as populações celulares adjacentes e remotas, muitas vezes resultando em profundas alterações fenotípicas nas células receptoras após este contato com a vesícula extracelular (TAKEDA; XU, 2015).

As células receptoras podem ser estimuladas externamente pelas vesículas, com o contato e interação através das proteínas de superfície celular, ou internamente pela fusão de tais vesículas, por processos como fagocitose, macropinocitose, ou outras formas de internalização celular (ATAI et al., 2013; DEL CONDE et al., 2005; LÖSCHE et al., 2004; MULCAHY; PINK; CARTER, 2014; SVENSSON et al., 2013).

O envolvimento das VEs na comunicação intercelular levanta questões quanto à sua funcionalidade em relação às células-tronco (QUESENBERRY et al., 2015; RATAJCZAK; MIEKUS, et al., 2006; RATAJCZAK; WYSOCZYNSKI, et al.,

2006). E outra vertente é a utilização das vesículas extracelulares ao invés das células em terapias regenerativas (CAMUSSI et al., 2011; CHEN et al., 2015; QUESENBERRY et al., 2015).

2.5. Comunicação celular através de pequenas vesículas extracelulares

As pequenas vesículas extracelulares, tais como os exossomos, são primordialmente originados dos endossomos, e podem conter proteínas de fusão (GTPases), tetraspaninas (CD63), proteínas de biogênese (TSG101) (VLASSOV et al., 2012), proteína de interação Bro1/ALG-2 (ALIX) (FRIAND et al., 2015) e lipídios, sendo possível a detecção de tais proteínas por técnicas como western blotting e ELISA (VLASSOV et al., 2012). Além disso, os marcadores de membrana das pequenas vesículas extracelulares são como uma marcação da célula de origem, podendo ser utilizados como biomarcadores (MULLER, 2012).

Já foi demonstrado com êxito que nos exossomos há fatores que podem modificar o fenótipo das células receptoras, assim como o microambiente em que as envolve. Do ponto de vista das células-tronco, estas podem responder de forma única à comunicação celular, o que auxilia em sua manutenção, diferenciação e contato com os demais tipos celulares (QUESENBERRY et al., 2015).

Terapias com células-tronco têm possibilitado respostas imunomoduladoras entre a célula e o tecido de regeneração, mas buscam-se métodos mais seguros que possibilitem uma melhor resposta terapêutica. Como alternativa vem-se estudando a sinalização celular parácrina, sendo que as pequenas vesículas extracelulares são componentes importantes desta via, contribuindo de forma única com a ação de uma célula sob outra no envio de informações, por exemplo, entre células-tronco e células de tecidos lesionados (HAN et al., 2016).

A análise do conteúdo de tais vesículas (que pode conter proteína, lipídios e ácidos nucleicos) talvez possa ajudar a entender a origem de tais vesículas, e de como as células utilizam esse meio de comunicação, e como isso pode influenciar na modificação do microambiente em que elas estão inseridas (KALANI et al., 2014). Por exemplo, um estudo mostrou que os exossomos originados das ADSC possuem

capacidade neuroprotetora semelhante à realizada pelas próprias células-tronco de origem (BONAFEDE et al., 2016).

Além disso, a comunicação celular é bidirecional (QUESENBERRY et al., 2015), por exemplo, um tecido lesionado que recebeu pequenas vesículas extracelulares originadas de células-tronco pode liberar vesículas que possuem material biológico correlacionados ao estresse (COLLINO et al., 2010), à angiogênese (QUESENBERRY et al., 2015), à neurogênese (BÁTIZ et al., 2015), e fatores capazes de auxiliar na ativação da atividade celular regenerativa, podendo ativar mecanismos que auxiliam na reconstituição tecidual, ampliando a gama de possíveis alternativas terapêuticas para a regeneração tecidual, como de tecidos do sistema nervoso (BÁTIZ et al., 2015; CAMUSSI et al., 2011).

2.6. Modulação das vesículas extracelulares no sistema nervoso

Como proposta de terapia com vesículas extracelulares, é sugerida sua utilização no auxílio no tratamento de doenças do sistema nervoso devido sua plasticidade e resposta ao meio em que são direcionados, e a capacidade de carregar componentes e entregá-los de forma única protegendo o conteúdo de todo o meio externo (CHOPP; ZHANG, 2015; HAN et al., 2016). No sistema nervoso, tais transportadores podem auxiliar no desenvolvimento axonal, modulação sináptica e regeneração de tecido no sistema periférico (LAI; BREAKEFIELD, 2012). Por outro lado, há a ressalva que os exossomos podem ser mediadores de doenças neurodegenerativas, podendo ser o responsável por carrear partículas como príons e beta amiloides (KALANI et al., 2014; QUEK; HILL, 2017).

Componentes presentes nas vesículas extracelulares possuem um papel ímpar, dentre eles pode-se citar miRNAs e mRNAs, que modulam na célula receptora a nível gênico. Ressaltando que os miRNAs podem modular vários fatores de transcrição relacionados com ativação de genes de pluripotência, podendo desencadear mudanças epigenéticas (CAMUSSI, 2017; CAMUSSI et al., 2011; QUESENBERRY et al., 2015).

Estudos demonstraram que miRNAs estão relacionados com a regeneração do sistema nervoso, podendo ser carreados por VEs. Um exemplo é o miR-133b de

origem de células-tronco que é transportado via VEs aos neurônios e astrócitos (XIN et al., 2013).

Outros miRNAs como o miR-302 e miR-367, junto com miR-9 e miR-124, podem induzir fibroblastos a se transdiferenciarem em células neuronais (ZHOU et al., 2015). Os miR-195, miR-184 e miR-9 podem regular a neurogênese do nicho células-tronco neuronais presentes na zona subventricular a se diferenciarem em células neuronais maduras (HSIEH; ZHAO, 2016). Adicionalmente, foi demonstrando que miR-9 regula o receptor nuclear *Tlx*, resultando na migração e diferenciação das células neuronais progenitoras no início do desenvolvimento (ZHAO et al., 2009). Porém, estudos que comprovam que estes podem ser transportados via vesículas para a regulação desta via ainda são necessários.

Experimentos com células-tronco da medula óssea (BMSC - da sigla em inglês para bone marrow stem cell) cocultivadas com insertos em conjunto com células pulmonares, demonstraram que as BMSC expressaram miRNAs característicos de células pulmonares, o que sugere que talvez exossomos de tais células formem uma via de interação bidirecional, conforme relatado anteriormente, frisando desta maneira a amplitude de possibilidade terapêutica deste componente celular (ALIOTTA et al., 2007).

Estudos com astrócitos corticais relatam que os exossomos destas células carregam sinapsina I que se liga com a molécula de adesão celular neuronal (NCAM), auxiliando no controle de neurites, e na resposta à inflamação no sistema nervoso central (WANG et al., 2011). Especificamente, em neurônios os exossomos ajudam na despolarização e neurotransmissão (CHIVET et al., 2014).

2.7. Utilização de células-tronco na terapia regenerativa de lesão de nervos periféricos

Os nervos periféricos possuem três grandes conjuntos de componentes: o tecido conjuntivo que recobre todo o nervo, os axônios e as células de Schwann que dão o suporte aos axônios (GRANT; GOODKIN; KLIOT, 1999). Os axônios são recobertos com a bainha de mielina que auxilia na principal função, a passagem do impulso nervoso (GRANT; GOODKIN; KLIOT, 1999).

A principal consequência das lesões de nervo periférico (PNI - sigla em inglês para *peripheral nerve injury*) é a perda definitiva da função do membro ou local afetado, sendo que muitas vezes o uso de transplante de nervo do próprio paciente, assim como a utilização de biomateriais em conjunto ou não com células-tronco, se tornam uma alternativa na busca da regeneração e retorno da função (BUENO et al., 2017; COONEY et al., 2016; GÄRTNER et al., 2014; HEI et al., 2017; MARCONI et al., 2012; ZHANG, T. et al., 2014; WANG et al., 2010; WANG et al., 2017).

Há três principais classificações de lesão de nervo periférico, segundo Seddon 1972 a saber: neuropraxia, quando há perda motora e sensitiva sem alteração na estrutura do nervo; axoniotmese, que são lesões por esmagamento ou qualquer força que atue alterando a morfologia e a continuidade das fibras nervosas, permanecendo as células de Schwann; e a neurotmease, quando há a separação total do nervo, com desorganização do axônio, podendo ter fibrose tecidual, sendo que para que haja recuperação deve-se passar por procedimento cirúrgico (SEDDON, 1972)

No caso da neurotmease o axônio inicia o processo de degeneração, sendo que nas fibras distais há o processo de degeneração walleriana (LEE; WOLFE, 2000). A reconstrução a fim de reconectar as partes proximais e distais do nervo periférico em caso de secção total pode ser imediata, ou demorar de três meses a dois anos, dependendo do grau e ambiente em que a lesão está (ROBINSON, 2000). A atrofia muscular é a mudança mais evidente após a lesão nervosa, além da perda de função sensitiva e motora.

As MSC são uma alternativa de terapia celular para a regeneração de lesões de nervos periféricos, como o nervo ciático, assim como para a regressão do processo de degeneração walleriana, degeneração específica que ocorre no sistema nervoso periférico (COONEY et al., 2016; GÄRTNER et al., 2014; MARCONI et al., 2012; MATTHES et al., 2013; WANG et al., 2010). Recentemente pesquisadores utilizaram ADSC em conjunto com matriz de fibrina (REICHENBERGER et al., 2016), ou ADSC diferenciadas em conjunto com condroitinase (JIANG et al., 2015), ou

aplicação sistema de ADSC (MARCONI et al., 2012) e todos estes estudos comprovam que as ADSC tanto indiferenciadas quanto diferenciadas auxiliam de forma significativa na regeneração de lesão de nervo periférico após um trauma.

A aplicação de ADSC indiferenciadas de acordo com Kingham et al. (2014) em lesões de nervos periféricos vem sendo estudada e utilizada, e os principais resultados observados no local da lesão são a regeneração de axônios e formação de mielina (KINGHAM et al., 2014 SOWA et al., 2016). Adicionalmente, ao utilizar este tipo de células-tronco há uma redução do processo de atrofia nos músculos relacionados com a função do nervo periférico lesionado (CARLSON et al., 2011), e a população de ADSC pode permanecer por quatro semanas sem se diferenciarem (SOWA et al., 2016) com capacidade de secretar fatores neurotróficos e angiogênicos (KINGHAM et al., 2014), com atuação de forma efetiva e a longo prazo na regeneração. Neste trabalho foi proposto avaliar de forma pioneira, se as ADSC diferenciadas devida a indução de neurônios, sob o sistema de cocultivo, em linhagens neuronais, resultariam em melhoras na lesão conforme relatado anteriormente.

3 HIPÓTESE GERAL

Exossomos das células do sistema nervoso central transmitem informações para as ADSC, que induzem a transdiferenciação das mesmas em células neuronais-like, e estas células transdiferenciadas auxiliam no reparo de lesões no sistema nervoso periférico.

3.1 Hipótese de cada estudo:

Hipótese do Estudo 1 - “Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”

Em cocultivo as células do sistema nervoso induzem as ADSC a diferenciação em células neuronais-like.

Hipótese do Estudo 2 - “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”

Há o mecanismo mediado por vesículas extracelulares (microvesículas e exossomos), o que aumenta a comunicação celular e auxilia no processo de diferenciação celular.

Hipótese do Estudo 3 - “Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”

A aplicação ADSC diferenciadas, *in vivo* tem função de auxílio na regeneração de lesões em nervos periféricos.

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi compreender a comunicação celular mediada por vesículas extracelulares na transdiferenciação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em cocultivo com células neuronais. Adicionalmente, avaliar se após o cocultivo as células-tronco transdiferenciadas possuíam funcionalidade *in vivo* em lesões periféricas do sistema nervoso, utilizando o murino como modelo animal.

4.1 Objetivos específicos

1. Avaliar se as células-tronco do tecido adiposo têm capacidade de se transdiferenciar em células neuronais-*like in vitro*, devido à indução das células do sistema nervoso central em cocultivo, e em que tipos celulares elas se diferenciam.
2. Avaliar se há a comunicação celular através dos exossomos, entre uma célula sem multipotência com uma célula multipotente.
3. Avaliar se as células do tecido adiposo transdiferenciadas *in vitro* podem *in vivo* auxiliar na regeneração de lesões periféricas do sistema nervoso, e se possuem funcionalidade.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 18/11/2015 protocolada sob o CEUA nº 7347240915 (ANEXO A). Foi utilizado como modelo animal os camundongos isogênicos C57/BL e FVB, com mais de dois meses de idade, de ambos os sexos, com peso médio de 15 g a 20 g.

Dividiu-se este trabalho em três etapas denominadas aqui de estudos (Figura 2), sendo que os estudos estão correlacionados com a hipótese central do trabalho que foi testada e avaliada.

Estudo 1 - “Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”. Nele foi verificado se as ADSC em cocultivo (ADSC-CC) poderiam se transdiferenciar devido à indução das células neuronais (BRC), em cocultivo com insertos, assim como foi avaliado se a via gênica da transdiferenciação neuronal seria semelhante à via de neurogênese adulta. Estudo 2 - “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”. Neste estudo foi verificado qual o papel das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação devido à indução dos neurônios sob as ADSC-CC em cocultivo com insertos. Estudo 3 - “Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”. Neste estudo foi verificado se as ADSC-CC teriam alguma funcionalidade in vivo em lesão de nervo periférico. ADSC-CC – Células-tronco derivadas do tecido adiposo em cocultivo; BRC- neurônios; CC- cocultivo.

Figura 2 - Delineamento experimental.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Estudo 1 - "Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos". (B) Estudo 2 - "Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação". (C) Estudo 3- "Teste in vivo da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico".

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Estudo 1- “ Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos ”

Neste estudo, foram isolados os neurônios (BRC) e ADSC a partir do cultivo do tecido adiposo, utilizando como modelo animal o murino (*Mus musculus*) C57 ou FVB, ambos os sexos, com idade aproximada de dois meses e peso variando de 15 g a 20 g. Em seguida foi realizado o cocultivo utilizando insertos, sendo que os neurônios foram adicionados no inserto e as ADSC na placa de cultivo. Após o cocultivo as ADSC passaram a ser denominadas no decorrer deste estudo e nos seguintes como ADSC-CC (ADSC-cocultivadas). Foram avaliadas as ADSC-CC por três momentos: três (D3), sete (D7) e 14 (D14) dias de cocultivo. Foram utilizadas como controle as BRC e ADSC isoladamente durante os três momentos avaliados (Figura 3).

Figura 3 – Modelo esquemático experimental do Estudo 1 “Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) A capacidade de transdiferenciação das ADSC-CC foi avaliada *in vitro* durante três períodos (três, sete e 14 dias), (B) utilizando as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo para as proteínas TUBIII e SNAP25, assim como foram quantificados alguns transcritos relacionados com a morfologia neuronal e função neuronal, e neurogênese adulta.

6.1.1 Isolamento de neurônios e cultivo primário

Foram isolados os neurônios de acordo com protocolo pré-estabelecido (LIU, F. et al., 2013), com algumas modificações. Em resumo, o cérebro foi lavado com PBS (sigla em inglês para Phosphate-Buffered Saline, Solução tampão fosfato, 10010049, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) pH 7,2-7,4 com 1% de penicilina/estreptomicina, para reduzir potenciais contaminantes, foi removida a parte mais externa do cérebro, considerada contaminada, e a parte mais interna foi exposta. Pequenos pedaços do hipocampo foram isolados, e colocados na placa de Petri com PBS, e manualmente triturados, e transferidos para tubo tipo falcon de 15 mL, centrifugado durante cinco minutos a 1300 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi removido e pellet ressuspendido em meio Dulbecco Modified Eagle Médium (DMEM) com elevado teor de glicose suplementado com 10% KnockOut™ Serum Replacement (10828028, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e 1% penicilina/estreptomicina (1000U; PAA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Posteriormente, as células foram transferidas para um frasco de cultura com 75 cm² e incubadas em condição atmosférica de 5% de CO₂ a 38,5°C.

Durante o cultivo, o meio foi renovado a cada três dias. No dia dez os neurônios começaram a se aderirem a placa de cultivo. Neste momento, as células foram tripsinizadas e submetidas ao cocultivo com as ADSC em placas de 12 poços (401 mm²) com repetições técnicas (N=3) e biológicas (N=7).

6.1.2 Isolamento de células-tronco do tecido adiposo e cultivo primário

O protocolo utilizado foi baseado em Monaco et al., (2011), porém com adaptações para o modelo animal. O tecido adiposo da região intercostal foi isolado e lavado com Solução tampão fosfato (PBS - sigla em inglês para Phosphate-Buffered Saline, 10010049, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) pH 7,2-7,4 contendo 1% de antibióticos para que potenciais contaminantes fossem removidos. O tecido foi manualmente triturado com o auxílio da lâmina de bisturi e seguiu para digestão com collagenase tipo I 0,075% (17100017, Gibco® life Technologies, Waltham, Massachusetts, EUA) em PBS incubado a 38,5 °C durante uma hora e 30 minutos, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e

o pellet ressuspensionado em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM – sigla em inglês) com elevado teor de glicose suplementado com 10% KnockOut™ Serum Replacement (10828028, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e 1% penicilina/estreptomicina (1000U, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), e transferido para um frasco de cultivo primário de 75 cm². As células foram incubadas em 5% CO₂ e 38,5°C. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias, até que atingissem a confluência de 70%, para então serem tripsinizadas e iniciar o cocultivo com as células neuronais em placas de 12 poços com repetições técnicas (N=3) e biológicas (N=7).

6.1.3 Caracterização da célula-tronco do tecido adiposo

Unidade formadora de Colônia -UFC

Foi avaliado a capacidade de formação de colônia, com 10³ ADSC em uma placa de 100 mm, onde tais células foram mantidas em cultivo com troca de meio a cada três dias, até atingir colônias com mais de 50 células. Então ADSC/colônias foram fixadas em 4% de paraformaldeído e corada com cristal de violeta por 15 minutos, para contagem e documentação.

Diferenciação Neuronal com indutor químico

Foi seguido o protocolo já estabelecido por Ercolin et al., (2016). Em resumo 3x10⁵ ADSC foram plaqueadas em placas de seis poço até atingirem a confluência de 70%. Em seguida, foi adicionado 0,5 µL de monoetilglicerol (3-mercaptopropanediol, M6145, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por poço e 24 horas depois foi avaliado por imunocitoquímica para SNAP25, com intuito de verificar se tais células se diferenciaram em neuronais-*like*.

Citometria de fluxo para marcadores de células-tronco mesenquimais

Para a caracterização imunofenotípica ADSC foram cultivadas em meio de cultivo e então caracterizadas pela presença de marcadores de superfície CD90 (CD90-anti-goat (igG) sc6071, Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA), CD44 (MCA 1082GA, AbD, Serotek, Raleigh, NC, USA), CD86 (NB100-77815, BD Pharmingen,

San Jose, CA, USA) e MHCI (MCA1086GA. AbD, Serotek, Raleigh, NC, USA). As células foram aliquotadas em 1×10^5 células/mL. O bloqueio foi feito com 5% de BSA (Bovine serum albumin, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), em PBS com pH 7,2-7,4, durante 30 minutos. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo primário por pelo menos 10 horas na concentração de 1:100. Na etapa seguinte, foram realizadas três lavagens com PBS com pH 7,2-7,4, por cinco minutos, e incubação por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário (1:500 Alexa Fluor 594 donkey anti-goat, A11058, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA; ou Goat anti-mouse FITC, Policlonal goat anti-mouse (ab)2, F0479, Dako, Dallas, Texas, EUA) e novamente foi realizada uma etapa com três lavagens com PBS. Então as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Aria Cell Sorter) com o software DiVa V.6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os filtros utilizados no equipamento acima foram ajustados para a luz de emissão do fluorocromo FITC (525 nm).

6.1.4 Cocultivo com insertos

As células (BRC e ADSC-CC) foram cocultivadas utilizando a técnica de cocultivo com insertos (Figuras 4) já estabelecida em outros estudos (BAHMANI et al., 2014; KURODA et al., 2015; ROBALLO et al., 2013). As BRC foram colocadas na membrana de 400 nm de porosidade (ThinCerts™, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) e as ADSC nas placas de cultivo conforme as figuras a seguir (Figuras 4 e 5), sendo que a porosidade não permitiu a passagem de células, apenas seus componentes, por exemplo, de pequenas vesículas extracelulares que possuem 40–120 nm de diâmetro.

Como as ADSC têm alta taxa de proliferação, e as BRC não, no dia zero utilizou-se no cultivo uma maior quantidade de BRC, permitindo que durante o período estudado houvesse um equilíbrio em relação à quantidade celular.

Foram colocados 10^5 BRC/mL e 10^4 ADSC/mL no cultivo inicial. Após a indução a transdiferenciação das células-tronco foi avaliada por meio da imunocitoquímica, citometria de fluxo e por expressão gênica (RT-qPCR).

Adicionalmente, foi analisado em que período foi observado a maior taxa de transdiferenciação das ADSC-CC em células neuronais-*like*.

Figura 4 - Cocultivo com insertos

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Cocultivo com insertos na placa de 12 poços. (B-C) Inserto (transwell) dentro do poço da placa de 12 poços. (D) Inserto na placa sem o contato físico entre as células cocultivadas. As setas pretas indicam o inserto que foi utilizado para a realização do cocultivo.

6.1.5 Imunocitoquímica

O protocolo utilizado foi descrito previamente por Roballo et al., (2016). Em resumo, as ADSC-CC foram cocultivadas por três, sete e 14 dias e foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS com pH 7,2-7,4, durante 15 minutos. Para evitar reações inespecíficas foi realizado bloqueio com BSA a 1% em PBS com 0,5% de tween (TWEEN® 20, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) durante uma hora à temperatura ambiente (ou overnight a 4°C). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS por três minutos e 1% de Triton X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA) em PBS foi adicionado durante 30 minutos. Na etapa seguinte, o anticorpo primário foi adicionado (1:500 rabbit polyclonal anti-beta tubulin III ab18207, Abcam; Cambridge, Reino Unido; 1:400 goat polyclonal anti-Snap25 SC-7538, Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA), e incubado por pelo menos 10 horas a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário (1:1000 goat Anti-Rabbit FITC ab6717, Abcam; Cambridge, Reino Unido; ou 1:1000 rabbit Anti-goat Alexa Flour 488, A11078 ou 1:500 donkey anti-goat Alexa Fluor 594, A11058, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) durante uma hora à temperatura ambiente. Além disso o núcleo foi marcado com solução de Hoechst (Trihydrochloride, Trihydrate, 33342, Invitrogen, Calsbad, CA, USA) ou DAPI (sigla para 4',6-Diamidina-2'-fenilindole dihidroclorido). As imagens foram capturadas com o microscópio fluorescente (AXIOVISION 4.7.1. Carl Zeiss). As BRC e ADSC (sem cocultivo) foram utilizadas como células para o controle positivo e negativo, respectivamente, deste protocolo (APÊNDICE A). Neste experimento foram realizadas repetições técnicas (N=3) e biológicas (N=7).

6.1.6 Quantificação de células imunopositivas na imunocitoquímica

A porcentagem de células positivas para os marcadores TUBIII ou SNAP25 foi obtida por meio da contagem de células positivas e negativas aos marcadores. Cinco campos foram escolhidos aleatoriamente na magnificação de 10X, de pelo menos 4 lamínulas nos quais as células foram cultivadas em cima durante o experimento, até que fosse atingida uma quantidade de 500 células contadas. Esse

procedimento foi repetido com sete replicatas biológicas e três técnicas para cada marcador pelo programa Image J. Essa metodologia foi adaptada de outros estudos semelhantes ao apresentado aqui (DARVISHI et al., 2017; NAGHDI et al., 2009).

6.1.7 Citometria de fluxo

As ADSC-CC que foram cocultivadas por três, sete, 14 dias foram dissociadas com tripsina e permeabilizadas com 1% de Triton X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA) em PBS com pH 7,2-7,4, durante 20 minutos. O bloqueio foi feito com 5% de BSA em PBS com pH 7,2-7,4, durante 30 minutos. As células foram incubadas com o anticorpo primário (1:500 Rabbit polyclonal anti-beta tubulin III ab18207, Abcam; Cambridge, Reino Unido; 1:400 goat polyclonal anti-Snap25 SC-7538, Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA) overnight a 4°C. Após esta etapa, seguiram-se três lavagens com PBS com pH 7,2-7,4, por cinco minutos e uma incubação durante uma hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário (1:1000 Goat Anti-Rabbit FITC ab6717, Abcam; Cambridge, Reino Unido; ou 1:1000 rabbit Anti-goat, Alexa Flour 488, A11078 ou 1:500 Alexa Fluor 594 donkey anti-goat, A11058, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e, por fim, fixadas em 4% de paraformaldeído durante 12 minutos. A quantificação de células positivas foi realizada utilizando FACS Aria Cell Sorter com o software DiVa V.6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os filtros foram ajustados para a emissão de 525 nm para FITC, 488 nm para Alexa flour 488 nm e 470 nm para DAPI fluorochromos. As análises foram feitas utilizando o Software FACS Express. Células neuronais e ADSC não cocultivadas foram utilizadas como controle positivos e negativos, assim como células sem marcação para o controle. Nesse experimento foram realizadas repetições técnicas (N=3) e biológicas (N=7).

6.1.8 RT-qPCR

Extração do RNA total para análises do RNA mensageiro e microRNA

O total de RNA foi isolado das células cocultivadas (ADSC-CC), das células controle (BRC e ADSC-sem cocultivo) utilizando TRIzol LS (Life Technologies,

Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações. As células foram lisadas com 200 µL de TRIzol e 8 µL de acrilamida (Amresco, Solon, Ohio, USA) homogeneizadas por cinco minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 128 µL de clorofórmio para separação em fase do RNA/DNA/proteína, e novamente foram homogeneizadas por cinco minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos a 20000xg a 4°C para separar as fases. Após essa etapa, a fase aquosa, na qual encontra-se o RNA, foi coletada e transferida para um microtubo estéril e em seguida, adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado. Imediatamente, a amostra foi incubada a -80°C overnight para a precipitação do RNA. No dia seguinte, foram centrifugadas a 20000xg por 10 minutos a 4°C e o pellet obtido foi lavado duas vezes com etanol 75% e ressuspensos em 10-20 µL de água sem RNase. A quantificação do RNA foi realizada pelo espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A determinação da relação de pureza do RNA foi medida pela relação da absorbância 260/280nm. As amostras com pureza entre 1,2 e 2,0 foram utilizadas no experimento, sendo estocadas a -80°C até a realização do RT-qPCR.

Transcrição reversa do RNA mensageiro e PCR quantitativo em tempo real

Após a extração do RNA, a transcrição reversa do RNA mensageiro foi feita com o kit Enzima Transcriptase reversa superscript III (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), segundo recomendações do fabricante. A amplificação do cDNA foi realizada utilizando-se os pares de primers desenhados ou então referenciados contidos na tabela 1. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador ABI-7500 utilizando-se o kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Todos os genes considerados para uma dada amostra foram amplificados utilizando uma placa de PCR. Previamente ao início das análises, as condições de amplificação (por exemplo: concentração de primer, temperatura de anelamento, etc.) foram testadas para a otimização da reação. A reação foi submetida inicialmente a uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, depois 55 ciclos de 95°C por 15 segundos, um ciclo de 60°C por 1 minuto, um ciclo de 95°C por 15 segundos, um ciclo de 60°C por 1 minuto e um ciclo

de 95°C por 15 segundos. Os valores de Ct foram normalizados utilizando a média geométrica das replicatas técnicas e biológicas do gene endógeno *Gapdh* (sigla em inglês para Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). A expressão foi calculada usando o método de $2^{-\Delta Ct}$. Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas técnicas.

Tabela 1 - Primers utilizados no RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Referência
<i>Gapdh</i>	TGACATCAAGAAGGTGGTGAAGC	CCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	Oh et al. (2014)
<i>Map2</i>	AGCCGCAACGCCAATGGATT	TTTGTCTGAGGCTGGCGAT	Oh et al. (2014)
<i>Snap25</i>	AGAATCGCCAGATTGACAGG	ACCACTTCCAGCATCTTTG	Han et al. (2014)
<i>Numb1</i>	GGGGACAAGAAGAAAGCCGA	TCCCTCTCTCCAGGGGATG	NM_010950.2
<i>Rest</i>	TCGCCACTTGGTGAATGTGT	CAAAGTCTGCACGGTGCTTC	NM_011263.2
<i>Ezh2</i>	TCCATGCAACACCCAACACA	CCTTAGCTCCCTCCAGATGC	NM_001146689.1
<i>Ptbp1</i>	TCGACTTCTCCAAGCTCACC	ACGGAGAGGCTGACATTATGC	NM_001077363.2
<i>Bdnf</i>	TCTTTTCCGAGGTTCCGGCTC	CTCACTGGTGGAACCGGAG	NM_001285416.1
<i>Mib1</i>	TATACTGCCTTGCACTGGC	GCACGGACCAAAAGCCTAC	NM_144860.2
<i>Creb</i>	ACAAGCGAAACCAACAACCAT	CGTCTGAGGCTGGTTCA TGT	NM_001025432.1
<i>Mbd1</i>	CGCCAGTGATCACGGAGATT	GCTTTTCAGCCACAAAAGAATGT	NM_013594.2
<i>Tlx</i>	GCACAACCAATAGCCACCTG	AAATGCGGCTTGTGATCCG	NM_152229.2
<i>MeCP2</i>	CTGTAGACCA GCTCCAACAGG	CTGCAGAA TGGTGGCTGAA	NM_010788.4

Fonte: Própria autoria.

Transcrição reversa do microRNA e PCR quantitativo em tempo real

No caso dos miRNAs foi utilizado o kit miScript Polymerase Chain Reaction (PCR) System (num. 218193, Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de 100 ng de RNA total foi incubado com cinco vezes de tampão miScript HiFlex, dez vezes miScript nuclei acids mix, água

RNase-free, e miScript Reverse Transcriptase a 37°C por uma hora, e 95°C por cinco minutos. A quantificação de transcritos de seis miRNAs envolvidos com os genes avaliados (Tabela 2), incluindo três miRNAs endógenos, foi realizada nas ADSC-CC, BRC e ADSC dos períodos de três e sete dias. Foram utilizados os bta-miRNA que possuem grande homologia com os mmu-miRNA conforme tabela 3 apresenta. As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µL contendo 2X Quantitec SYBR Green (Qiagen, Hilden, Alemanha), 10 µM do primer reverso Universal (Qiagen, Hilden, Alemanha), 10 µM do primer forward específico para miRNA (Tabela 2), e 1 µL do cDNA diluído 1:10. As reações foram analisadas utilizando-se o QuantStudio 6 Flex PCR System. O ciclo da reação utilizado foi uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 30s e 70°C por 30s e a amplificação foi confirmada mediante análises da curva de dissociação. Os valores de Ct foram normalizados utilizando a média geométrica de RNU43 snoRNA e Hm/Ms/Rt U1 snRNA. A expressão foi calculada usando o método de $2^{-\Delta Ct}$. Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas técnicas.

Tabela 2 - MiRNAs de murino e seus genes alvo

mmu-miRNA	Sequência	Gene alvo
miR-195a-5p	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	<i>Mbd1</i>
miR-184-3p	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU	<i>Numbl</i>
miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	<i>Tlx, Rest</i>
miR-137-3p	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	<i>Ezh2, Mib1</i>
miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	<i>Ptbp1</i>
miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	<i>MeCP2, Creb</i>

Fonte: Própria autoria.

Tabela 3 - MiRNAs de murino analisados

bta-miRNA	Sequência	m m u-miRNA	Sequência	Homologia (%)
miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG	miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAU GA	95,65
miR-124a	UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	86,95
miR-132	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUC G	100
miR-137	UUUUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	miR-137-3p	UUUUUGCUUAAGAAUACGCGU AG	100
miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGGU	miR-184-3p	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGG U	100
miR-195	UAGCAGCACAGAAAUUUGGCA	miR-195a-5p	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC	95,45

Fonte: Própria autoria.

6.1.9 Análise Estatística

Os dados da quantificação de células positivas pela imunocitoquímica e citometria de fluxo, assim como a quantidade de transcritos (mRNAs e miRNAs), foram analisados pelo teste paramétrico de comparação das variâncias (ANOVA) e as médias foram comparadas mediante ao teste Tukey, quando houve significância estatística na ANOVA. O nível de significância considerado em todos os testes foi $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.

6.2 Estudo 2- “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”

No estudo 2, “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”, as vesículas extracelulares do cocultivo e vesículas extracelulares das células controles (BRC e ADSC) foram isoladas e analisadas, pela caracterização em relação à morfologia, concentração, e alguns componentes que poderiam estar sendo carregados pelas vesículas, tais como a proteína SNAP25, e os miRNAs: miR-195, miR-184, miR-9, miR-137, miR-124 e miR-132. A figura abaixo demonstra graficamente como se procedeu o estudo 2 (Figura 5).

Figura 5 - Modelo esquemático experimental Estudo 2- “Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) A comunicação via vesículas extracelulares que poderiam estar presentes no cocultivo foi avaliada de forma a tentar compreender como seria este mecanismo, (B) pela caracterização em relação à morfologia, concentração, e conteúdo internos, assim como pelo rastreamento das mesmas no cocultivo, e avaliação de transcritos das ADSC que foram induzidas à transdiferenciação via VEs das células neuronais.

6.2.1 Caracterização das Vesículas Extracelulares do Cocultivo

Isolamento de vesículas extracelulares do meio de cultivo

As vesículas extracelulares foram isoladas do meio de cultivo das BRC, ADSC e do meio do cocultivo de todas as replicatas técnicas e biológicas do estudo 1 e deste estudo.

O protocolo de isolamento foi adaptado do proposto por Connolly et al., (2015). O meio de cultivo foi centrifugado a 300xg por dez minutos, retirou-se o sobrenadante que foi centrifugado a 2000xg por dez minutos, e novamente o sobrenadante foi centrifugado a 16500xg por 30 minutos. O pellet formado após esta

centrifugação continha as vesículas extracelulares grandes (aqui denominadas de MV-microvesículas). Na sequência. Seguiu-se com uma filtração com filtro estéril de 0,22 μm (filtro Steritop– Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) e foi adicionado o Exosome Precipitation Solution ExoQuick- TC™ (System Biosciences-SBI, San Francisco, Califórnia, USA) de acordo com as recomendações do fabricante para o isolamento das pequenas vesículas extracelulares (aqui denominadas de Exo, exossomos) (Figura 6). Os pellets contendo as vesículas extracelulares foram estocados a -80°C , para análises e experimentos posteriores.

Figura 6 - Isolamento das pequenas vesículas extracelulares (Exo) através do ExoQuick

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Exoquick (B) foi adicionado no meio de cultivo previamente centrifugado. (C-D) Pellet formado após a centrifugação, contendo as pequenas vesículas extracelulares. As setas indicam o pellet formado após a utilização do ExoQuick.

Microscopia Eletrônica de transmissão para análise da morfologia das vesículas extracelulares isoladas

A análise morfológica das VEs foi realizada pela microscopia eletrônica de transmissão. Inicialmente as VEs foram isoladas e fixadas em 2,5% de glutaraldeído, com 0,1 M de cacodilato e paraformaldeído a 4%, pH 7,2-7,4 por duas horas à

temperatura ambiente, seguido de uma ultracentrifugação de 100.000xg por uma hora e 20 minutos para retirada do fixador. Em seguida, foi adicionado 4 mL de água ultrapura e nova etapa de ultracentrifugação a 100.000xg por uma hora e 20 minutos. Seguidamente, o pellet foi diluído em pelo menos 100 µL de água ultrapura e o material foi colocado na grade de cobre revestida com *pioloform* por cinco minutos, cujo excesso foi retirado com papel de filtro úmido. Imediatamente a grade foi colocada em uma gota de acetato de uranila aquosa a 2% por três minutos. Retirou-se novamente o excesso com papel de filtro úmido, e procedeu-se a leitura em microscópio eletrônico de transmissão FEI de 200 kV, modelo Tecnai20, emissor LAB6.

Análise do tamanho e concentração das vesículas extracelulares

O tamanho e a concentração das vesículas extracelulares isoladas do meio de cultivo das BRC e das ADSC aos três e sete dias de cultivo e das isoladas do cocultivo (MV-CC ou Exo-CC) no mesmo período foi mensurado através do Nanosight.

O NanoSight LM10-HS (Malvern instrument, Alabama, USA) foi utilizado seguindo o protocolo de outros estudiosos (HUNG; LEONARD, 2016). Com um laser de 405 nm e o NanoSight NTA software v2.3, e os vídeos de cada amostra foram feitos com a câmera no nível 14 a 38,5°C, calibrando com 100 nm de beads (Malvern instrument, Alabama, USA) para garantir a acurácia do equipamento. VEs foram diluídas em PBS (1:100) e foram colocadas manualmente no nanosight (300 µL), uma amostra por vez, e cinco vídeos de 30 segundos por amostra foram gravados. A concentração das partículas foi definida como a média da concentração encontrada nos cinco vídeos, e o próprio software desconsiderou as vesículas de tamanhos inferiores ao esperado.

Western Blotting com anticorpos específicos para proteínas específicas de exossomos e SNAP25

As proteínas originadas das vesículas extracelulares e das células foram isoladas com solução de RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e então foram transferidas para o gel com 8% de poliacrilamida SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, Califórnia USA). As amostras correram a 100 volts por duas horas, e então o gel foi colocado junto com a membrana de nitrocelulose (Biotrace NT, Pall life Sciences, Pensacola, Florida, USA) para a transferência por 30 minutos a 25 volts semi-seco. Em seguida a membrana foi incubada em solução de bloqueio (5% BSA, em TBST - sigla em inglês para Tris Buffered Saline, solução tampão salina tris com Tween® 20) por aproximadamente uma hora em temperatura ambiente. Após este período o anticorpo primário goat polyclonal anti-Alix (0,5 µg/mL, SC-49267, Santa Cruz Dallas, Texas, EUA) ou rabbit polyclonal IgG CD63 (0,5 µg/mL, SC-15363, Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA) ou goat polyclonal anti-Snap25 (1:800 SC-376713, Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA) foi adicionado e incubado por pelo menos 10 horas a 4°C. Seguidamente, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos em 1X TBST (Tris-buffered saline, 0,1% Tween® 20), seguindo por incubação de uma hora com o anticorpo secundário (1:3000, donkey anti-goat IgG-HRP- SC-2020, Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA, ou 1:3000 anti-rabbit, #7074S, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA). Prosseguiu-se com as lavagens (3X) das membranas em 1X TBST por cinco minutos e acrescentou-se o *ECL Plus Prime Western Blotting Detection System solution* (Amersham™, Buckinghamshire, UK) para a revelação, possibilitando a captura da imagem e análise das bandas pelo ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA).

6.2.2 Rastreamento das vesículas extracelulares

Marcação das vesículas extracelulares utilizando PalmttdTomato

Foi utilizado o plasmídeo doado por Dr. Charles P. Lai (National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan) (Lai *et al.*, 2015) contendo tadem dimer Tomato (tdTomato), fusionado com NH2-terminal com o sinal de palmitoilação (PalmttdTomato) para marcar as vesículas extracelulares. Em síntese, as células (neurônais) foram transduzidas com lentivírus contendo PalmttdTomato (293TPalmttdTomato) por 24 horas. Em seguida, o meio de cultivo foi trocado e as vesículas extracelulares e neurônios marcadas com PalmttdTomato foram utilizados nos demais experimentos.

Transdução com eGFP e separação de células

A fim de realizar estudos mais detalhados com as ADSC, foi realizada transdução com lentivírus com o gene exógeno eGFP. A produção Lentiviral foi realizada por lipofecção de células 293FT (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). As ADSC foram cultivadas em placa de petri de 60 mm até 60% de confluência. Em seguida, as células foram transduzidas por incubação de 3 mL de sobrenadante viral com 6 µg/mL de brometo de hexadimetrina (polibreno, sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Após 24 horas, a solução viral foi substituída por meio de cultivo sem antibióticos e incubadas durante 24 horas. As células foram submetidas à análise de citometria de fluxo (FACS-separação de células assistida fluorescente) para avaliação da eficácia da transdução e triagem das células positivas para GFP. Este procedimento foi realizado no citometro FACS Aria Cell Sorter com o software DiVa V.6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, USA). Os filtros foram ajustados para a emissão de 525 nm para FITC fluorochromos. As análises foram feitas utilizando o Software FACS Express.

Cocultivo com neurônios^{+PalmttdTomato} e ADSC GFP+

Foi realizado o cocultivo (método previamente descrito na seção 6.1.4.) dos neurônios (BRC)^{+PalmttdTomato} e suas vesículas extracelulares^{+PalmttdTomato} com as ADSC GFP+ e avaliada a comunicação via vesículas extracelulares marcadas entre os neurônios e as ADSC.

Cultivo de ADSC GFP+ com grandes vesículas extracelulares (MV)^{+PalmttdTomato} isoladas do cultivo de neurônios^{+PalmttdTomato}

Foram isoladas as MV^{+PalmttdTomato} das células neuronais^{+PalmttdTomato}, adicionadas nas ADSC GFP+, e através de análise por microscopia de fluorescência foi observado se as MV^{+PalmttdTomato} estariam dentro das ADSC GFP+.

Microscopia de fluorescência por Confocal

As células foram fixadas em paraformoldeído a 4% por 12 minutos e analisadas com o microscópio de fluorescência confocal (Leica SP2 S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) para identificar as vesículas marcadas com PalmttdTomato (laser de excitação 543 nm, emissão 555 nm a 634 nm, 63X de magnificação, com imersão em óleo e 2x zoom). As imagens foram analisadas por LAS AF software (Leica Application Suite and Advanced Florescence; Leica Microsystems).

6.2.3 Rastreamento das vesículas extracelulares nas células com indicio de diferenciação

Foram utilizados neste experimento camundongos FVB, com 2 a 3 meses de idade, pesando de 15g a 25g, machos, positivos para luciferina (bioluminescência) e GFP a fim de avaliar de forma mais fidedigna se as vesículas estariam correlacionadas com o processo de transdiferenciação. Desta maneira, as BRC com luciferina/GFP+ foram cocultivadas com ADSC sem luciferina por sete dias, e a proteína SNAP25 foi avaliada por imunocitoquímica, a fim de confirmar se as ADSC-

CC positivas para SNAP25, uma proteína neuronal, também estariam em contato com BRC VEs.

6.2.4 Papel das vesículas extracelulares na transdiferenciação das células-tronco do tecido adiposo

Cultivo com meio condicionado ou vesículas extracelulares

No intuito de avaliar separadamente alguns componentes que poderiam estar no meio de cocultivo, que talvez estivessem envolvidos com a indução da diferenciação celular, foi isolado o meio de cultivo das células neuronais e depletado de vesículas extracelulares (meio condicionado, contendo fatores solúveis), assim como isoladas as grandes vesículas extracelulares (BRCMV) e as pequenas vesículas extracelulares (BRCExo) do meio de cultivo dos neurônios de 10^5 células neuronais/mL, mesma quantidade utilizada no cocultivo do estudo 1, a fim de avaliar o efeito na transdiferenciação em linhagem neuronal. Avaliamos este processo pela porcentagem de células positivas para a proteína SNAP25 após três dias de indução por imunocitoquímica e as ADSC que receberam VEs tiveram alguns transcritos avaliados por RT-qPCR após três e sete dias de indução (mesma metodologia e genes apresentados no Estudo 1) (Figura 7).

Figura 7 - Indução da transdiferenciação por fatores solúveis ou vesículas extracelulares originadas do meio de cultivo das células neuronais

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) O meio do cocultivo dos neurônios com as ADSC-CC (B) foram separados e adicionados os fatores solúveis (FS) contidos no meio de cultivo dos neurônios depletados de VEs nas ADSC, também (C) foram isolados e testados a capacidade de indução apenas das grandes vesículas extracelulares (microvesículas) do meio de cultivo neuronal (BRCMV, pontos vermelhos), e (D) apenas das pequenas vesículas extracelulares (exossomos) (BRCExo, pontos vermelhos). Foi avaliada a capacidade de indução pela quantificação de células positivas para a proteína SNAP25 após três dias de indução por imunocitoquímica, e (E) nas ADSC que receberam VEs (nossas células e tratamentos de interesse neste estudo) foram quantificados os transcritos relacionados com genes de morfologia e funcionalidade neuronal, e os transcritos relacionados com a neurogênese. Os pontos vermelhos se remetem as vesículas extracelulares originadas dos neurônios.

Quantificação de células imunopositivas na imunocitoquímica

A porcentagem de células positivas para o marcador SNAP25 foi obtida através da contagem de células positivas e negativas aos marcadores em cinco campos escolhidos aleatoriamente, até que fosse atingida uma quantidade de 500 células contadas. Este procedimento foi repetido com sete replicatas biológicas e três técnicas para cada marcador pelo programa Image J. Essa metodologia foi adaptada de outros estudos semelhantes ao apresentado aqui (DARVISHI et al., 2017; NAGHDI et al., 2009).

Extração do RNA total para análises do RNA mensageiro e microRNA, e transcrição reversa do RNA mensageiro e microRNA e PCR quantitativo em tempo real

Para este estudo foram utilizadas as BRC, ADSC, ADSC+BRCMV e ADSC+BRCExo dos períodos de cultivo três (D3) e sete (D7), as vesículas extracelulares isoladas do meio de cultivo dos neurônios, obtidas do estudo 1. A extração de RNA total, e síntese de cDNA foi realizada como explicado anteriormente na seção 6.1.8. E os resultados da quantificação de transcritos foram comparados com os resultados do cocultivo apresentados no Estudo 1, reapresentados neste estudo.

6.2.5 Análise Estatística dos dados do Estudo 2

As análises de quantificação das vesículas extracelulares, quantidade de células positivas para SNAP25 e nas análises da quantidade de transcritos foram analisadas pelo teste paramétrico de comparação das variâncias (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste comparativo Tukey. O nível de significância considerado em todos os testes foi $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.

6.3 Estudo 3 - “Teste *in vivo* da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-*like* no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”

No estudo 3 foi avaliada a capacidade regenerativa ou redução do processo de degeneração walleriana das células-tronco do tecido adiposo transdiferenciadas em células neuronais-*like* após o cocultivo do período em que observamos maior semelhança com o neurônio. De acordo com os estudos 1 e 2, foi a ADSC-CC D7, assim essas células foram utilizadas neste estudo 3 *in vivo* (Figura 8).

Figura 8 - Modelo esquemático experimental Estudo 3 - “Teste *in vivo* da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-*like* no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Após o cocultivo das ADSC-CC por sete dias com neurônios (BRC), (B) as células foram preparadas e aplicadas em uma lesão total do nervo ciático total (neurotmese) e verificou-se se houve alguma melhora funcional ou local na lesão.

6.3.1 Preparação das células

No experimento *in vivo* foram utilizadas células-tronco do tecido adiposo de camundongos FVB transgênicos positivos para luciferina/GFP+ de dois meses com peso entre 15 g a 20 g. Para tanto, 5×10^5 ADSC luciferina/GFP+ isoladas e cultivadas por sete dias e aplicadas por animal, no grupo que recebeu só células-tronco não induzidas e não cocultivadas (ADSC), e 5×10^5 ADSC luciferina/GFP+ isoladas e cocultivadas conforme experimento 1, por sete dias (ADSC-CC D7) foram aplicadas por animal no grupo que recebeu as células neuronais-*like* (Figura 9).

Figura 9 - Análise da bioluminescência captada pelo In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) 10^3 células-tronco, (B) 10^5 células-tronco, (C) 10^4 células-tronco. Tons mais próximos ao vermelho: maior quantidade de bioluminescência e detecção celular na região; tons mais próximos ao azul: menor quantidade de bioluminescência captada.

6.3.2 Delineamento dos grupos do estudo 3

Para o teste *in vivo* utilizamos 28 camundongos FVB, divididos em seis grupos descritos a seguir (Figura 10). *Grupo 7CTR-* animais controle foram os que apenas tiveram a lesão/secção total do nervo ciático, sem a adição de células-tronco na lesão, com avaliação após sete dias da realização da cirurgia (N=2). *Grupo*

7ADSC- animais com células-tronco que tiveram a secção total do nervo ciático e receberam apenas células-tronco não induzidas e a lesão foi avaliada após sete dias da realização da cirurgia (N=6). *Grupo 7ADSC-CC D7*- animais com células-tronco induzidas por cocultivo, que tiveram a lesão/secção total do nervo ciático e receberam apenas células-tronco induzidas por cocultivo e a lesão/secção total foi avaliada após sete dias da realização da cirurgia (N=6). *Grupo 14CTR* – animais controle que apenas tiveram a lesão/secção total do nervo ciático, sem a adição de células-tronco na lesão/secção total, com avaliação após 14 dias da realização da cirurgia (N=2). *Grupo 14ADSC*- animais com células-tronco que tiveram a lesão/secção total do nervo periférico e receberam apenas células-tronco não induzidas e a lesão/secção total foi avaliada após 14 dias da realização da cirurgia (N=6). *Grupo 14ADSC-CC D7*- animais com células-tronco induzidas por cocultivo, tiveram a lesão/secção total do nervo periférico e receberam apenas células induzidas por cocultivo e a lesão/secção total foi avaliada após 14 dias da realização da cirurgia (N=6).

Figura 10 - Delineamento dos grupos do estudo 3

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Apenas solução de PBS. (B) ADSC sem indução da transdiferenciação neuronal diluída em PBS. (C) ADSC-CC D7 diluída em PBS. (A') Grupo 7CTR, (B') Grupo 7ADSC, (C') Grupo 7ADSC-CC D7, (A'') Grupo 14CTR, (B'') Grupo 14ADSC, (C'') Grupo 14ADSC-CC D7.

6.3.3 Animais

Vinte e oito camundongos de 2 a 3 meses de idade, FVB, com 15 g a 25 g, e três FVB luciferina/GFP+ foram doados do biotério do Hemocentro de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, para este experimento. Eles foram mantidos no biotério da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, São Paulo, Brasil, nas condições preconizadas para a espécie, 12-horas de ciclo noite/dia, a 20-22°C com água e comida à vontade. Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais antes e depois do procedimento cirúrgico e com acompanhamento diário.

6.3.4 Procedimento cirúrgico

O protocolo de anestésico seguido foi cloridrato de cetamina (90-150 mg/Kg), xilazina (7,5-16 mg/Kg) e tramadol (20-40 mg/kg) via intraperitoneal, o que proporcionou anestesia profunda por 30 minutos, e analgesia, além de adição de lidocaína local para redução da dor. Quando o animal entrou em plano anestésico

profundo, seguiu-se protocolo cirúrgico para a realização da neurotmese (ABDANIPOUR; TIRAIHI, 2012; GÄRTNER et al., 2014; LEE; WOLFE, 2000). Resumidamente, a pele foi seccionada, afastando a musculatura próxima ao nervo ciático, e realizou-se a lesão/secção completa do nervo (neurotmese) do membro posterior direito de acordo com as divisões dos grupos experimentais supracitados e aplicação de células ou apenas de PBS. Ao longo do período do experimento, todos os animais foram avaliados por cinco minutos diariamente, a fim de avaliar possíveis comportamentos indicativos de dor. Adicionalmente, após o procedimento cirúrgico em todos os animais foi aplicado uma dose de analgésico (tramadol, 20 – 40 mg/kg, a cada oito horas) por via intraperitoneal durante sete dias após.

Foram avaliados, em cada grupo, o processo de degeneração e possível regeneração do nervo lesionado *in vivo* buscando a localização das células aplicadas pelo *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS (PerkinElmer, USA) nos dias dois, sete e 14; e pelo índice do nervo ciático a fim de avaliar *in vivo* a lesão do nervo periférico (SFI) nos dias zero, três, sete, dez e 14 após o procedimento cirúrgico. *Pós morte* pelo peso do músculo Gastrocnêmio e pela histopatologia do nervo ciático seccionado (Figura 11).

Figura 11 – Procedimento cirúrgico.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Incisura e secção do nervo ciático. (B) Aplicação de células ou PBS. (C) Fechamento da pele. (D) Avaliação pós-operatória. (E) Condicionamento individual dos animais pós cirurgia. (F) Avaliação da lesão pós-operatória.

6.3.5 Avaliação da aplicação das células *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS

Os camundongos que passaram por cirurgia foram transportados até o Biotério do Hemocentro de Ribeirão Preto após dois (D2), sete (D7) e 14 (D14) da cirurgia. Então, no laboratório, foi aplicada D-luciferina (VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade, num. P1043- Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as recomendações do fabricante quanto à quantidade e tempo até a exposição (150

mg/Kg por pelo menos 5 minutos de exposição). Então os animais foram induzidos ao plano anestésico com isoflurano 0,08-1,5% via inalatória, durante cinco minutos e foram colocados dentro do *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS (PerkinElmer, USA) com tempo de exposição de três a cinco minutos, seguindo com a quantificação da bioluminescência. As imagens adquiridas que refletem a bioluminescência captada foram analisadas usando Living Image software (PerkinElmer, USA). A intensidade do sinal foi avaliada por photons por segundo por centímetro quadrado por steradiano (p/s/cm²/sr). A área calculada refere-se ao ROI (região de interesse, delimitada manualmente no software), e a quantificação da bioluminescência final foi avaliada comparativamente entre os animais que receberam as células e os que não receberam.

6.3.6 Avaliação da lesão do nervo ciático e funcionalidade do membro afetado

Índice de funcionalidade do nervo ciático

A avaliação do índice de funcionalidade do nervo ciático, foi realizada de acordo com Bain; Mackinnon; Hunter (1989), com algumas adaptações para o modelo animal.

Em resumo, o camundongo foi colocado em cima de uma região acrílica, o que possibilitou por fotografias medir as distâncias entre o dedo 1 e 5 (TS), assim como entre o 2 e 4 (ITS), e a distância entre o dedo 3 e a região de apoio palmar (PL) (Figura 12). As medidas vindas das fotografias foram adquiridas por contagem de pixel e comparadas com uma medida conhecida. Após medir estas distâncias os valores foram inseridos na fórmula para calcular o índice do nervo ciático (SFI - sigla em inglês para Sciatic functional index) (Figura 12). A interpretação dos resultados foi baseada nos seguintes critérios: valores próximos de zero indicam que o animal não possui nenhuma lesão no nervo ciático e valores próximos de -100 indicam o mais alto nível de lesão neste nervo. Esta análise foi feita no momento antes da cirurgia, e nos dias três, sete, dez e 14 dias após a cirurgia.

Figura 12 – Índice de funcionalidade do nervo ciático (SFI)

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Medidas necessárias para que se possa calcular o SFI, sendo que (TS) é a distância entre o dedo 1 e 5, (ITS) entre o dedo 2 e 4, (PL) a distância entre o dedo 3 e a região de apoio palmar. (B) Apoio criado para a aquisição das fotografias, permitindo o melhor posicionamento e mobilidade do camundongo. (C) Posicionamento do camundongo e aquisição da imagem.

De forma detalhada, para o cálculo foi considerado como membro experimental o qual foi seccionado, ou seja, o membro direito. EPL é a distância entre o dedo 3 e a região de apoio palmar do membro experimental; NPL é distância entre o dedo 3 e a região de apoio palmar do membro normal; ETS é a distância entre o dedo 1 e 5 do membro experimental; NTS é a distância entre o dedo 1 e 5 do membro normal; EITS é a distância entre o dedo 2 e 4 do membro experimental; e NITS é a distância entre o dedo 2 e 4 do membro experimental. A equação a seguir foi utilizada para calcular o SFI (Figura 13).

Figura 13 - Equação do índice do nervo ciático

$$SFI = -38,3X\left(\frac{EPL - NPL}{NPL}\right) + 109,5X\left(\frac{ETS - NTS}{NTS}\right) + 13,3X\left(\frac{EITS - NITS}{NITS}\right) - 8,8$$

Fonte: Própria autoria.

Quantificação do peso do Músculo Gastrocnêmio

O músculo Gastrocnêmio de todos os animais utilizados neste estudo foi fotografado e pesado (peso líquido), utilizando uma balança de precisão, a fim de averiguar se haveria diferença entre os grupos analisados e os grupos controles.

Histomorfometria do nervo ciático

O nervo ciático de cada grupo foi fixado em paraformaldeído a 4% por 24 horas, e em seguida foi submetido a técnica de inclusão em parafina (Histosec®, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos foram cortados em micrótomo SLEE medical CUT 6062, com espessura média de 5 µm e corados segundo as técnicas de H.E. (BEHMER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1976). O material foi mapeado e fotografado nas objetivas 10X, 40X e 100X em um fotomicroscópio LEICA DM500. Foi quantificado e analisado o diâmetro e área da fibra de cada nervo, e a densidade de axônios por área, de acordo com a metodologia utilizada por outros pesquisadores (APEL et al., 2010). Sendo que, utilizou-se o nervo do membro contralateral a lesão como controle nesta técnica (Normal). A avaliação foi realizada nos grupos 14CTR, 14ADSC e 14ADSC-CC D7.

6.3.7 Análise Estatística

Nos dados obtidos do *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS, índice do nervo ciático, peso do músculo gastrocnêmio, e histomorfometria do nervo ciático, foi utilizada a análise estatística pelo teste paramétrico de comparação das variâncias (ANOVA) e o teste comparativo Tukey, quando houve significância estatística na ANOVA, e em todos os testes o nível de significância utilizado foi $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.

7 RESULTADOS

7.1 Estudo 1 - “ Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos ”

7.1.1 Isolamento e cultivo primário das células do cérebro e das células-tronco do tecido adiposo

O cultivo primário das células neuronais e ADSC foi realizado com células de camundongo da linhagem C57BL e FVB, sendo que não houve diferença aparente entre morfologia e crescimento entre as linhagens.

As células-tronco do tecido adiposo possuíram morfologia fibroblastoide e capacidade de formação de colônias (Figura 14 A-C).

As células neuronais, por sua vez, demoraram aproximadamente 15 dias para se estabelecerem em cultivo, com presença de formação de redes neuronais (Figuras 14D-F e 15A-C).

Figura 14 - Cultivo primário das células-tronco do tecido adiposo (ADSC) e das células neuronais

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-C) ADSC apresentada em diferentes magnificações. (D-F) Neurônios e as redes neuronais estabelecidas no cultivo primário em diferentes magnificações. Barra= 100 μ m.

Figura 15 - Cultivo células neuronais

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-C) Células neuronais em cultivo primário, com neurônios unipolares (setas tracejadas), bipolar (setas cheias), multipolares (seta azul), de acordo com a morfologia apresentada. No cultivo houve também a presença de algumas células de suporte como de acordo com a morfologia as células da glia (seta laranja). Imagem no canto inferior esquerdo indica o aumento de 4X do cultivo primário (barra=500 μm), e (A) aumento de 10X. Barra= 100 μm .

7.1.2 Caracterização da célula-tronco do tecido adiposo

As ADSC tiveram capacidade de formação de colônia, assim como de se diferenciarem por indução química a células neuronais-like. Também como tiveram marcação positiva para CD90, CD45, e MHCI e negativa para CD86 (Figura 16).

Figura 16 - Caracterização de ADSC como célula tronco mesenquimal

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-B) As ADSC tiveram capacidade de formação de colônias. (C) Marcação positiva para CD90, CD44 e MHC I, e marcação negativa para CD86. (D) As ADSC tiveram capacidade de diferenciação por indução química em neuronais-*like*, com marcação positiva para SNAP25 (vermelha), DAPI (azul, marcação nuclear). Barra= 100 µm.

7.1.3 Imunocitoquímica

Houve a marcação para as proteínas TUBIII e SNAP25 nas ADSC-CC após o cocultivo com células neuronais em todos os períodos avaliados (três, sete e 14 dias), indicativo de que as células neuronais podem induzir a transdiferenciação de células-tronco mesenquimais e estas podem se diferenciar em células neuronais-*like* (Figura 17).

Figura 17 - Marcação por imunocitoquímica para as proteínas beta tubulina III (TUBIII) e SNAP25

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A- C) ADSC-CC positivas para TUB III, após três (A), sete (B), e 14 (C) dias de cocultivo (CC). (D-F) ADSC-CC positivas para o marcador neuronal SNAP25, após três (D), sete (E), e 14 dias (F) dias de cocultivo (CC). DAPI- Marcador nuclear (azul); TUBIII- beta tubulina III (verde); SNAP25- synaptosomal-associada proteína 25 (verde); MERGE- a sobreposição das imagens com as marcações, MERGE ADSC CTR- indica a sobreposição das imagens da marcação nuclear e do anticorpo (TUBIII ou SNAP25) das ADSC que não foram cocultivadas e não tiveram nenhum tipo de indução à transdiferenciação neuronal. Os quadrados no lado direito abaixo das figuras MERGE mostram em um maior aumento as células com a marcação de interesse. Barra=100 μ m.

Além da presença das proteínas neuronais quando submetidas à imunocitoquímica, as ADSC-CC durante o cocultivo apresentaram alteração morfológica, tais como o prolongamento citoplasmático e deslocamento nuclear para as áreas periféricas (Figura 18), semelhante à morfologia das células neuronais.

Figura 18 – Morfologia da ADSC cocultivada

Fonte: Própria autoria.

Legenda:(A) ADSC em cocultivo com células neuronais no dia sete. Barra=100 μ m.

7.1.4 Quantificação de células imunopositivas na imunocitoquímica

Foram quantificadas as células positivas para TUB III e SNAP25, e após sete dias de cocultivo houve aproximadamente 21,73% (STDEV) de células ADSC-CC positivas para TUB III e aproximadamente 34,54% (STDEV) de células ADSC-CC para SNAP25 positivas. Porém, foram observadas células em todos os períodos analisados, sem diferença estatística na porcentagem de células positivas entre os

períodos analisados (Figura 19) ($p \leq 0,05$). Ressalta-se, entretanto, que houve a presença da marcação em todos os períodos analisados.

Figura 19 - Porcentagem de ADSC-CC positivas para TUBIII e SNAP25

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Células positivas para os marcadores TUBIII e (B) SNAP25 durante os três períodos analisados (três, sete e 14 dias). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. ND- Não detectável.

7.1.5 Citometria de fluxo

Em todos os períodos avaliados, ADSC-CC positivas para os marcadores neuronais foram identificadas e quantificadas. Tendo menor quantidade de células positivas para TUBIII (menos de 5% STDEV), e em oposição para a SNAP25 estava em maior quantidade, tendo diferença estatística de acordo com o tempo de indução entre o dia três (4,28% STDEV) e o dia sete (13,75% STDEV), sendo neste último dia o período em que se foi observado o ápice de quantidade de células induzidas e seguindo sugestiva redução em quantidade de células positivas aos 14 dias, conforme mostrado na figura a seguir (Figura 20).

Figura 20 - Porcentagem de ADSC-CC positivas para TUB III e SNAP25 quantificadas por citometria de fluxo

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Porcentagem de células positivas para o marcador neuronal TUBIII durante os períodos analisados. Aos três dias houve uma maior quantidade de células positivas, mas sem diferença estatística entre os períodos analisados ($p \leq 0,05$). (B) Porcentagem de células positivas para o marcador neuronal SNAP25 durante os períodos analisados, com maior porcentagem ao sétimo dia. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

7.1.6 Expressão dos genes *Map2* e *Snap25* nas células-tronco após os períodos de indução por cocultivo com inserto

Em todos os períodos foram avaliados os níveis de transcritos de mRNA para *Map2* e *Snap25*. Constatou-se transcritos de mRNA de *Map2* em todos os períodos avaliados e uma maior abundância de transcritos de *Map2* ao sétimo dia de cocultivo, quando comparado com os demais períodos, com diferença estatística entre o nível de transcritos (ANOVA $p \leq 0,05$). Porém, o nível destes transcritos quando comparados com as células neuronais estavam reduzidos (Figura 21). Transcritos de mRNA relacionados com *Snap25* foram observados apenas no dia sete e 14 nas ADSC-CC.

Figura 21 - Nível de transcritos de mRNA nas células-tronco após os períodos de indução por cocultivo com inserto

Fonte: Própria autoria.

Legenda: No gráfico há o nível de transcritos para o gene Map2 e Snap25 nas BRC, ADSC e ADSC-CC no D3, D7 e D14. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

7.1.7 Níveis de transcritos avaliados, que podem estar relacionados com a neurogênese adulta

Detecção de transcritos relacionados à manutenção, proliferação e especificação das células-tronco neurais

Houve maior abundância de transcritos para *Numbl* e *Mbd1* nas ADSC-CC D3 do que em todas as demais células avaliadas ($p=0,01$). Os transcritos de *Rest* estavam abundantes nas ADSC sem indução, e nas ADSC-CC e BRC estavam reduzidos ($p=0,01$). Os níveis de transcritos de mRNA de *Tlx* estavam em nível semelhante em todas as células avaliadas ($p=0,004$) (Figura 22).

Os transcritos do gene *Ezh2* e *Ptbp1* estavam mais abundantes nas ADSC-CC D7 do que nas demais células avaliadas ($p=0,002$). Enquanto os transcritos do

gene *MeCP2* estavam mais abundantes nas ADSC D3 e BRC D3 do que nas demais células-tronco avaliadas ($p=0,001$) (Figura 22).

Figura 22 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na manutenção, proliferação e especificação das NSC

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos em dois períodos distintos D3 e D7 dos mRNA relacionados aos genes alvos (A) *Numbl* (B) *Mbd1* (C) *Rest* (D) *Tlx* (E) *Ezh2* (F) *MeCP2* e (G) *Ptbp1*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

Detecção de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios

Foi constatada menor abundância de transcritos de mRNA relacionado com o gene *Bdnf* nas células não neuronais quando comparadas com as células neuronais ($p < 0,0001$) e maior abundância de transcritos de mRNA relacionado com o gene *Mib1* nas ADSC-CC D7 em relação às demais células-tronco e demais períodos

($p < 0,0001$), com quantidade equiparada aos neurônios (BRC) ($p < 0,0001$) (Figura 23).

Figura 23 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos em dois períodos distintos D3 e D7 dos mRNA relacionados aos genes (A) *Bdnf* (B) *Mib1*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

Detecção de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade

Os transcritos de mRNA relacionados com o gene *Creb* estavam abundantes nas ADSC-CC D7 quando comparados com as demais células-tronco ($p = 0,0027$), e semelhante quantidade quando comparados com a BRC ($p = 0,045$) (Figura 24).

Figura 24 - Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos em dois períodos distintos, D3 e D7 dos mRNA relacionados ao gene *Creb*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

De acordo com o *heatmap* abaixo, as ADSC-CC D7 foram as que mais se assemelharam, em termos de expressão de transcritos de mRNA correlacionados a neurogênese adulta, com as células neuronais (Figura 25). Então, com esta avaliação e os resultados anteriores, as ADSC-CC D7 foram as células utilizadas no estudo 3.

Figura 25 - Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese, em que mostra a ADSC-CC D7 como a célula mais semelhante aos neurônios (BRC).

7.1.8 Expressão de miRNAs relacionados com a neurogênese adulta

O miR-195 estava abundante em todas as células estudadas sem diferença estatística entre elas, miR-184 estava mais abundante nas ADSC-CC D3, BRC D3 e BRC D7 do que nas ADSC sem tratamento e ADSC-CC D7. O miR-9 estava mais abundante nas ADSC D3 e BRC D7 do que nas demais células. E os miR-184, miR-137, miR-124 e miR-132 estavam mais abundantes nas BRC D3 e BRC D7 do que nas demais células avaliadas ($p < 0,0001$) (Figura 26).

Figura 26 - Avaliação do miRNAs estudados nas ADSC-CC

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-F) Constatou-se diferença nos níveis de transcritos avaliados entre os grupos estudados, sendo que os neurônios tinham mais abundância de transcritos para miR-184, miR-137, miR-124 e miR-132 do que os demais grupos. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

7.2 Estudo 2-“Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”

7.2.1 Caracterização da estrutura, morfologia e quantificação das vesículas extracelulares

Microscopia eletrônica de transmissão para análise da morfologia das pequenas vesículas extracelulares isoladas (Exossomos)

A morfologia e tamanho das vesículas isoladas foram compatíveis com a literatura, com formato *cup-shape* descrito por outros autores (Lobb *et al.*, 2015) (Figura 27).

Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão para análise da morfologia das pequenas vesículas extracelulares isoladas (Exossomos)

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-B) Pequenas vesículas extracelulares isoladas do cocultivo no dia três. (C-D) Pequenas vesículas extracelulares isoladas do cocultivo no dia sete. A e C barra= 500µm, B e D barra= 250µm.

Análise do tamanho e concentração das vesículas extracelulares

As partículas isoladas com ExoQuick possuíram o tamanho esperado para as pequenas vesículas extracelulares (exossomos), e as partículas isoladas nas centrifugações seriadas possuíram o tamanho esperado para as grandes vesículas extracelulares (microvesículas).

Tanto as amostras de exossomos quanto as microvesículas tiveram tamanhos semelhantes (Figura 28) e foi observada maior concentração de microvesículas (MV-CC D7 $1,7 \times 10^{10}$ (STDEV) e MV-CC D3 $1,8 \times 10^{10}$ (STDEV)) do que de exossomos (Exo-CC D3 $9,9 \times 10^8$ (STDEV) e Exo-CC D7 $9,15 \times 10^8$ (STDEV)) ($p = 0,0059$) no meio do cocultivo no dia três e no dia sete.

Figura 28 - Análise do tamanho e concentração das vesículas extracelulares

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Diâmetro (nm) das partículas isoladas do meio de cocultivo (CC) isolada nos dias três (D3) e sete (D7) (Exossomos-Exo e Microvesículas-MV) de acordo com a análise do tamanho e concentração das partículas isoladas. (B) Concentrações de partículas por amostra, tendo uma maior concentração de microvesículas (MV-CC) do que de exossomos (Exo-CC) no meio do cocultivo após 3 (D3) e 7 (D7) dias de cocultivo. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

Western Blotting para anticorpos específicos de exossomos e para o conteúdo das vesículas extracelulares

Através do western blotting foi constatada a presença das proteínas CD63 e ALIX descritas previamente, comprovando que as partículas isoladas do cocultivo são exossomos (Figura 29).

Figura 29 - Western blotting das proteínas ALIX (95kDa) e CD63 (~55 kDa) exclusivas de vesículas extracelulares

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Alix e CD63 estavam presentes nas vesículas extracelulares (exossomos) em todos os períodos analisados assim como as vesículas isoladas das ADSC-CC. Exo-BRC- Exossomos do meio de cultivo dos neurônios, Exo-ADSC- Exossomos do meio de cultivo das ADSC, Exo-CC D3- Exossomos do meio de cocultivo após três dias de indução, Exo-CC D7- Exossomos do meio de cocultivo após sete dias de indução. ALIX e CD63- são proteínas específicas de exossomos.

Nas vesículas extracelulares isoladas do cocultivo encontrou-se a proteína SNAP25, típica de células neuronais, com isoformas, uma com 50kDa, outra com 55kDa e uma terceira com 25kDa (Figura 30), dando indício de um provável mecanismo envolvido na transdiferenciação neuronal das ADSC.

Figura 30 - Western blotting das proteínas SNAP25 nas vesículas extracelulares isoladas

Fonte: Própria autoria.

Legenda: A proteína SNAP25 normalmente possui 25kDa conforme observado nos neurônios (BRC pellet), porém foi constatada a presença de isoformas com aproximadamente 50kDa e 55kDa nas vesículas extracelulares, sendo que não foi encontrada nenhuma das formas de SNAP25 nas vesículas do meio de cultivo das ADSC. MV-CC D3- Microvesículas do meio de cocultivo após três dias de indução, MV-CC D7- Microvesículas do meio de cocultivo após sete dias de indução. Exo-CC D3- Exossomo do meio de cocultivo após três dias de indução, Exo-CC D7- Exossomo do meio de cocultivo após sete dias de indução.

7.2.2 Rastreamento das vesículas extracelulares

Transdução com eGFP e separação de ADSC GFP+

Foi estabelecida uma linhagem de ADSC GFP+ de camundongos C57BL e FVB conforme mostrar a figura 31, sendo que as células positivas após análise da quantidade de GFP+, sorting da população ADSC GFP+ pela citometria de fluxo, as ADSC GFP+ foram cultivadas (Figura 31).

Figura 31 - Plot e histograma da citometria de fluxo das ADSC GFP+

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar a população ADSC GFP+ em 58,2 % das células, após análise pela citometria de fluxo, as ADSC GFP+ foram separadas e cultivadas, para demais experimentos.

Cocultivo com neurônios^{+Palmtomato} e ADSC GFP+

Houve a comunicação via vesículas extracelulares entre as células neuronais^{+Palmtomato} e as ADSC-CC em cocultivo, conforme demonstrado na figura a seguir (Figura 32), com presença de vesículas extracelulares^{+Palmtomato} dos neurônios dentro das ADSC-CC.

Figura 32 - Rastreamento de imagens de vesículas extracelulares

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Neurônios que expressam o repórter Palmtomato (BRC^{+Palmtomato}). (B) Figura esquemática demonstrando a abordagem utilizada para estudar a comunicação intercelular mediada por vesículas extracelulares in vitro. (C) ADSC cocultivada por três dias (ADSC-CC D3) com BRC^{+Palmtomato}. A imagem demonstra a presença de vesículas extracelulares^{+Palmtomato} (VE^{+Palmtomato}) dentro das ADSC-CC. MERGE – imagem de sobreposição das ADSC-CC D3 com as vesículas extracelulares^{+Palmtomato} dentro da célula na região perinuclear, comprovando que há comunicação via vesículas extracelulares, e que as ADSC-CC recebem as vesículas das BRC no cocultivo. Barra = 20 μm.

Cultivo de ADSC GFP+ com grandes vesículas extracelulares^{+Palmtomato} isoladas dos neurônios

As grandes vesículas extracelulares das células neuronais^{+Palmtomato} (BRCMV^{+Palmtomato}), adicionadas no cultivo das ADSC-GFP+, foram encontradas dentro de ADSC GFP+ e em sua grande maioria na região perinuclear (Figura 33).

Figura 33 - Comunicação via vesículas extracelulares entre as BRC e as ADSC

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-C) Grandes vesículas extracelulares secretadas^{+Palmtomato} (BRMV) dos neurônios^{+Palmtomato}, na região perinuclear (tom amarelado) dentro das ADSC GFP+ (verde) em todos os períodos avaliados. Barra= 100 μ m.

7.2.3 Rastreamento das vesículas extracelulares nas células com indícios de diferenciação

Houve a comunicação entre vesículas extracelulares de neurônios luciferina/GFP+ com as ADSC CC e a marcação positiva para a proteína SNAP25 por imunocitoquímica, nas mesmas células que tinham a presença de vesículas extracelulares luciferina/GFP+ originadas dos neurônios (Figura 34).

Figura 34 - Vesículas extracelulares nas células com indícios de diferenciação

Fonte: própria autoria.

Legenda: (A) Vesículas extracelulares (luciferina/GFP+) secretadas pelas BRC vindas de camundongo luciferina/GFP+ no cocultivo. (B) ADSC-CC luciferina/GFP- com a presença da marcação da proteína SNAP25 (vermelho). (C) Merge sobrepondo às duas fluorescências, mostrando as vesículas extracelulares dos neurônios GFP+ dentro das ADSC-CC (tom amarelado). Figura no canto inferior esquerdo mostra uma fotografia sem fluorescência. Barra= 100 μ m.

7.2.4 Papel das vesículas extracelulares na transdiferenciação das células-tronco do tecido adiposo

Cultivo com meio condicionado ou vesículas extracelulares

Houve a presença de ADSC positivas para SNAP25, após a adição do meio condicionado, assim como após a adição das vesículas extracelulares originadas do meio de cultivo de neurônios, conforme figura abaixo (Figura 35).

Figura 35 - Marcação para SNAP25 nos diferentes tratamentos realizados para a indução da transdiferenciação neuronal

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Células positivas para a SNAP25 após a adição de fatores solúveis- meio depletado de vesículas extracelulares originado das células neuronais e adicionados nas células ADSC. (B) Células positivas para a SNAP25 após a adição de microvesículas do meio de cultivo de neurônios (BRCMV). (C) Células positivas para a SNAP25 após a adição de exossomos do meio de cultivo de neurônios (BRCExo). DAPI- marcação nuclear. SNAP25- proteína encontrada tipicamente em neurônios, porém neste caso nas células-tronco induzidas. MERGED- combinação do DAPI com SNAP25. Barra= 100µm.

Foi observado que a indução com as microvesículas originadas dos neurônios resultou em 43,37% (STDEV) de ADSC positivas para SNAP25, e o cocultivo resultou em 41,74% (STDEV) de ADSC positivas para SNAP25, e ambos os métodos induziram de forma semelhante às ADSC ao processo de diferenciação ($p=0,0001$). Já a indução com exossomos originados dos neurônios resultou em

18,8% (STDEV) de ADSC positivas para SNAP25 e os fatores solúveis do meio de cultivo dos neurônios depletado de vesículas extracelulares resultou em 5,93% (STDEV) de ADSC positivas para SNAP25, sendo que ambos tiveram capacidade de indução semelhantes ($p=0,0001$) (Figura 36).

Figura 36 - Porcentagem de células positivas para SNAP25 após três dias de indução nos diferentes tipos de indução

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Houve células positivas para a SNAP25 durante o período analisado, e diferença entre os tratamentos. O cocultivo (CC) e na indução com microvesículas do meio de cultivo neuronal (BRCMV) tiveram capacidade de indução semelhantes, assim como o meio condicionado depletado de microvesículas (FS) e os exossomos (BRCExo) tiveram uma capacidade de indução reduzida quando comparado com os demais tratamentos, mas semelhantes entre si. Diferentes símbolos (*,**) dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores o erro padrão da média. ND- Não detectável.

Expressão de transcritos relacionados a neurogênese das células tronco tratadas com vesículas extracelulares

Transcritos relacionados à manutenção, proliferação e especificação das células-tronco neurais

Em relação ao nível de transcritos de mRNA que estão envolvidos no processo de manutenção, proliferação e especificação em células-tronco neuronais, no dia três de cultivo. Observou-se que os transcritos de mRNA relacionados a

Numbl estavam mais abundantes nas ADSC-CC D3 quando comparado com BRC D3, ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3 ($p=0,0158$). Em contraste, *Numbl* não foi detectado nas ADSC D3 ($p=0,0152$) (Figura 37).

No mesmo período os transcritos de mRNA relacionados a *Rest* estavam mais abundantes nas ADSC D3 quando comparados com as BRC D3, ADSC-CC D3, ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3 ($p=0,016$). Já o nível de transcritos de mRNA relacionados com *Ezh2* estavam semelhantes em todos os tipos celulares avaliados ($p=0,1362$), e os transcritos relacionados a *Ptbp1* estavam mais abundantes nas células-tronco que receberam vesículas extracelulares (ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3) quando comparados com BRC D3, ADSC D3 e ADSC-CC D3 ($p<0,0001$) (Figura 37).

Os fatores de transcrição também relacionados com o processo de manutenção, proliferação e especificação em NSC, tais como *Mbd1* estavam mais abundantes nas ADSC-CC D3 quando comparado com as demais células ($p=0,0013$), já os transcritos relacionados com *Tlx*, estavam mais abundantes nas ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3 quando comparadas com BRC D3, ADSC D3 e ADSC-CC D3 ($p=0,004$), e os relacionados com *MeCP2* estavam em maior abundância nas ADSC D3 e BRC D3 quando comparados com as ADSC-CC D3, ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3 ($p=0,0023$) (Figura 37).

Figura 37 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na manutenção, proliferação e especificação das NSC

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos no D3 dos mRNA relacionados aos genes alvos *Numbl*, *Mbd1*, *Rest*, *Tlx*, *Ezh2*, *MeCP2* e *Ptbp1*.

Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. Gráfico superior foi a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com os neurônios, e gráfico inferior a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com ADSC.

Em relação ao nível de transcritos de mRNA envolvidos no processo de manutenção, proliferação e especificação em células-tronco neuronais, no dia sete de cultivo os transcritos de mRNA de *Numbl*, *Mbd1*, *Ezh2* e *Ptbp1* estavam mais abundantes nas ADSC-CC D7 do que nas ADSC D7, ADSC+BRCMV D7 e ADSC+BRCExo D7 ($p=0,01$). Por sua vez, os transcritos relacionados com *Tlx* não estavam detectáveis nas ADSC-CC D7 e ADSC D7, porém abundantes nas ADSC+BRCMV D7 e ADSC+BRCExo D7 ($p=0,009$). Enquanto os transcritos de mRNA relacionados com *Rest* estavam mais abundantes nas ADSC D7 do que nas BRC D7, ADSC-CC D7, ADSC+BRCMV D7 e ADSC+BRCExo D7 ($p=0,0026$) (Figura 38).

Os transcritos quantificáveis de mRNA relacionado com *MeCP2* estavam mais abundantes nas ADSC-CC D7 e BRC D7 do que nas ADSC D7, ADSC+BRCMV D7 e ADSC+BRCExo D7 ($p < 0,001$) (Figura 39), e comparativamente, os transcritos quantificados de mRNA relacionados com *Numbl* ($p=0,07$), *Rest*, e *MeCP2* nas ADSC-CC D7 foram semelhantes a BRC D7 ($p=0,01$) (Figura 38).

Figura 38 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na manutenção, proliferação e especificação das NSC

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos no D7 dos mRNA relacionados aos genes alvos *Numbl*, *Mbd1*, *Rest*, *Tlx*, *Ezh2*, *MeCP2* e *Ptbp1*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. Gráfico superior demonstra a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com os neurônios, e gráfico inferior a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com ADSC.

Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios

Em relação ao nível de transcritos atuantes na diferenciação das NCS e maturação dos neurônios no dia três de cultivo, tanto o nível de *Bdnf* quanto de *Mib1* estavam mais abundantes nas BRC D3 quando comparados com os níveis em ADSC D3, ADSC-CC D3, ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3 ($p=0,0003$) (Figura 39).

Figura 39 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos no D3 dos mRNA relacionados aos genes *Bdnf* e *Mib1*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. Gráfico superior foi a análise comparativa ADSC-CC,

ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com os neurônios, e gráfico inferior a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com ADSC.

No dia sete de cultivo, os transcritos relacionados a *Bdnf* estavam mais abundantes nas ADSC+BRCMV D7, ADSC+BRCExo D7 e BRC D7 do que nas ADSC-CC D7 e ADSC D7 ($p=0,0003$). Já os transcritos relacionados com *Mib1* estavam mais abundantes nas ADSC-CC D7 e BRC D7 do que nas ADSC D7, ADSC+BRCMV D7 e ADSC+BRCExo D7 ($p<0,0001$) (Figura 40).

Figura 40 - Níveis de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na diferenciação das NSC e maturação dos neurônios

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos no D7 dos mRNA relacionados aos genes *Bdnf* e *Mib1*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. Gráfico superior foi a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com os neurônios, e gráfico inferior a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com ADSC.

Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade

O nível de transcritos relacionado com a maturação dos neurônios e funcionalidade, representado por *Creb* estava mais abundante nas BRC D3 quando comparados com as ADSC-CC D3, ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3

($p < 0,0001$), e ADSC-CC D3 tinha níveis semelhantes a ADSC D3 ($p < 0,0001$) (Figura 41).

Figura 41 - Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-B) Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos no D3 dos mRNA relacionados ao gene *Creb*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. Gráfico superior foi a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com os neurônios, e gráfico inferior a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com ADSC.

No dia sete de cultivo, os níveis dos transcritos de mRNA de *Creb* estavam mais abundantes nas ADSC-CC D7 e BRC D7 do que nas ADSC D7, ADSC+BRCMV D7 e ADSC+BRCExo D7 ($p = 0,0027$) (Figura 42).

Figura 42 - Expressão de transcritos relacionados com a neurogênese adulta, com maior participação na maturação dos neurônios e funcionalidade

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A-B) Níveis de transcritos quantificados e comparados entre os grupos no D7 dos mRNA relacionados ao gene *Creb*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. Gráfico superior foi a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com os neurônios, e gráfico inferior a análise comparativa das ADSC-CC, ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo com ADSC.

De forma resumida (Figura 43), as ADSC-BRCMV D3 e ADSC-BRCExo D3 se assemelharam entre si em relação aos transcritos analisados, se diferenciando das demais células avaliadas nos dois períodos. As ADSC-CC D3 possuíram transcritos semelhantes as ADSC (D3 e D7) e ADSC-BRCMV D7 e ADSC-BRCExo D7, e a ADSC-CC D7 foi a população celular que mais se assemelhou com as células neuronais (BRC).

Figura 43 - Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese adulta

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese em que mostra de forma comparativa ADSC-CC D3 como a célula mais semelhante as ADSC D3. Em oposição às ADSC-BRCMV D3 e ADSC-BRCExo D3 se assemelham entre si. (B) Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais avaliados na neurogênese em que mostra de forma comparativa ADSC-CC D7 como a célula mais semelhante aos neurônios (BRC D7). Em oposição às ADSC-BRCMV D7 e ADSC-BRCExo D7 se assemelham entre si.

Expressão de miRNAs relacionados com a neurogênese adulta

No dia três, os resultados mostraram que, os transcritos de miR-195 estavam abundantes nas ADSC-CC D3, ADSC D3 e BRC D3 sem diferença estatística entre elas, porém não detectável nas ADSC+BRCMV D3 e ADSC+BRCExo D3. Já os transcritos de miR-184, miR-137 e miR-124 estavam mais abundantes nas ADSC-CC D3, ADSC D3 e BRC D3 com maior abundância nas BRC D3, e não detectáveis nas ADSC+BRCMV D3, ADSC+BRCExo D3, e nas vesículas isoladas dos neurônios (BRCMV e BRCExo) (Figura 44).

Os transcritos do miR-9 estavam abundantes nas ADSC+BRCMV D3 do que nas demais células, e os resultados foram similares entre as ADSC-CC D3, ADSC D3 e BRCMV (Figura 44). Já os transcritos de miR-132 estavam mais abundantes nas BRC D3 do que nas demais células avaliadas, que apresentaram quantidades semelhantes entre si ($p < 0,0001$) (Figura 44).

Figura 44 - Avaliação do miRNAs estudados nas células-tronco do tecido adiposo, induzidas via cocultivo, ou indução via vesículas extracelulares no dia três de cultivo

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Houve diferença nos níveis de transcritos analisados entre os grupos estudados, sendo que os neurônios tinham mais abundância de miR-195, miR-184, miR-137, miR-124 e miR-132 do que os demais grupos. Já as ADSC-CC D3 tinham quantidade de transcritos similares as ADSC D3. As ADSC+BRCMV D3 tinham mais miR-9 do que os demais grupos, e o nível de transcritos de miR-132 foram similares entre todas as células tronco. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. ND- Não detectável.

Na análise dos transcritos no dia sete, os transcritos de miR-195 estavam mais abundantes e em quantidade semelhantes entre as ADSC-CC D7, ADSC D7, BRC D7, ADSC+BRCEXo D7 e ADSC+BRCMV D7, e não detectáveis nas vesículas isoladas dos neurônios (BRCMV e BRCEXo). Já os transcritos de miR-184, miR-137 e miR-124 estavam mais abundantes nas ADSC-CC D7, ADSC D7 e BRC D7 com maior abundância nas BRC D7, e não detectáveis nas ADSC+BRCMV D7,

ADSC+BRCExo D7 e nas vesículas isoladas dos neurônios (BRCMV e BRCExo) ($p < 0,0001$) (Figura 45).

Os transcritos de miR-9 estavam em nível semelhante nas ADSC-CC D7 e ADSC D7, elevados nas BRC D7, ADSC+BRCExo D7, BRCMV e ADSC+BRCMV D7, contudo não detectável nas BRCExo (Figura 47). Os transcritos de miR-132 estavam mais abundantes nas BRC D3 do que nas demais células avaliadas, que apresentaram quantidades semelhantes entre si ($p < 0,0001$) (Figura 45).

Figura 45 - Avaliação do miRNAs estudados nas células-tronco do tecido adiposo, induzidas via cocultivo, ou indução via vesículas extracelulares no dia sete de cultivo.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Houve diferença nos níveis de transcritos analisados entre os grupos estudados, sendo que os neurônios tinham mais abundância de miR-184, miR-137, miR-124 e miR-132 do que os demais grupos e as células que foram induzidas via vesículas extracelulares tinham mais miR-9 do que as demais células-tronco. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média. ND- Não detectável.

De forma resumida (Figura 46), as ADSC-BRCMV e ADSC-BRCExo (D3 e D7) se assemelharam entre si em relação aos transcritos analisados, e não possuíram o mesmo nível de transcritos avaliados relacionados com a neurogênese adulta constatados no estudo 1 nas ADSC-CC. A indução do processo de diferenciação com EVs originadas dos neurônios resultou após três dias em aumento de níveis de transcritos de *Ptbp1*, *Tlx*, miR-9 e miR-132, e após sete dias resultou no aumento de níveis de transcritos de *Bdnf*, *Tlx*, miR-195, miR-9 e miR-132.

Figura 46 - Análise dos componentes principais avaliados na neurogênese adulta nas ADSC que receberam EVs (ADSC-EVs)

Neurogênese adulta

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Neurogênese adulta que ocorre nas células tronco neurais (NSC). (B) Neurogênese adulta das ADSC-EVs no dia três de cultivo, indicando apenas ativação na via de especificação celular, contendo alguns miRNAs em maior quantidade, mas não diretamente relacionado com os genes principais dessa via, mas sim com fatores de transcrição relacionados com essa via tal como o *Tlx*. (C) Neurogênese adulta das ADSC-EVs no dia sete de cultivo, indicando apenas ativação na via de diferenciação celular, contendo alguns miRNAs em maior quantidade, mas não diretamente relacionado com os genes principais dessa via, mas sim com fatores de transcrição relacionados com essa via tal como o *Tlx*.

7.3 Estudo 3 - “Teste *in vivo* da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-*like* no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”

Devido aos resultados do Estudo 1, onde as células-tronco que foram cocultivadas por sete dias (ADSC-CC D7) eram as que mais se assemelhavam ao neurônio em termos de quantificação de transcritos e demais análises, optou-se por utilizar estas células neste estudo *in vivo* para validar a terceira hipótese: que as ADSC diferenciadas possuem *in vivo* uma função de auxílio na regeneração de lesões em nervos periféricos.

7.3.1 Avaliação da aplicação das células *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS

Por meio do *in vivo* Imaging - IVIS® Lumina XRMS as ADSC-CC D7 e as ADSC foram avaliadas e localizadas *in situ*. Foi observado que as ADSC-CC D7 estavam com bioluminescência após o processo de diferenciação, e ao aplicá-las na lesão, pouca quantidade de bioluminescência foi observada, indicando possivelmente a dispersão de tais células do local da lesão (Figura 47).

Figura 47 - Avaliação da aplicação das ADSC-CC D7 In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) As ADSC-CC D7 estavam com bioluminescência após o processo de diferenciação. (B) Ao aplicá-las na lesão, pouca quantidade de bioluminescência foi adquirida, indicando possivelmente a dispersão de tais células, não ficando concentrada no local da lesão – sendo que quanto mais próximo ao vermelho, maior quantidade de bioluminescência e detecção celular na região.

Nas leituras adquiridas pelo In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS, foi observado três perfis de comportamento celular *in vivo* nos animais que apenas receberam células-tronco (ADSC): 1) um grupo em que havia uma quantidade baixa de células no primeiro dia da avaliação (D2), que se reduziu até que não houvesse nenhuma bioluminescência capturada no último dia de avaliação (D14); 2) um grupo em que observamos mais bioluminescência originada das células-tronco luciferina/GFP+ no primeiro dia de avaliação, sendo que tal quantidade foi decaindo com o tempo, porém, até a última análise havia células detectáveis no local da lesão (D14); e 3) um perfil de comportamento celular distinto dos demais no grupo que recebeu células-tronco originadas do cocultivo (ADSC-CC D7), onde não houve

detecção por bioluminescência de células em todos os períodos avaliados no local da lesão (Figura 48).

Figura 48 - Avaliação da aplicação das células In Vivo Imaging - IVIS® Lumina XRMS- Mostrando três perfis de comportamento celular *in vivo*

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Animais controle. (B) Grupo que apenas recebeu células-tronco (ADSC): foi observado um grupo em que havia uma quantidade baixa de células no primeiro dia da avaliação (D2) que se reduziu até que não houvesse nenhuma bioluminescência capturada no último dia de avaliação (D14). (C) Grupo em que foi observada grande quantidade de células-tronco no primeiro dia de avaliação, sendo que tal quantidade foi decaindo com o tempo. (D) Perfil de comportamento celular no grupo que recebeu células-tronco originadas do cocultivo (ADSC-CC D7).

A quantidade de bioluminescência que indica a presença das células aplicadas no local da lesão foi superior nas ADSC no primeiro dia de análise (2ADSC), e então reduziu-se com o passar do tempo (Figura 49).

Figura 49 - Avaliação da quantidade de células no local da lesão com o passar do tempo.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Quantidade de bioluminescência indicou a presença das células aplicadas no local da lesão, que foi superior nas ADSC no primeiro dia de análise (2ADSC) quando comparadas com as demais células e períodos de análise. Entretanto, houve uma queda na quantidade com o passar do tempo, em todos os animais analisados e tratamentos avaliados. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

7.3.2 Avaliação da lesão do nervo ciático e funcionalidade do membro afetado

Índice de funcionalidade do nervo ciático

A aplicação de células-tronco (ADSC) e a aplicação das células-tronco do cocultivo (ADSC-CC D7) tiveram SFI -41,41 (STDEV) e -41,57 (STDEV) respectivamente, ao terceiro dia pós-cirúrgico, enquanto os animais controle (CTR) tiveram SFI próximo a -52,75 (STDEV). Nos primeiros dias após aplicação de ADSC ou ADSC-CC D7 não houve diferença no SFI, mas ao sétimo dia os animais que receberam ADSC-CC D7 tiveram uma leve melhora no SFI -51,58 (STDEV) quando comparados com ADSC -60,66 (STDEV) e CTR -54,43 (STDEV), e esta melhora se manteve no décimo dia, ADSC CC D7 -56,39 (STDEV), ADSC -57,61 (STDEV) e CTR -59,12 (STDEV) e décimo quarto dia ADSC-CC D7 -57,07(STDEV), ADSC -59,83(STDEV) e CTR -56,51 (STDEV) (Figura 50).

Figura 50 - Avaliação do índice do nervo ciático (SFI) - Diferenças entre o SFI nos grupos avaliados

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Os animais que receberam as ADSC-CC D7 demonstraram uma melhora no SFI quando comparado com os demais tratamentos, mesmo que estatisticamente não se tenha observado diferença ($p \leq 0,05$). Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

Quantificação do peso do músculo gastrocnêmio

No sétimo dia (7ADSC-CC D7) após o procedimento cirúrgico o grupo de animais que recebeu as ADSC-CC D7 apresentou o peso do músculo gastrocnêmio

do membro posterior direito (membro em que se seccionou o nervo ciático) superior quando comparado com o grupo de animais que recebeu as células-tronco, mas semelhante com o controle. Entretanto, com o passar do tempo o peso deste grupo se assemelhou aos demais grupos (Figura 51).

Figura 51 - Peso do músculo gastrocnêmio

Fonte: Própria autoria.

Legenda: No primeiro dia de análise (sétimo dia pós cirúrgico) houve diferenças marcantes entre o grupo que recebeu ADSC-CC D7 e o grupo que recebeu as ADSC, porém, com o passar do tempo não houve mais diferenças entre os grupos experimentais. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

Em relação à progressão da atrofia, na avaliação morfológica foi constatado que ela foi mais acentuada na primeira avaliação ao sétimo dia, seguindo de uma atrofia intensa na última avaliação que se procedeu ao 14º dia nos grupos que receberam células-tronco (Figura 52).

Figura 52 - Análise morfológica do músculo gastrocnêmio

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Sétimo dia após o procedimento cirúrgico no grupo de animais que recebeu as ADSC, a atrofia não estava aparente, quando comparado o músculo gastrocnêmio do membro lesionado (direito) com o não lesionado (esquerdo). (B) Sétimo dia após o procedimento cirúrgico no grupo de animais que recebeu as ADSC-CC D7, a atrofia não estava aparente, quando comparamos o músculo gastrocnêmio do membro lesionado (direito) com o não lesionado (esquerdo). (C) 14º dia após o procedimento cirúrgico no grupo de animais que recebeu as ADSC a atrofia estava aparente, quando comparado o músculo gastrocnêmio do membro lesionado (direito) com o não lesionado (esquerdo). (D) 14º após o procedimento cirúrgico no grupo de animais que recebeu as ADSC-CC D7 a atrofia estava aparente, quando comparamos o músculo gastrocnêmio do membro lesionado (direito) com o não lesionado (esquerdo).

Histomorfometria do nervo ciático

Na avaliação histomorfométrica do nervo ciático, o diâmetro e área da fibra nervosa foram semelhantes entre os nervos contralateral a lesão e os nervos dos grupos dos animais que passaram pelo procedimento cirúrgico e receberam ou não células. Porém quando comparamos a densidade de axônios presentes, houve diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo que recebeu ADSC-CC

D7 a densidade de axônios no nervo se assemelhou com a quantidade encontrada no nervo contralateral a lesão (Normal) ($p=0,0043$) (Figura 53).

Figura 53 - Histomorfometria do nervo ciático

Fonte: Própria autoria.

Legenda: (A) Corte histológico do nervo ciático de um animal representante do grupo 14CTR. (B) Corte histológico do nervo ciático de um animal representante do grupo 14ADSC. (C) Corte histológico do nervo ciático de um animal representante do grupo normal. (D) Corte histológico do nervo ciático de um animal representante do grupo 14ADSC-CC D7. Não houve diferença entre os diâmetros (E) e a área (F) das fibras nervosas, (G) porém houve uma maior quantidade de axônios nas fibras que receberam ADSC-CC D7 do que nas demais fibras. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras menores são o erro padrão da média.

8 DISCUSSÃO

8.1 Estudo 1- “ Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”

No presente trabalho, foi enfatizada a importância de avaliar a capacidade de indução das células neuronais e as propriedades das vesículas extracelulares através do cocultivo de ADSC-CC com células neuronais. Os resultados demonstram que o processo apresentado possui um pico de indução com maior quantidade de células-tronco neuronais-*like* ao sétimo dia, e parece ser mediado por moléculas secretadas pelos neurônios, uma vez que os resultados obtidos foram observados em cocultivo com insertos, que apenas permite contato por meio de cultivo.

As ADSC-CC após três, sete e 14 dias (D3, D7 e D14) de indução em cocultivo com insertos apresentaram morfologia e fenótipo muito semelhantes às células neuronais, com células positivas para as proteínas neuronais TUBIII e SNAP25. De acordo com outras pesquisas (DARVISHI et al., 2017; XIE et al., 2017) as ADSC de ratos também alteram sua morfologia, fenótipo e função se assemelhando a células de *Schwann* após um período de indução química por três semanas. Além disso, também possuem capacidade de se transdiferenciar em células neuronais-*like* (DARVISHI et al., 2017). Nesses experimentos foram analisados a morfologia e o fenótipo celular por meio da imunocitoquímica com os marcadores GFAP, S100, MAP2 e nestina (DARVISHI et al., 2017; XIE et al., 2017). No presente estudo, avaliou-se a alteração fenotípica das ADSC-CC por imunocitoquímica para TUBII e SNAP25, técnica semelhante, porém com diferentes marcadores, para provar a alteração fenotípica de tais células; contudo diferente dos estudos supracitados, também avaliou-se esta alteração por expressão e quantificação de transcritos de genes relacionados com a morfologia, função neuronal e neurogênese.

A maior parte dos estudos relacionados com a indução da transdiferenciação em linhagens neuronais de células-tronco mesenquimais utilizou indutores químicos como: isobutilmetilxantina (IBMX) (NING et al., 2006; SHI et al., 2016); fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), gerando células de Schwann e *glial-like* (ZAVAN et al., 2010); 1 mM beta-mercaptoetanol (BME) por 24 horas como meio de pré-indução, mantendo a indução com DMEM e 1–10 mM de beta-mercaptoetanol (DHANASEKARAN et al., 2013); silegina (ABDANIPOUR; TIRAIHI, 2012), ou ácido valproico (KURIHARA et al., 2014); e fator de crescimento de fibroblasto beta com forskolina (JANG et al., 2010). A porcentagem de células diferenciadas foi superior à 15%. Neste estudo confirmou-se de forma pioneira, a possibilidade de indução de células do sistema nervoso central na diferenciação neuronal de células-tronco do tecido adiposo apenas devido ao cocultivo com insertos e comunicação sem contato físico entre as células, mesmo com a baixa taxa de ADSC-CC transdiferenciada (13.75% STDEV, com pico aos sete dias de cocultivo) quando comparadas com a indução química. Pode-se afirmar que as células do SNC induzem a diferenciação neuronal de ADSC sem indução química, por contato indireto, talvez através da secreção de vesículas extracelulares e outros fatores como proteínas, como talvez seria uma situação *in vivo*.

Tal como apresentado aqui, as ADSC-CC expressaram as proteínas neuronais TUBIII e SNAP25, bem como transcritos para genes neuronais *Map2* e *Snap25* após cocultivo com neurônios em todos os períodos. Esses achados vão de encontro com o descrito na literatura, os quais revelaram a expressão dos marcadores neuronais, e a expressão dos transcritos para o gene *MAP2* em células-tronco neurais diferenciadas de humano (ALIZADEH et al., 2017), em ADSC (JANG et al., 2010), em células-tronco neurais diferenciadas de camundongos (ALIĆ et al., 2016), em células de muse humanas também diferenciadas (SHIMAMURA et al., 2017). A presença da proteína SNAP25 em ADSC diferenciada em neuronais-*like* já foi relatada por Jang et al., (2010), porém utilizando para a indução da diferenciação neuronal, componentes químicos e não uma indução apenas com o cocultivo, como foi realizado nesse estudo. Desta maneira nossos resultados reforçam os achados

de outros estudos, os quais indicaram que as ADSC se diferenciaram e adquiriram funcionalidade semelhantes a neurônios.

No dia sete houve a maior quantidade de ADSC-CC transdiferenciadas em neuronais-*like*, porém também havia ADSC-CC transdiferenciadas após três dias e 14 dias. Outros estudos se assemelham em tempo de indução ao nosso estudo, relatando períodos superiores a 14 dias (ABDANIPOUR; TIRAIHI, 2012; BAHMANI et al., 2014; KURIHARA et al., 2014), ou semelhantes aos estudados (KURIHARA et al., 2014). Desta maneira, a indução a transdiferenciação neuronal por cocultivo com células do sistema nervoso central é um sistema efetivo em tempo, por em apenas três dias já se observar células diferenciadas, e após sete dias de cocultivo já apresentar a maior quantidade de células diferenciadas.

A fim de averiguar se as ADSC-CC transdiferenciadas em neuronais-*like* seguiriam de forma semelhante à ativação gênica que ocorre na neurogênese adulta em células-tronco neurais (HSIEH; ZHAO, 2016), o nível de transcritos para os genes *Numbl*, *Mbd1*, *Rest*, *Tlx*, *Ezh2*, *Ptbp1*, *MeCP2*, *Bdnf*, *Mib1*, *Creb* e os miRNAs, miR-195, miR-184, miR-9, miR-137, miR-124 e miR-132 que participam da neurogênese foram avaliados nas ADSC-CC D3 e ADSC-CCD7. Constatou-se que os transcritos para os genes *Numbl* e *Mdp1* estavam em maior quantidade nas ADSC-CC D3, indicando provável início de neurogênese, uma vez que tais genes são altamente expressos nas células-tronco neurais no início deste processo (HSIEH; ZHAO, 2016; PETERSEN et al., 2004).

Sabe-se que *Mbp1* auxilia na manutenção da potencialidade das células-tronco neurais, restringindo os genes de diferenciação, e o início da ativação destes (JOBE et al., 2017). Neste estudo encontrou-se alto nível de transcritos de *Mbd1* apenas nas ADSC-CC D3, o que pode ser um indício de regulação dos genes neuronais neste período em tais células, deixando em estado indiferenciado.

Mbd1 também pode controlar a expressão de miR-184, em células-tronco neurais, que por sua vez reprime a expressão de *Numbl*, resultando em um equilíbrio entre proliferação e/ou diferenciação (LIU et al., 2010). Tal correlação foi

observada neste experimento, principalmente nas ADSC-CC D3 em que encontramos alta expressão de *Numbl* e *Mdb1* e miR-184, e logo em seguida nas ADSC-CC D7 baixa expressão destes três fatores, indicando provavelmente uma alteração no perfil das ADSC-CC conforme o tempo de indução.

No processo de neurogênese adulta *Rest* regula as NSC a não se diferenciarem (HSIEH; ZHAO, 2016). Os estudos afirmam que *Rest* regula genes relacionados com a quiescência e proliferação antes do início da diferenciação dessas células-tronco neurais em neurônios maduros (MUKHERJEE et al., 2016), assim, por exemplo, quando silenciado tem-se maiores taxas de fibroblastos reprogramados à diferenciação neuronal (DROUIN-OUELLET et al., 2017). Nesse estudo os transcritos para o gene *Rest* estavam presentes nas ADSC indicando que *Rest* estaria ativo e reprimindo os genes neuronais, em oposição, nas ADSC-CC D3 e ADSC-CC D7 foi observado que tais transcritos estavam reduzidos, indicando que possivelmente tais células estariam no processo de neurogênese.

Além disso, *Rest* estava mais expresso nas ADSC, e em baixa expressão nas ADSC-CC, marcando uma alteração de perfil entre tais células, indicando que a indução realizada pelas células neuronais à transdiferenciação das ADSC-CC resultou numa alteração de perfil a nível transcricional. Sabe-se que a inibição do *Rest* é parcialmente modulada por *up-regulation* de miR-9 e miR-124 (DROUIN-OUELLET et al., 2017), porém mesmo com níveis semelhantes de miRNAs entre as ADSC-CC e ADSC, o gene *Rest* estava menos expresso nas ADSC-CC do que nas ADSC, indicando uma via alternativa de regulação do *Rest* nas ADSC-CC.

A quantidade de transcritos de *Tlx* constatada foi relativamente alta nas ADSC-CC D3 e BRC D3 quando comparadas com as ADSC-CC D7, e também foi observada uma quantidade baixa de miR-9 tanto nas ADSC-CC D3 quanto nas ADSC-CC D7, e alta quantidade nas ADSC D3, BRC D7. Estudos demonstram que *Tlx* está expresso no cérebro em uma quantidade relativamente alta, porém durante o processo de diferenciação neuronal este nível reduz e o nível de miR-9 aumenta (ZHAO et al., 2009), e o *Tlx* também pode reprimir a expressão de miR-137, sendo

que este miRNA pode auxiliar na diferenciação neuronal de NSC (SMRT et al., 2010) e em contrapartida miR-9 reduz a expressão de *Tlx* (ISLAM; ZHANG, 2015; ZHAO et al., 2009). Devido à presença de *Tlx* pode-se compreender que nas células-tronco do cocultivo, talvez estejam entrando em um processo de diferenciação e determinação celular, semelhante ao que ocorre na neurogênese adulta com as NSC.

ADSC-CC D7 teve mais transcritos de *Ezh2* do que nas ADSC-CC D3, o que pode indicar uma alteração no nível de alguns transcritos nestas células após determinado tempo de cocultivo. *Ezh2* é um dos genes determinantes na escolha do caminho de tipo celular que uma NSC irá se diferenciar (NEO et al., 2014; SHER et al., 2008; ZHANG, J. et al., 2014), e promove o aumento da atividade das NSCs (ZHANG, J. et al., 2014). Então pode-se sugerir que as ADSC-CC D7 estavam entrando em um processo de diferenciação para um determinado do tipo celular.

Ptbp1 auxilia no controle de *splicing* alternativo de mRNAs como o mRNA relacionados com o gene *Pbx1* durante o processo de diferenciação neuronal nas células-tronco progenitoras, por ser uma proteína reguladora do processamento do mRNA (LINARES et al., 2015), e pode controlar genes de proteínas relacionadas com a sinapse (ULE; DARNELL, 2006). Já o miRNA específico do sistema nervoso central, miR-124 (LAGOS-QUINTANA et al., 2002), auxilia na diferenciação neuronal, sendo um miRNA que tem como alvo o *Ptbp1*, e quando *Ptbp1* está com baixa expressão há o auxílio deste efeito na diferenciação neuronal. Além disso, o miR-124 auxilia no desenvolvimento do sistema nervoso, regulando genes relacionados com *splicing* alternativos, importantes para o desenvolvimento do SNC. (MAKEYEV et al., 2007). Os transcritos de *Ptbp1* estavam em quantidade relativamente alta em ADSC-CC D7 quando comparados com a quantidade de transcritos nas ADSC D3, ADSC D7 e ADSC-CC D3 nos períodos avaliados, dando um indício de atividade nesta via relacionada às proteínas necessárias para a diferenciação neuronal conforme descritos nos estudos relatados anteriormente. Já os transcritos de miR-124 tinham níveis relativamente baixos nas ADSC-CC quando comparados com as BRC, indicando que talvez nas ADSC-CC a relação entre miR-

124 e *Ptbp1* não seja a mesma que se é observado na neurogênese adulta das NSC.

Quando há o aumento de *MeCP2* observa-se importantes alterações biológicas no cérebro, como por exemplo, redução de função (FASOLINO; ZHOU, 2017). *MeCP2* media *splicing* alternativos assim como *Ptbp1*, influenciando nas funções neuronais, regulando proteínas ao regular os exons de proteínas codificantes, ou os exons de proteínas não codificantes (CHENG et al., 2017). Além disso *MeCP2* é também importante para a maturação sináptica (SHAHBAZIAN et al., 2002). Quando há a redução de *MeCP2* há a perda de quantidade de transcritos e proteínas de *Bdnf* (CHANG et al., 2006). Nas BRC há exatamente essa regulação no D3, em que há altos níveis de *MeCP2* e baixos níveis de miR-132, sendo que este perfil se altera ao D7 com baixos níveis de *MeCP2* e altos níveis de miR-132, porém, não foi observado tal comportamento nas ADSC-CC D7, mas nas ADSC-CC D3, que teve expressão de miR-132 e expressão baixa de *MeCP2*, o que pode indicar que o processo de diferenciação neuronal em células-tronco mesenquimais seja uma via semelhante à neurogênese adulta.

O *Bdnf* é uma neurotrofina que proporciona proteção e auxílio à diferenciação neuronal, presente na neurogênese adulta (SKAPER et al., 1998; SKAPER, 2008; 2011); (HUANG; REICHARDT, 2001; WURZELMANN et al., 2017; YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2010). Nesse estudo, os transcritos para *Bdnf* estavam detectáveis nas ADSC-CC, porém em baixa quantidade quando comparado com as BRC, indicando que provavelmente as células-tronco cocultivadas estavam realmente ativando genes da neurogênese.

Estudos com *Mib1* demonstram que sua ausência gera a diferenciação prematura de neurônios e redução de células da glia maduras, por falhas na via Notch (KANG et al., 2013). Transcritos para *Mib1* foram encontrados nas ADSC-CC D7 em uma quantidade superior quando comparados com a ADSC-CC D3, BRC D3 e BRC D7, indicando que provavelmente a via Notch está ativa, resultando na maturação neuronal e integração da comunicação neuronal.

Transcritos para *Creb* estavam presentes e em altos níveis nas ADSC-CC D7, quando comparados com as nas ADSC-CC D3 ADSC D3 e ADSC D7, e se equiparam aos níveis encontrados nos neurônios neste período (BRC D7). Então, esta alteração de perfil das células cocultivadas com o passar do tempo pode indicar que há atividade desse gene, que está correlacionado com a funcionalidade das células neuronais após todo o processo de diferenciação, ainda quando não há atividade sináptica, sugerindo sua participação no desenvolvimento neuronal e não apenas na funcionalidade (LANDEIRA et al., 2016).

De forma sucinta a ADSC-CC D7 foi a população celular que mais se assemelhou com as células neuronais (BRC D3 e BRC D7). Transcritos para os genes *Numbl*, *Ptbp1*, *Mdd1* e *Ezh2*, relacionados com o início da diferenciação neuronal, e os genes *Mib1* e *Creb* relacionados com o final da diferenciação e início da funcionalidade dos neurônios, estavam em altos níveis quando comparados com as ADSC. Já os miRNAs escolhidos neste estudo estavam com baixa ou não tão notável abundância nas ADSC-CC. Desta forma é possível sugerir que tais células seguem o caminho de uma neurogênese semelhante à que ocorre nas NSC e que as ADSC-CC D7 são muito semelhantes aos neurônios, então pode-se afirmar que são neuronais-*like* e que talvez possuam certa funcionalidade.

8.2 Estudo 2 -“Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”

Neste estudo avaliou-se a capacidade de comunicação mediada por vesículas extracelulares entre neurônios e ADSC quando em cocultivo, cultivo direto, e cultivo com vesículas extracelulares originadas dos neurônios. Além disso, a proteína neuronal SNAP25 foi encontrada nas vesículas extracelulares isoladas do meio de cocultivo dos dias três e sete. Além do mais, tanto o sistema de cocultivo quando apenas a indução com grandes vesículas extracelulares (microvesículas) originadas do meio de cultivo de neurônios induziram a uma porcentagem semelhante de ADSC SNAP25+.

Ademais pelo sistema de marcação utilizado VE-PalmtDTomato foi possível confirmar que as vesículas extracelulares dos neurônios foram recebidas e provavelmente englobadas pelas ADSC-CC. Adicionalmente, as células que receberam as VEs foram as mesmas que expressaram SNAP25. Também notou-se que as ADSC quando induzidas apenas com VEs originárias de neurônios tiveram o aumento de transcritos de mRNA relacionados a *Ptbp1*, *Tlx* e miR-9 (nas ADSC+BRCMV D3) aos três dias, e *Ptbp1*, *Bdnf*, miR-195 e miR-9 no dia sete de cultivo, com níveis de miR-132 semelhantes as células-tronco do cocultivo em ambos os períodos.

Esses resultados demonstram que as vesículas extracelulares estão envolvidas na entrega da proteína SNAP25, e talvez tenham alguma influência no processo de diferenciação das ADSC-CC dos dias três e sete, uma vez que as células que receberam as vesículas extracelulares foram as mesmas positivas para SNAP25. A proteína SNAP25 normalmente possui 25kDa, porém foi encontrada a presença de isoformas com aproximadamente 50kDa e 55kDa nas VEs, o que pode indicar a existência de um complexo proteico (BRAUN; MADISON, 2000).

O sistema de cocultivo e a indução com grandes vesículas extracelulares (microvesículas) originadas de neurônios induzem a uma quantidade semelhante de ADSC SNAP25+, e superior a quantidade constatada pela indução apenas com pequenas vesículas ou meio de cultivo condicionado (fatores solúveis), na avaliação por imunocitoquímica. Anteriormente, outros estudos avaliaram a capacidade de indução das vesículas extracelulares (TAKEDA; XU, 2015), porém não de forma comparativa como apresentado nesse estudo. Porém também constataram que as vesículas extracelulares podem induzir o processo de diferenciação celular de células-tronco (TAKEDA; XU, 2015).

Também foi confirmada a comunicação entre os neurônios e as ADSC-CC pela presença de VE-PalmtDTomato, originárias de neurônios, dentro das ADSC-CC no terceiro dia de cocultivo, assim como quando em cultivo direto, ou apenas quando cultivadas com VE-PalmtDTomato oriundas de neurônios. Outros autores

encontraram resultados similares em MSC de humanos durante sete dias de diferenciação neuronal (TAKEDA; XU, 2015). De fato, estudos (BÁTIZ et al., 2015; TAKEDA; XU, 2015) confirmam que a comunicação mediada por vesículas extracelulares é dinâmica e multidirecional, além de ser funcional, como podemos sugerir com nossos resultados.

As células induzidas apenas com vesículas extracelulares possuíram marcação positiva para SNAP25, uma proteína relacionada com o processo de sinaptogênese (BRAUN; MADISON, 2000; ISLAMOV et al., 2015), indicando que talvez estas células também pudessem se transdiferenciar em neuronais-*like* e poderiam ter seus níveis de transcritos relacionados com a neurogênese semelhantes assim como as células do cocultivo, que tiveram abundância de transcritos de *Numbl*, *Ptbp1*, *Mdd1* e *Ezh2*, relacionados com o início da diferenciação neuronal, e de *Mib1* e *Creb* relacionados com o final da diferenciação e início da funcionalidade dos neurônios.

Desta maneira, quando genes envolvidos na neurogênese adulta, foram avaliados nas ADSC que foram induzidas ao processo de transdiferenciação neuronal apenas com VEs oriundas de neurônios, foi observado que alguns desses genes estavam em abundância. Porém esses genes não foram os mesmos encontrados em abundância nas ADSC-CC, com exceção ao *Ptbp1* que estava em abundância em todas as células-tronco que foram induzidas, porém em momentos diferentes.

Sabe-se que *Ptbp1* auxilia no controle de *splicing* alternativo de outros genes no processo de diferenciação neuronal (LINARES et al., 2015), e que o miR-124 é seu alvo, então quando se têm abundância de transcritos de *Ptbp1*, normalmente há pouco miR-124 (HSIEH; ZHAO, 2016; LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Os resultados desta pesquisa não confirmaram este feedback nas ADSC que receberam VEs.

Altos níveis do receptor nuclear *Tlx* reprimem miR-9 (ZHAO et al., 2009) e miR-137 (SUN et al., 2011), resultando em proliferação e manutenção das células-

tronco neurais (MURAI et al., 2014). No presente estudo as células que receberam as pequenas vesículas extracelulares, tais como exossomos ou microvesículas dos neurônios, no dia três, tiveram níveis de miR-137 não detectáveis, porém, alto nível de *Tlx*, o que talvez indique atuação das vesículas neste início de neurogênese, induzindo tais células a entrarem no processo de diferenciação neuronal.

Os transcritos de *Rest* e *MeCP2* estavam mais expressos nas ADSC D3 em comparação com as células induzidas a diferenciação neuronal, seja por cocultivo ou por vesículas extracelulares do meio de cultivo de neurônios. O gene *Rest* regula a transição das células progenitoras neuronais para células neuronais maduras (BALLAS et al., 2005). Porém, em células fora do sistema nervoso central este mesmo gene em conjunto com o complexo repressor *CoRest/MeCP2*, resulta no silenciamento dos genes neuronais (LUNYAK et al., 2002). Desta forma tem-se o indício de que a maquinaria de silenciamento estava ativa nas células-tronco não induzidas e fora de funcionamento nas células-tronco induzidas, permitindo que o processo de transdiferenciação neuronal acontecesse. Porém, com o passar do tempo de cultivo nas ADSC D7, foi observada a redução de *MeCP2*, apenas permanecendo maior quantidade de transcritos de *Rest*, o que indica que o tempo de cultivo pode também ser um fator a se considerar no processo de diferenciação neuronal das células-tronco mesenquimais.

O miR-9 é altamente expresso no cérebro (DELALOY et al., 2010; HAENISCH et al., 2015), e estudos provaram que o aumento de sua expressão reduz os níveis de *Tlx*, e aumenta a diferenciação das células-tronco neurais (ZHAO et al., 2013). Nas ADSC que receberam vesículas extracelulares dos neurônios foi observado no dia três altos níveis de miR-9 e *Tlx*, porém com redução no dia sete, e redução de *Tlx* no mesmo período. Assim como o miR-9 estava presente nas vesículas extracelulares isolados dos neurônios, que foram utilizadas neste experimento.

Sabe-se que *Mbd1* pode reprimir a expressão de miR-195 em NSC, e altos níveis deste miRNA reprimem *Mbd1*. Enquanto *Mbd1* promove a diferenciação neuronal o miR-195 a reprime e consequentemente leva ao estado proliferativo das

células progenitoras neuronais. Desta maneira, esse feedback quando alterado pode interferir na proliferação ou diferenciação das linhagens progenitoras neuronais (LIU et al., 2013). No presente estudo os níveis de miR-195 foram de não detectáveis no dia três de cultivo para relativamente expressos na ADSC no dia sete, que receberam as vesículas extracelulares, e quando comparadas com os neurônios e as células-tronco cocultivadas, porém mantiveram baixos níveis de *Mbd1* não se assemelhando ao relatado anteriormente.

Outro miRNA presente nas ADSC que receberam vesículas extracelulares, nas vesículas extracelulares, e nas ADSC do cocultivo, foi o miR-132. Sabe-se que altos níveis de *Creb* podem ativar a região produtora de miR-132, resultando em altos níveis de miR-132 auxiliam na formação de dendritos (MAGILL et al., 2010; LV et al., 2013). Os níveis encontrados no presente estudo de miR-132, pode ser um indicativo dessa ativação, e conseqüentemente, a formação estrutural dos dendritos.

As células-tronco do tecido adiposo que receberam microvesículas ou exossomos dos neurônios no dia sete tiveram aumento expressivo de *Bdnf*, se equiparando aos neurônios neste período. O *Bdnf* é uma neurotrofina que regula todo o ambiente neuronal, auxiliando no processo de maturação neuronal, presente na neurogênese (SKAPER et al., 1998; SKAPER, 2008; 2011; HUANG; REICHARDT, 2001; WURZELMANN et al., 2017; YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2010). Desse modo ao encontrar altas quantidade de transcritos de mRNA para esse componente pode ser um forte indício de que as células-tronco estão alterando seu perfil, provavelmente para neuronais-like.

De maneira geral, os aumentos de expressão de transcritos relacionados com os genes *Ptbp1*, *Tlx*, *Bdnf* e expressão dos miR-195, miR-9, miR-132 nas células-tronco que receberam vesículas extracelulares podem ser um indicativo que estas estão em um processo de diferenciação e até mesmo em maturação neuronal, indicando que as vesículas extracelulares podem induzir o processo de transdiferenciação de ADSC, devido as mudanças genótípicas e fenotípicas encontradas.

8.3 Estudo 3-“Teste *in vivo* da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-*like* no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”

A aplicação de células-tronco diferenciadas em linhagens neuronais (ADSC-CC D7) resultou em uma melhora funcional no membro com a lesão do nervo periférico, quando comparada com as células-tronco não diferenciadas. Além da melhora da funcionalidade, representadas pelo peso do músculo gastrocnêmio no dia sete de análise, pelo valor de SFI superior aos demais tratamentos em quase todos os períodos analisados, e pela redução do processo de degeneração walleriana, mostrando a quantidade de axônios semelhantes aos animais que não sofreram a neurotmeze, conforme avaliação histomorfométrica do nervo ciático.

Foram observadas diferenças representativas no peso do músculo gastrocnêmio entre os animais que receberam apenas ADSC e os animais que receberam ADSC-CC D7. Achado semelhante foi observado em outro estudo o qual demonstrou que o grupo que recebeu células-tronco diferenciadas em células de Schwann nas lesões tiveram uma melhora em comparação com os que não as receberam, e também tiveram resultados semelhantes em relação ao peso do músculo gastrocnêmio (WANG et al., 2017).

O peso do músculo gastrocnêmio do grupo que recebeu ADSC-CC D7 se manteve praticamente semelhante ao grupo controle na avaliação ao sétimo dia, além disso, esse grupo também apresentou SFI melhor do que os demais grupos, e maior densidade axonal. Desta maneira, mesmo não detectada pelo IVIS em todos os períodos na lesão, as ADSC-CC D7, agregaram certa funcionalidade, e uma resposta mais favorável após a secção total do nervo ciático no local mantendo a densidade de axônios, indicando redução do processo degenerativo. Estes resultados estão em similaridade com estudos realizados com ratos, onde os pesquisadores afirmam que mesmo sutil a melhora representada pelo SFI e peso do músculo gastrocnêmio, nos animais que receberam as células-tronco diferenciadas, ela é representativa e talvez a longo prazo poderá ser mais marcante (BUENO et al., 2017; GASPARINI et al., 2007). Assim como, por outro estudo com NSC, em que a

aplicação dessas células com interleucinas na lesão do nervo periférico resultou na regeneração do nervo por aumentar o diâmetro do nervo (LEE et al., 2017).

Nas ADSC e nas ADSC-CC D7 *in vivo* não foi observado proliferação celular. Porém, esse resultado não foi devido à quantidade utilizada, pois a quantidade de células-tronco diferenciadas ou não (5×10^5 células por animal), aplicadas na lesão se assemelhou a outro estudo (GÁLISOVÁ et al., 2017), e foi efetiva uma vez que se observou diferenças, como melhora funcional e no local da lesão naqueles animais que as receberam.

Nesse sentido, um estudo com ratos indicou que 4×10^6 células-tronco mesenquimais, avaliadas no segundo dia após aplicação, em animais com infarto, se mantiveram no local da lesão, demonstrado pelas imagens e análises feitas pelo IVIS, e demorou um tempo até que o efeito das mesmas fosse observado, tais como o aumento da concentração de citosinas e fatores de crescimento (WESTRICH et al., 2010). Além disso, esses autores observaram aumento da quantidade de células, muito provavelmente devido ao local de aplicação (ventrículo) onde se tem grande suprimento (WESTRICH et al., 2010). No presente estudo, apenas as ADSC se mantiveram no local da lesão, pela análise do IVIS, porém foi observada redução na quantidade de células, provavelmente devido à migração ou morte celular.

Um estudo com em ratos, utilizou $0,6 \times 10^5$ – 1×10^6 ADSC luciferina positivas, que foram injetadas dentro de biomateriais presentes na região subcutânea e constatou-se grande quantidade de neovascularização no local injetado, comprovando uma funcionalidade de tais células quando aplicadas *in vivo*. Observou-se que ao terceiro dia foi quando mais se adquiriu melhores avaliações da bioluminescência, que foi decaindo com o passar do tempo (GÁLISOVÁ et al., 2017). No presente estudo o tratamento com ADSC-CC D7 resultou em redução do processo degenerativo dos axônios, o que indicou mais uma funcionalidade *in vivo* das ASDC além da relatada anteriormente.

Em outro experimento foi relatado que com 1×10^6 MSC e MSC modificada para produzir mais BDNF, foram injetadas em lesão de nervo ciático causada por pressão, e observou-se que ambos os tipos celulares auxiliaram no processo de

regeneração do nervo avaliados pelo escore do SFI durante quatro semanas e quantidade de axônios na quarta semana (HEI et al., 2017). Pelos resultados encontrados no presente estudo, as ADSC e ADSC-CC D7 tiveram melhor resultados de SFI em relação ao grupo controle, assim como o experimento apresentado anteriormente.

Nesse contexto, pode-se sugerir com esses dados que as células-tronco transdiferenciadas em linhagens neuronais (*neuronal-like*) foram mais efetivas em conter a degeneração do nervo e suas consequências do que as células-tronco. Adicionalmente, em concordância com os achados apresentados neste estudo, pesquisadores utilizaram outros tipos celulares, no caso, células de Schwann humana derivadas do tecido adiposo da pálpebra em lesões de nervo periféricos reparadas com tubo de silicone, e avaliaram a funcionalidade pelo peso do músculo Gastrocnêmio e histologia do nervo reparado após 12 semanas (WANG et al., 2017). Adicionalmente, esses autores, afirmaram que as células de Schwann humana derivadas do tecido adiposo da pálpebra promoveram a regeneração do nervo periférico, sendo uma alternativa de terapia celular para esse tipo de lesão (WANG et al., 2017). Em secção parcial do nervo ciático, outros pesquisadores, utilizaram, MSC diferenciadas em células de Schwann e provaram que essas auxiliaram no progresso da funcionalidade após a lesão parcial do nervo (JUNG et al., 2016) em ratos, assim como outra pesquisa utilizando MSC diferenciadas em células produtoras de mielina (KEILHOFF et al., 2006), também provaram que as MSC promoveram redução do processo degenerativo.

Nossos achados mostraram que aplicação local das células-tronco diferenciadas resultou em uma maior densidade axônios quando comparadas com o grupo que não as recebeu, indicando preservação ao invés de degeneração dos axônios mesmo após neurotome. Semelhante ao observado com a utilização de MSC em secção total do nervo ciático, reconstruído cirurgicamente conectando as duas extremidades, que resultou em uma melhora no processo de regeneração, com grande reorganização das fibras e pouca fibrose na fase aguda (sete dias) do processo de regeneração; e na fase crônica (quatro semanas) observou-se espessamento da bainha de mielina e uma maior quantidade de fibras regeneradas

(GÄRTNER et al., 2014). E ao observado com a aplicação intravenosa de MSC em lesão do nervo ciático por estrangulamento (MATTHES et al., 2013), e com a aplicação de MSC dentro de tubos conectores que auxiliam na regeneração (WANG et al., 2010).

Em ratos, tanto aplicação local quanto intravenosa de MSC resultou em grande melhora no processo de regeneração, porém na administração sistêmica observou-se regeneração eletromotora, enquanto que na aplicação local o aumento na quantidade de fibras nervosas, o que sugere uma diferença entre os locais de ação de tais células (COONEY et al., 2016). Neste estudo apenas avaliou-se a aplicação local das ADSC-CC D7, e observou-se manutenção da quantidade de axônios e certa melhora funcional em comparação aos demais grupos.

Pesquisadores demonstraram que mesmo após a reconstrução do nervo periférico cirurgicamente após neurotmeze, muitas vezes não há melhora na funcionalidade e nem reconstituição total do nervo (KALLIO; VASTAMÄKI, 1993; CHO et al., 2012; PALISPIS; GUPTA, 2017). Desta maneira, reduzir o processo de degeneração do nervo periférico (degeneração walleriana) pode ser uma estratégia quando se necessita de tempo, para que procedimentos cirúrgicos possam ser realizados após secção total do nervo. Consequentemente, o uso células pré-diferenciadas em neuronais-*like* como o modelo celular apresentado nesse estudo, pode ser uma alternativa nestes casos em que há a secção total de nervo periférico, uma vez que as ADSC-CC D7 auxiliaram na melhora da função do membro afetado após a lesão mantendo grande parte da funcionalidade e impediram grande parte do processo degenerativo, mantendo a densidade axonal.

9 CONCLUSÃO

9.1 Estudo 1 - “Avaliação do potencial das células neuronais na indução da transdiferenciação de ADSC em cocultivo com insertos”

O cocultivo das células do sistema nervoso com as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC), induziu as ADSC a se diferenciarem em células neuronais-like.

9.2 Estudo 2 -“Avaliação da relação das vesículas extracelulares no processo de transdiferenciação”

Há a comunicação mediada por vesículas extracelulares (microvesículas e exossomos) entre os neurônios e as ADSC, e as vesículas extracelulares originadas dos neurônios estão envolvidas no processo de diferenciação neuronal das ADSC.

9.3 Estudo 3 -“Teste *in vivo* da capacidade de auxílio das ADSC-CC/Neuronais-like no processo da degeneração walleriana e regeneração de lesão de nervo periférico”

As células-tronco transdiferenciadas em linhagem neuronal, devido ao cocultivo com as células neuronais, auxiliam na regeneração de lesões em nervos periféricos, *in vivo*.

9.4 Conclusão Geral

Exossomos transmitem informações tais como SNAP25 e miRNAs (miR-9 e miR-132) das células do sistema nervoso para as ADSC, provavelmente influenciando na transdiferenciação das mesmas, e estas células transdiferenciadas auxiliam no reparo de lesões no sistema nervoso periférico.

REFERÊNCIAS

- ABDANIPOUR, A.; TIRAIHI, T. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1440, p. 23-33, Feb. 2012.
- ADAMS, M.; ARRUDA, E. M.; LARKIN, L. M. Use of adipose-derived stem cells to fabricate scaffoldless tissue-engineered neural conduits in vitro Neuroscience: Vol. 201, pp. 349-356, 2012. **Ann Neurosci**, Basel, v. 19, n. 4, p. 169, Oct. 2012.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar. 2003.
- AKERS, J. C. et al. miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients. **J Neurooncol**, New York, v. 123, n. 2, p. 205-16, Jun. 2015.
- ALIOTTA, J. M. et al. Alteration of marrow cell gene expression, protein production, and engraftment into lung by lung-derived microvesicles: a novel mechanism for phenotype modulation. **Stem Cells**, Dayton, v. 25, n. 9, p. 2245-56, Sep. 2007.
- ALIZADEH, R. et al. In vitro differentiation of neural stem cells derived from human olfactory bulb into dopaminergic-like neurons. **Eur J Neurosci**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 773-784, Mar. 2017.
- ALIĆ, I. et al. Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 634, p. 32-41, Nov. 2016.
- APEL, P. J. et al. Effect of locally delivered IGF-1 on nerve regeneration during aging: an experimental study in rats. **Muscle Nerve**, New York, v. 41, n. 3, p. 335-41, Mar. 2010.
- ATAI, N. A. et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. **J Neurooncol**, Boston, v. 115, n. 3, p. 343-51, Dec. 2013.
- BAGLIONI, S. et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. **FASEB J**, Bethesda, v. 23, n. 10, p. 3494-505, Oct. 2009.
- BAHMANI, L.; TAHA, M. F.; JAVERI, A. Coculture with embryonic stem cells improves neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Neuroscience**, Oxford, v. 272, p. 229-39, Jul. 2014.
- BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v. 83, n. 1, p. 129-38, Jan. 1989.
- BALAJI, S.; KESWANI, S. G.; CROMBLEHOLME, T. M. The role of mesenchymal stem cells in the regenerative wound healing phenotype. **Adv Wound Care**, New Rochelle, v. 1, n. 4, p. 159-165, Aug. 2012.
- BALLAS, N. et al. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 645-57, May. 2005.

- BARBA, M. et al. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. **Biomed Res Int**, New York, v. 2013, art. 416391, 2013.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan. 2004.
- BASSO, M.; BONETTO, V. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. **Front Neurosci**, Lausanne, v. 10, p. 127, 2016.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart: Edusp, 1976.
- BOBRIE, A. et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, Malden, v. 12, n. 12, p. 1659-68, Dec. 2011.
- BONAFEDE, R. et al. Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. **Exp Cell Res**, New York, v. 340, n. 1, p. 150-8, Jan. 2016.
- BRAUN, J. E.; MADISON, D. V. A novel SNAP25-caveolin complex correlates with the onset of persistent synaptic potentiation. **J Neurosci**, Baltimore, v. 20, n. 16, p. 5997-6006, Aug. 2000.
- BRONZI, D. et al. Neural markers expression in rat bone marrow mesenchymal stem cell cultures treated with neurosteroids. **Neurochem Res**, New York, v. 35, n. 12, p. 2154-60, Dec. 2010.
- BUENO, C. R. S. et al. Comparative study between standard and inside-out vein graft techniques on sciatic nerve repair of rats: muscular and functional analysis. **Acta Cir Bras**, Sao Paulo, v. 32, n. 4, p. 287-296, Apr. 2017.
- BÁTIZ, L. F. et al. Exosomes as novel regulators of adult neurogenic niches. **Front Cell Neurosci**, Lausanne, v. 9, art. 501, 2015.
- CAMUSSI, G. Stem Cell reviews and reports: microenvironment and extracellular microvesicles section. **Stem Cell Rev**, Totowa, v. 13, n. 1, p. 4, Feb. 2017.
- CAMUSSI, G. et al. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. **Am J Cancer Res**, Madison, v. 1, n. 1, p. 98-110, 2011.
- CARLSON, K. B. et al. Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination, and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin. **Glia**, New York, v. 59, n. 2, p. 267-77, Feb. 2011.
- CHANG, Q. et al. The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. **Neuron**, Cambridge, v. 49, n. 3, p. 341-8, Feb. 2006.
- CHEN, J.; LI, C.; CHEN, L. The role of microvesicles derived from mesenchymal stem cells in lung diseases. **Biomed Res Int**, New York, v. 2015, art. 985814, 2015.
- CHENG, T. L. et al. Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. **Sci Rep**, London, v. 7, p. 42790, Feb. 2017.

- CHIVET, M. et al. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. **J Extracell Vesicles**, Abingdon, v. 3, art. 24722, 2014.
- CHO, M. S. et al. Functional outcome following nerve repair in the upper extremity using processed nerve allograft. **J Hand Surg Am**, Maryland Heights, v. 37, n. 11, p. 2340-9, Nov. 2012.
- CHOPP, M.; ZHANG, Z. G. Emerging potential of exosomes and noncoding microRNAs for the treatment of neurological injury/diseases. **Expert Opin Emerg Drugs**, London, v. 20, n. 4, p. 523-6, 2015.
- CHUNG, J. Y. et al. Neuroprotective effects of adipose-derived stem cells against ischemic neuronal damage in the rabbit spinal cord. **J Neurol Sci**, Amsterdam, v. 317, n. 1-2, p. 40-6, Jun. 2012.
- CHURCH, C. D.; BERRY, R.; RODEHEFFER, M. S. Isolation and study of adipocyte precursors. **Methods Enzymol**, New York, v. 537, p. 31-46, 2014.
- COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 43-51, Feb. 2009.
- COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol**, Palo Alto, v. 30, p. 255-89, 2014.
- CONNOLLY, K. D. et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre- and post-adipogenesis. **J Extracell Vesicles**, Abingdon, v. 4, art. 29159, 2015.
- COONEY, D. S. et al. Mesenchymal stem cells enhance nerve regeneration in a rat sciatic nerve repair and hindlimb transplant model. **Sci Rep**, London, v. 6, art. 31306, Aug. 2016.
- DARVISHI, M. et al. Motor neuron transdifferentiation of neural stem cell from adipose-derived stem cell characterized by differential gene expression. **Cell Mol Neurobiol**, New York, v. 37, n. 2, p. 275-289, Mar. 2017.
- DE GASSART, A. et al. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? **Traffic**, Malden, v. 5, n. 11, p. 896-903, Nov. 2004.
- DEL CONDE, I. et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. **Blood**, New York, v. 106, n. 5, p. 1604-11, Sept. 2005.
- DELALOY, C. et al. MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 323-35, Apr. 2010.
- DHANASEKARAN, M. et al. Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Bank**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 303-15, Jun. 2013.

- DI VIZIO, D. et al. Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. **Cancer Res**, Baltimore, v. 69, n. 13, p. 5601-9, Jul. 2009.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.
- DROUIN-OUELLET, J. et al. REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. **EMBO Mol Med**, v. 9, n. 8, p. 1117-1131, 2017.
- DU, W. J. et al. Mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue maintain their immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation: role of HLA-G. **Stem Cells Dev**, Larchmont, v. 25, n. 19, p. 1454-69, Oct 2016.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev**, Woodbury, v. 15, n. 2, p. 188-200, Jan. 2001.
- ERCOLIN, A. C. et al. Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 59-66, Jan. 2016.
- FASOLINO, M.; ZHOU, Z. The crucial role of DNA methylation and MeCP2 in neuronal function. **Genes**, Basel, v. 8, n. 5, May. 2017.
- FITZNER, D. et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. **J Cell Sci**, London, v. 124, n. Pt 3, p. 447-58, Feb. 2011.
- FRANCO LAMBERT, A. P. et al. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? **Differentiation**, London, v. 77, n. 3, p. 221-8, Mar. 2009.
- FRIAND, V.; DAVID, G.; ZIMMERMANN, P. Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. **Biol Cell**, Chichester, v. 107, n. 10, p. 331-41, Oct. 2015.
- GAO, Z. et al. The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells. **J Neurosci**, Baltimore, v. 31, n. 26, p. 9772-86, Jun. 2011.
- GASPARINI, A. L. P.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Correlation between different methods of gait functional evaluation in rats with ischiatic nerve crushing injuries. **Acta Ortop Bras**, São Paulo, p. 285-289. 2007
- GENTILE, P. et al. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. **Stem Cells Transl Med**, Durham, v. 1, n. 3, p. 230-6, Mar. 2012.
- GIMBLE, J.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 362-9, 2003.
- GOLDMAN, S. A. Stem and progenitor cell-based therapy of the central nervous system: hopes, hype, and wishful thinking. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 174-88, Feb. 2016.

GONG, M. et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 28, p. 45200-45212, 2017.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, Abingdon, v. 2, Feb. 2013.

GRANT, G. A.; GOODKIN, R.; KLIOT, M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 44, n. 4, p. 825-39; discussion 839-40, Apr. 1999.

GÁLISOVÁ, A. et al. Multimodal imaging reveals improvement of blood supply to an artificial cell transplant site induced by bioluminescent mesenchymal stem cells. **Mol Imaging Biol**, New York, v. 19, n. 1, p. 15-23, Feb. 2017.

GÄRTNER, A. et al. Effects of umbilical cord tissue mesenchymal stem cells (UCX®) on rat sciatic nerve regeneration after neurotmesis injuries. **J Stem Cells Regen Med**, Chennai, v. 10, n. 1, p. 14-26, 2014.

HAENISCH, S. et al. SOX11 identified by target gene evaluation of miRNAs differentially expressed in focal and non-focal brain tissue of therapy-resistant epilepsy patients. **Neurobiol Dis**, Oxford, v. 77, p. 127-40, May. 2015.

HAN, C. et al. Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells. **Stem Cells Int**, London, v. 2016, art. 7653489, 2016.

HAN, X.; GROSS, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. **J Lipid Res**, Memphis, v. 44, n. 6, p. 1071-9, Jun. 2003.

HANADA, K.; DENNIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res**, New York, v. 12, n. 10, p. 1606-14, Oct. 1997.

HEI, W. H. et al. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) promotes crush-injured rat sciatic nerve regeneration. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 643, p. 111-120, Mar. 2017.

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**, New York, v. 94, n. 11, p. 3791-9, Dec. 1999.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. **Mol Cell Biol**, Bethesda, v. 18, n. 11, p. 6538-47, Nov. 1998.

HRDÝ, J. et al. The effect of the colostrum cells on gene expression of cytokines in cord blood cells. **Folia Microbiol**, Praha, Mar. 2017. (Epub ahead of print).

HSIEH, J.; ZHAO, X. Genetics and epigenetics in adult neurogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, Woodbury, v. 8, n. 6, art. a018911, 2016.

- HUANG, C. C. et al. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration. **Biomaterials**, Guilford, v. 111, p. 103-115, Dec. 2016.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, Palo Alto, v. 24, p. 677-736, 2001.
- HUANG, T. et al. Neuron-like differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro. **J Spinal Cord Med**, Abingdon, v. 30, suppl. 1, p. S35-40, 2007.
- HUNG, M. E.; LEONARD, J. N. A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery. **J Extracell Vesicles**, Abingdon v. 5, art. 31027, 2016.
- ISLAM, M. M.; ZHANG, C. L. TLX: A master regulator for neural stem cell maintenance and neurogenesis. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1849, n. 2, p. 210-6, Feb. 2015.
- ISLAMOV, R. R. et al. Synaptosome-associated protein 25 (SNAP25) synthesis in terminal buttons of mouse motor neuron. **Dokl Biochem Biophys**, Moscow, v. 464, p. 272-4, 2015.
- JANG, S. et al. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. **BMC Cell Biol**, London, v. 11, p. 25, Apr. 2010.
- JIANG, L. et al. Nerve defect repair by differentiated adipose-derived stem cells and chondroitinase ABC-treated acellular nerves. **Int J Neurosci**, New York, p. 1-9, Aug. 2015. (Epub ahead of print).
- JOBE, E. M. et al. Methyl-CpG-Binding protein MBD1 regulates neuronal lineage commitment through maintaining adult neural stem cell identity. **J Neurosci**, Baltimore, v. 37, n. 3, p. 523-536, Jan. 2017.
- JUNG, N. et al. Tonsil-derived mesenchymal stem cells differentiate into a schwann cell phenotype and promote peripheral nerve regeneration. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 17, n. 11, art. E1867, art. E1867, Nov. 2016.
- KALANI, A.; TYAGI, A.; TYAGI, N. Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. **Mol Neurobiol**, Clifton, v. 49, n. 1, p. 590-600, Feb. 2014.
- KALLIO, P. K.; VASTAMÄKI, M. An analysis of the results of late reconstruction of 132 median nerves. **J Hand Surg Br**, Edinburgh, v. 18, n. 1, p. 97-105, Feb. 1993.
- KANG, K. et al. The E3 ligase Mind bomb-1 (Mib1) modulates Delta-Notch signaling to control neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 288, n. 4, p. 2580-92, Jan. 2013.
- KEILHOFF, G. et al. Transdifferentiated mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination. **Cell Mol Neurobiol**, New York, v. 26, n. 7-8, p. 1235-52, 2006 Oct-Nov. 2006.
- KELL, D. B. et al. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 3, n. 7, p. 557-65, Jul. 2005.
- KEPPETIPOLA, N. et al. Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, Boca Raton, v. 47, n. 4, p. 360-78, 2012 Jul-Aug. 2012.

- KINGHAM, P. J. et al. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. **Stem Cells Dev**, Larchmont, v. 23, n. 7, p. 741-54, Apr. 2014.
- KISHI, K. et al. Distribution of adipose-derived stem cells in adipose tissues from human cadavers. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, Amsterdam, v. 63, n. 10, p. 1717-22, Oct. 2010.
- KURIHARA, Y. et al. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, decreases proliferation of and induces specific neurogenic differentiation of canine adipose tissue-derived stem cells. **J Vet Med Sci**, Tokyo, v. 76, n. 1, p. 15-23, Jan. 2014.
- KURODA, K. et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. **BMC Musculoskelet Disord**, London, v. 16, art. 236, Sep. 2015.
- LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Curr Biol**, London, v. 12, n. 9, p. 735-9, Apr. 2002.
- LAI, C. P.; BREAKEFIELD, X. O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. **Front Physiol**, Lausanne, v. 3, art. 228, 2012.
- LAI, C. P. et al. Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. **Nat Commun**, London, v. 6, p. 7029, May. 2015.
- LANDEIRA, B. S. et al. Activity-independent effects of CREB on neuronal survival and differentiation during mouse cerebral cortex development. **Cereb Cortex**, New York, Dec. 2016. (Epub ahead of print).
- LANE, S. W.; WILLIAMS, D. A.; WATT, F. M. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. **Nat Biotechnol**, New York, v. 32, n. 8, p. 795-803, Aug. 2014.
- LEE, D. C. et al. Neural stem cells promote nerve regeneration through IL12-induced Schwann cell differentiation. **Mol Cell Neurosci**, San Diego, v. 79, p. 1-11, Mar. 2017.
- LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **J Am Acad Orthop Surg**, Rosemont, v. 8, n. 4, p. 243-52, 2000.
- LI, N. et al. microRNAs: important regulators of stem cells. **Stem Cell Res Ther**, London, v. 8, n. 1, p. 110, May. 2017.
- LINARES, A. J. et al. The splicing regulator PTBP1 controls the activity of the transcription factor Pbx1 during neuronal differentiation. **Elife**, Cambridge, v. 4, p. e09268, Dec. 2015.
- LIU, C. et al. An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA-195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e51436, 2013.
- _____. Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 433-44, May. 2010.
- LIU, F. et al. Ketamine-induced neuronal damage and altered N-methyl-D-aspartate receptor function in rat primary forebrain culture. **Toxicol Sci**, Orlando, v. 131, n. 2, p. 548-57, Feb. 2013.

LOBB, R. J. et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. **J Extracell Vesicles**, Abingdon v. 4, p. 27031, 2015.

LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, P. R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. **ANZ J Surg**, Carlton, v. 79, n. 4, p. 235-44, Apr. 2009.

LOTVALL et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles **J Extracell Vesicles**, v. 3, p. 26913, 2014.

LUNYAK, V. V. et al. Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. **Science**, New York, v. 298, n. 5599, p. 1747-52, Nov. 2002.

LV, J. et al. The epigenetic switches for neural development and psychiatric disorders. **J Genet Genomics**, Beijing, v. 40, n. 7, p. 339-46, Jul. 2013.

LÖSCHE, W. et al. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. **Platelets**, Edinburgh, v. 15, n. 2, p. 109-15, Mar. 2004.

MAAS, S. L.; BREAKFIELD, X. O.; WEAVER, A. M. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 172-188, Mar. 2017.

MAGILL, S. T. et al. microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 107, n. 47, p. 20382-7, Nov. 2010.

MAKEYEV, E. V. et al. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. **Mol Cell**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 435-48, Aug. 2007.

MARCONI, S. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. **Tissue Eng Part A**, New Rochelle, v. 18, n. 11-12, p. 1264-72, Jun. 2012.

MARCUS, M. E.; LEONARD, J. N. FedExosomes: engineering therapeutic biological nanoparticles that truly deliver. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 5, p. 659-80, 2013.

MARESCHI, K. et al. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types. **Exp Hematol**, Amsterdam, v. 34, n. 11, p. 1563-72, Nov. 2006.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 10, p. 1907-20, Sept. 2010.

MATTHES, S. M. et al. Intravenous transplantation of mesenchymal stromal cells to enhance peripheral nerve regeneration. **Biomed Res Int**, New York, v. 2013, p. 573169, 2013.

MONACO, E. et al. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 75, n. 8, p. 1381-99, May. 2011.

- MOON, S. M. et al. Neuroprotective effects of adipose-derived stem cells are maintained for 3 weeks against ischemic damage in the rabbit spinal cord. **Biomed Res Int**, New York, v. 2014, art. 539051, 2014.
- MORELLO, M. et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 12, n. 22, p. 3526-36, Nov. 2013.
- MUKHERJEE, S. et al. REST regulation of gene networks in adult neural stem cells. **Nat Commun**, London, v. 7, p. 13360, Nov. 2016.
- MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **J Extracell Vesicles**, Abingdon v. 3, art. 24641, 2014.
- MURAI, K. et al. Nuclear receptor TLX stimulates hippocampal neurogenesis and enhances learning and memory in a transgenic mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 111, n. 25, p. 9115-20, Jun 2014.
- NAGHDI, M. et al. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. **Cytotherapy**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 137-52, 2009.
- NEO, W. H. et al. MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 289, n. 30, p. 20788-801, Jul. 2014.
- NING, H. et al. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. **Differentiation**, London, v. 74, n. 9-10, p. 510-8, Dec. 2006.
- OSSIPOVA, O.; EZAN, J.; SOKOL, S. Y. PAR-1 phosphorylates Mind bomb to promote vertebrate neurogenesis. **Dev Cell**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 222-33, Aug. 2009.
- OTTO, S. J. et al. A new binding motif for the transcriptional repressor REST uncovers large gene networks devoted to neuronal functions. **J Neurosci**, Baltimore, v. 27, n. 25, p. 6729-39, Jun. 2007.
- PALISPIS, W. A.; GUPTA, R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. **Exp Neurol**, Orlando, v. 290, p. 106-114, Apr. 2017.
- PETERSEN, P. H. et al. Progenitor cell maintenance requires numb and numblike during mouse neurogenesis. **Nature**, London, v. 419, n. 6910, p. 929-34, Oct. 2002.
- _____. Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis. **Nat Neurosci**, New York, v. 7, n. 8, p. 803-11, Aug. 2004.
- PRABHAKARAN, M. P.; VENUGOPAL, J. R.; RAMAKRISHNA, S. Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. **Biomaterials**, Guilford, v. 30, n. 28, p. 4996-5003, Oct. 2009.
- PRUNET-MARCASSUS, B. et al. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. **Exp Cell Res**, New York, v. 312, n. 6, p. 727-36, Apr. 2006.
- QUEK, C.; HILL, A. F. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v. 483, n. 4, p. 1178-1186, Feb. 2017.

QUESENBERRY, P. J. et al. Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. **Stem Cell Res Ther**, London, v. 6, p. 153, Sep. 2015.

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. 847-56, May. 2006.

_____. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, London, v. 20, n. 9, p. 1487-95, Sept. 2006.

REICHENBERGER, M. A. et al. ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model. **Microsurgery**, Hoboken, v. 36, n. 6, p. 491-500, Sept. 2016.

ROBALLO, K. C. S. et al. Porcine adipose-derived stem cells are induced toward neurogenic lineages by cell-to-cell interactions but not by soluble factors released by neurons isolated from adult and fetal brain. **Reprod Fertil Dev**, Clayton, v. 25, n. 1, p. 289, 2013.

_____. Regulation of neural stem cells by choroid plexus cells population. **Neurosci Lett**, Limerick, v. 626, p. 35-41, 2016.

ROBINSON, L. R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle Nerve**, Hoboken, v. 23, n. 6, p. 863-73, Jun. 2000.

ROOJ, A. K.; MINEO, M.; GODLEWSKI, J. MicroRNA and extracellular vesicles in glioblastoma: small but powerful. **Brain Tumor Pathol**, Tokyo, v. 33, n. 2, p. 77-88, 2016.

SEDDON, H. **Surgical disorders of the peripheral nerves**. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1972.

SETOGUCHI, H. et al. Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. **J Neurosci Res**, New York, v. 84, n. 5, p. 969-79, Oct. 2006.

SHAHBAZIAN, M. D. et al. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 115-24, Jan. 2002.

SHER, F. et al. Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: involvement of the polycomb group protein Ezh2. **Stem Cells**, Basel, v. 26, n. 11, p. 2875-83, Nov. 2008.

SHI, F. et al. Cellular Prion Protein promotes neuronal differentiation of adipose-derived stem cells by upregulating miRNA-124. **J Mol Neurosci**, Totowa, v. 59, n. 1, p. 48-55, May. 2016.

SHI, Y. et al. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. **Nature**, London, v. 427, n. 6969, p. 78-83, Jan. 2004.

SHIMAMURA, N. et al. Neuro-regeneration therapy using human Muse cells is highly effective in a mouse intracerebral hemorrhage model. **Exp Brain Res**, Berlin, v. 235, n. 2, p. 565-572, Feb. 2017.

SINGH, A. B.; HARRIS, R. C. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. **Cell Signal**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 1183-93, Oct. 2005.

SKAPER, S. D. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, Bussum, v. 7, n. 1, p. 46-62, Feb. 2008.

_____. Peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 17, n. 25, p. 2704-18, 2011.

SKAPER, S. D. et al. Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. **J Neurochem**, Oxford, v. 70, n. 5, p. 1859-68, May. 1998.

SMRT, R. D. et al. MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. **Stem Cells**, Basel, v. 28, n. 6, p. 1060-70, Jun. 2010.

SOWA, Y. et al. Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v. 137, n. 2, p. 318e-330e, Feb. 2016.

STOORVOGEL, W. et al. The biogenesis and functions of exosomes. **Traffic**, Malden, v. 3, n. 5, p. 321-30, May. 2002.

SUN, G. et al. miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. **Nat Commun**, London, v. 2, p. 529, Nov. 2011.

_____. Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 104, n. 39, p. 15282-7, Sep. 2007.

SVENSSON, K. J. et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 288, n. 24, p. 17713-24, Jun. 2013.

TAKEDA, Y. S.; XU, Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 8, art. e0135111, 2015.

TANG, X. D. et al. Mesenchymal stem cell microvesicles attenuate acute lung injury in mice partly mediated by Ang-1 mRNA. **Stem Cells**, Basel, v. 35, n. 7, p. 1849-1859, Jul. 2017.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, London, v. 455, n. 7216, p. 1124-8, Oct. 2008.

TECHNAU, A. et al. Adipose tissue-derived stem cells show both immunogenic and immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation. **Cytotherapy**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 310-7, Mar. 2011.

THERY, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. **F1000 Biol Rep**, London, v. 3, art. 15, 2011.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, n. 8, p. 569-79, 2002.

- TRAKTUEV, D. O. et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circ Res**, Baltimore, v. 102, n. 1, p. 77-85, Jan. 2008.
- ULE, J.; DARNELL, R. B. RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity. **Curr Opin Neurobiol**, London, v. 16, n. 1, p. 102-110, Feb. 2006.
- VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, London, v. 9, n. 6, p. 654-9, Jun. 2007.
- VERONESI, F. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: state-of-the-art in in vivo studies. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v. 102, n. 7, p. 2448-66, Jul. 2014.
- VLASSOV, A. V. et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1820, n. 7, p. 940-8, Jul. 2012.
- VOULGARI-KOKOTA, A. et al. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. **Exp Neurol**, Orlando, v. 236, n. 1, p. 161-70, Jul. 2012.
- VUONG, C. K.; BLACK, D. L.; ZHENG, S. The neurogenetics of alternative splicing. **Nat Rev Neurosci**, London, v. 17, n. 5, p. 265-81, May. 2016.
- VUONG, J. K. et al. PTBP1 and PTBP2 serve both specific and redundant functions in neuronal Pre-mRNA splicing. **Cell Rep**, New York, v. 17, n. 10, p. 2766-2775, Dec. 2016.
- WANG, G. et al. Human eyelid adipose tissue-derived Schwann cells promote regeneration of a transected sciatic nerve. **Sci Rep**, London, v. 7, p. 43248, Mar. 2017.
- WANG, J. et al. No synergistic effect of mesenchymal stem cells and exercise on functional recovery following sciatic nerve transection. **Funct Neurol**, Rome, v. 25, n. 1, p. 33-43, 2010.
- WANG, S. et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. **J Neurosci**, Baltimore, v. 31, n. 20, p. 7275-90, May. 2011.
- WANKHADE, U. D. et al. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. **Stem Cells Int**, London, v. 2016, art. 3206807, 2016.
- WESTRICH, J. et al. Factors affecting residence time of mesenchymal stromal cells (MSC) injected into the myocardium. **Cell Transplant**, Thousand Oaks, v. 19, n. 8, p. 937-48, 2010.
- WURZELMANN, M.; ROMEIKA, J.; SUN, D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. **Neural Regen Res**, Mumbai, v. 12, n. 1, p. 7-12, Jan. 2017.
- XIE, S. et al. Efficient generation of functional Schwann cells from adipose-derived stem cells in defined conditions. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 16, n. 9, p. 841-851, May. 2017.

XIN, H. et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. **Stem Cells**, Basel, v. 31, n. 12, p. 2737-46, Dec. 2013.

XU, B. et al. Neurons secrete miR-132-containing exosomes to regulate brain vascular integrity. **Cell Res**, Basingstoke, v. 27, n. 7, p. 882-897, Jul. 2017.

XU, Y. et al. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. **BMC Neurosci**, London, v. 9, p. 21, Feb. 2008.

YATES, J. R., 3RD. Mass spectrometry from genomics to proteomics. **Trends Genet**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 5-8, Jan. 2000.

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. **Dev Neurobiol**, Hoboken, v. 70, n. 5, p. 304-22, Apr. 2010.

ZAVAN, B. et al. Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. **Neurol Res**, Abingdon, v. 32, n. 1, p. 47-54, Feb. 2010.

ZHANG, J. et al. Ezh2 regulates adult hippocampal neurogenesis and memory. **J Neurosci**, Baltimore, v. 34, n. 15, p. 5184-99, Apr. 2014.

_____. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, Beijing, v. 13, n. 1, p. 17-24, Feb. 2015.

ZHANG, T. et al. Edaravone promotes functional recovery after mechanical peripheral nerve injury. **Neural Regen Res**, Mumbai, v. 9, n. 18, p. 1709-15, Sept. 2014.

ZHANG, X. et al. Cell-type-specific alternative splicing governs cell fate in the developing cerebral cortex. **Cell**, Cambridge, v. 166, n. 5, p. 1147-1162.e15, Aug. 2016.

_____. Coculture of mesenchymal stem cells and endothelial cells enhances host tissue integration and epidermis maturation through AKT activation in gelatin methacryloyl hydrogel-based skin model. **Acta Biomater**, Kidlington, v. 59, p. 317-326, 2017.

ZHAO, C. et al. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. **Nat Struct Mol Biol**, New York, v. 16, n. 4, p. 365-71, Apr. 2009.

_____. MicroRNA let-7d regulates the TLX/microRNA-9 cascade to control neural cell fate and neurogenesis. **Sci Rep**, London, v. 3, p. 1329, 2013.

ZHOU, C. et al. MicroRNA 302/367 cluster effectively facilitates direct reprogramming from human fibroblasts into functional neurons. **Stem Cells Dev**, Larchmont, v. 24, n. 23, p. 2746-55, Dec. 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Detalhamento da imunocitoquímica do estudo 1, para os marcadores neuronais TUBIII e SNAP25.

Para garantir que não houve marcação inespecífica dos anticorpos, foram utilizados como controle positivo os próprios neurônios (Figuras 1 e 2), e como se pode observar a seguir há uma população de células positivas aos anticorpos. E como controle negativo dos marcadores as ADSC sem o tratamento (Figuras 3 e 4).

Figura 1. Cultivo de neurônios

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar nas figuras acima a marcação da proteína Beta tubulina III em células de cultivo primário de cérebro de camundongo, utilizadas no experimento 1. Barra= 100µm.

Figura 2. Cultivo de neurônios

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar nas figuras a marcação da proteína SNAP25 em células de cultivo primário de cérebro de camundongo, utilizadas no experimento 1. Barra= 100µm.

Figura 3. Cultivo de células-tronco sem tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar nas figuras acima as células de cultivo primário de ADSC de camundongo utilizadas como controle, utilizadas no experimento 1. Não houve a marcação da proteína Beta tubulina III. Barra= 100µm.

Figura 4. Cultivo de células-tronco sem tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar nas figuras acima as células de cultivo primário de ADSC de camundongo utilizadas como controle, utilizadas no experimento 1, não houve a marcação da proteína SNAP25. Barra= 100µm.

Desta forma, foi realizado o estudo 1 do projeto em que os neurônios foram cocultivados com células-tronco mesenquimais de três animais, durante três, sete e 14 dias, e avaliada por imunocitoquímica as taxas de diferenciação celular dos marcadores neuronais beta tubulina III (TUBIII) e SNAP25 (SNAP), conforme pode-se observar nas imagens a seguir, onde foram obtidas células positivas para os dois marcadores durante os três períodos analisados nos três animais analisados (Figuras 5-10).

As células foram colocadas em cultivo ao mesmo tempo: as ADSC foram colocadas na placa de cultivo e as células neuronais nos insertos.

Figura 5. Imunocitoquímica para beta tubulina III no terceiro dia de tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar as ADSC positivas para o marcador neuronal em todos os animais analisados após três dias de cocultivo. A1-A3 indicam os animais avaliados. D3 dia três de cocultivo. DAPI marcação nuclear. MERGED a combinação do DAPI com a marcação de fluorescência verde do anticorpo. Barra=100µm.

Figura 6. Imunocitoquímica para beta tubulina III no sétimo dia de tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar as ADSC positivas para o marcador neuronal em todos os animais analisados após sete dias de cocultivo. A1-A3 indicam os animais avaliados. D7 dia 7 de cocultivo. DAPI marcação nuclear. MERGED a combinação do DAPI com a marcação de fluorescência verde do anticorpo. Barra=100µm.

Figura 7. Imunocitoquímica para beta tubulina III no 14º dia de tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar as ADSC positivas para o marcador neuronal em todos os animais analisados após 14 dias de cocultivo. A1-A3 indicam os animais avaliados. D14 dia 14 de cocultivo. DAPI marcação nuclear. MERGED a combinação do DAPI com a marcação de fluorescência verde do anticorpo. Barra=100µm.

Figura 8. Imunocitoquímica para SNAP25 no terceiro dia de tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar as ADSC positivas para o marcador neuronal em todos os animais analisados após três dias de cocultivo. A1-A3 indicam os animais avaliados. D3 dia 3 de cocultivo. DAPI marcação nuclear. MERGED a combinação do DAPI com a marcação de fluorescência verde do anticorpo. Barra=100µm.

Figura 9. Imunocitoquímica para SNAP25 no sétimo dia de tratamento

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar as ADSC positivas para o marcador neuronal em todos os animais analisados após sete dias de cocultivo. A1-A3 indicam os animais avaliados. D7 dia 7 de cocultivo. DAPI marcação nuclear. MERGED a combinação do DAPI com a marcação de fluorescência verde do anticorpo. Barra=100µm.

Figura 10. Imunocitoquímica para SNAP25 no 14º dia de tratamento.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Observar as ADSC positivas para o marcador neuronal em todos os animais analisados após 14 dias de cocultivo. A1-A3 indicam os animais avaliados. D14 dia 14 de cocultivo. DAPI marcação nuclear. MERGED a combinação do DAPI com a marcação de fluorescência verde do anticorpo. Barra=100µm

ANEXOS

ANEXO A – Artigo Submetido

Co-culture and cell-secreted vesicles from brain cells are involved in mesenchymal stem cell neural differentiation: A model to prevent peripheral nerve injury degeneration

Journal:	Stem Cells
Manuscript ID:	SC-17-0330
Wiley - Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	17-Aug-2017
Complete List of Authors:	Roballo, Kelly; Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of Sao Paulo, Coelho da Silveira, Juliano; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Bressan, Fabiana ; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia Souza, Aline; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Pereira, Vitoria ; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Ros, Felipe ; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Hildebrand Pulz, Lidia; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia Strefezzi, Ricardo ; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia Martins, Daniele; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Meirelles, Flavio; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Ambrosio, Carlos Eduardo; School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Surgery, Anatomy;
Keywords:	adipose stem cells, Differentiation, Gene expression, Neural differentiation, Nervous system, Stem cells
Journal Section:	Tissue-Specific Stem Cells
Cell Types:	Mesenchymal Stem Cells, Adipose Stem Cells/VSF, Adult Stem Cells
Diseases/Processes/Areas:	Cell Delivery Strategies, Neurodegeneration / Neurological Disorders, Transdifferentiation / Direct reprogramming

ANEXO B – Parecer do comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "COMUNICAÇÃO EXOSSOMAL NA TRANSFERÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO EM CO-CULTIVO COM CÉLULAS NEURONAIS", protocolado sob o CEUA nº 7347240915, sob a responsabilidade de **Kelly Cristina Santos Roballo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP em reunião de 18/11/2015.

We certify that the proposal "Exosomal communication in the stem cell transdifferentiation in co-culture with neuronal cells", utilizing 16 isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 7347240915, under the responsibility of **Kelly Cristina Santos Roballo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - It's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering of São Paulo University in the meeting of 11/18/2015.

Vigência da Proposta: de 10/2015 a 04/2019

Área: Departamento De Medicina Veterinária

Procedência: Biotério Externo

Espécie: Camundongos isogênicos

Gênero: Machos e Fêmeas

Idade: 4 meses

N: 16

Linhagem: C57BL/6 e CBA

Peso: 25-50 g

Nota: As células-tronco do tecido adiposo (sigla em inglês ADSC) em co-cultivo com células neuronais podem se transdiferenciar devido a fatores originados das células neuronais, um estado de sinalização paracrina de células neuronais, provavelmente via exossomo. Em nosso estudo observaremos a transdiferenciação das ADSC, buscando identificar os novos tipos celulares neuronais em que as ADSC podem se transdiferenciar; e analisar uma das vias de comunicação celular a fim de explicar a indução celular de células específicas perante as células-tronco. Nosso objetivo é compreender se o processo de transdiferenciação é possível através apenas da interação física entre uma célula-tronco e uma célula neuronal, sem nenhum meio de indução, assim como estudar a comunicação exossomal como um dos prováveis mecanismos de comunicação celulares envolvidos, e se, as células-tronco transdiferenciadas possuem funcionalidade quando in vivo. Para uma melhor compreensão deste processo de reprogramação celular, utilizaremos metodologias in vivo e in vitro. No estudo in vitro utilizaremos o camundongo como modelo animal, e realizaremos técnicas inovadoras de co-cultivo (células-tronco com células neuronais) e realizaremos o isolamento dos exossomos para a análise de um dos mecanismos da comunicação celular e análises in vitro da transdiferenciação e funcionalidade de tais células por meio de expressão gênica. No estudo in vivo realizaremos o transplante autólogo de ADSC em lesão de nervo periférico a fim de avaliar a se tais células auxiliam na regeneração do nervo. Com este projeto poderemos compreender melhor o processo de comunicação celular entre as células-tronco e as células somáticas, além de ampliar a abrangência das terapias celulares na regeneração tecidual em lesões do sistema nervoso.

Pirassununga, 21 de dezembro de 2015

Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Universidade de São Paulo