

ALINE MARTINS DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DAS MICROVESÍCULAS NAS CÉLULAS DO
EPITÉLIO CILIAR DE ROEDORES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

ALINE MARTINS DE ALMEIDA

Caracterização das microvesículas nas células do Epitélio Ciliar de roedores

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio

Versão original

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Martins de Almeida, Aline

Caracterização das Microvesículas nas Células do Epitélio Ciliar de Roedores / Aline Martins de Almeida; orientadora Profa. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio. -- São Paulo, 2019.

67 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Epitélio Ciliar. 2. Degeneração Retiniana. 3. Vesículas Extracelulares. I. Beltrame Del Debbio, Profa. Dra. Carolina , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Martins de Almeida

Título da Dissertação: Caracterização das microvesículas nas células do Epitélio Ciliar de roedores

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Líneu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Degeneração e regeneração da retina e vítreo*", registrada sob nº 75, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 25/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) *Dânia Emi Hamassaki* (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Davi Chen Wu, Gabriela de Jesus Lustoza Costa, Ana Carolina Gualassi, Juliana Mendes Piovesan, Raquel Cecília Teles Rodrigues, Carolina Beltrame Del Debbio, Priscilla Sayami Akamine*. Esta licença de uso de animais expira em 25/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Degeneration and regeneration of retina and vitreous*", registered as **Number 75**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/25/2015.

Under this license, *Dânia Emi Hamassaki* (Principal Investigator) and team members *Davi Chen Wu, Gabriela de Jesus Lustoza Costa, Ana Carolina Gualassi, Juliana Mendes Piovesan, Raquel Cecília Teles Rodrigues, Carolina Beltrame Del Debbio, Priscilla Sayami Akamine* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/25/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico primeiramente a Deus este trabalho, por sempre estar ao meu lado cuidando de mim, me guiando em cada caminho, por me dar sua força e coragem em todas as circunstâncias, por me conceder sua verdadeira alegria, por transformar minha vida com seu infinito amor, por nunca me abandonar, por me amar com todas qualidades e apesar de todos meus defeitos, por fazer da minha vida um testemunho do quão infinita e grandiosa és tua graça e misericórdia, o meu amor e minha eterna gratidão ao senhor, o meu Deus.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, advogado fiel, fonte infinita de amor e misericórdia. Porque dele, por ele e para ele são todas as coisas.

Aos meus familiares, em especial meus pais Adão e Luciana por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, por seu amor... Sem o apoio de vocês eu não teria chegado aqui.

Aos meus tios Gisele e Leonardo, que além de tios são meus melhores amigos... Obrigado por seu amor e carinho, por acreditarem em mim, por todas palavras de incentivo e encorajamento.

A minha avó Nilda por todo amor e incentivo.

Aos meus amigos por todas mensagens positivas, por todo carinho e compreensão.

Tudo isso só foi possível, porque eu tenho cada um de vocês na minha vida. Eu amo vocês.

Á minha orientadora e amiga Carolina, por ter dado oportunidade a uma completa estranha, por acreditar em mim, por todas as palavras de incentivo, por ter me ensinado tanto, meu carinho e gratidão.

As professoras Marinilce e Vanessa por todo ensinamento compartilhado durante a coordenação no estágio PAE.

Às técnicas Sayami e Marley, pela amizade, colaboração, apoio, por toda ajuda e ensinamentos.

As amigadas que aqui construí, Luciana, Michele, Marília... Obrigada pela amizade, carinho e por trazer tanta alegria para meus dias.

Aos colegas de laboratório, Barbara, Lorena, Paula, Rafael e Gabriela por toda compreensão e compartilharem as angústias, alegrias e parceria.

Aos funcionários do Biotério do Departamento, por todo o apoio.

À Tania, secretária da pós-graduação, pela atenção dispensada e coordenação.

A todos professores que tive a oportunidade de conviver e aprender aos longos desses anos.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

ALMEIDA, A.M. **Caracterização das microvesículas nas células do epitélio ciliar de roedores**. 2019. 67 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O aumento da expectativa de vida dos seres humanos favoreceu o aumento do diagnóstico de doenças crônico-degenerativas, dentre elas as que acometem o sistema visual. Uma vez que as células neuronais não são capazes de regeneração espontânea, diversas patologias como a Retinose Pigmentar (RP), glaucoma, Degeneração Macular Relacionada com a Idade (DMRI), dentre outras, podem levar a lesão tecidual e cegueira. O Epitélio Ciliar (EC), um tecido adjacente à retina, tem se demonstrado uma fonte promissora de células-tronco/progenitoras retinianas, uma vez que estas células podem ser reprogramadas em células-tronco e se diferenciarem em neurônios retinianos *in vitro*. Apesar desse potencial, estas células apresentam capacidade regenerativa limitada, que pode ser controlada por fatores e sinalizações contidas no microambiente. As vesículas extracelulares (VE) são sintetizadas e liberadas por células ao ambiente e podem conter componentes sinalizadores, inclusive inibitórios da capacidade de reprogramação. Este trabalho teve como objetivo estudar a maquinaria de síntese de VEs presentes nas células do EC, assim como caracterizar as VEs liberadas por estas células quanto a sua quantidade, tamanho e morfologia. Além disso, também investigamos a capacidade de liberação de VEs em modelo animal de degeneração retiniana (p23H) em comparação com animais sem degeneração. Nossos resultados indicaram que as células do EC apresentaram microvesículas em seu citoplasma e que expressaram os transcritos dos marcadores mais comuns da biogênese de microvesículas (*Alix*, *CD63*, *CD81*, *Anexina V*, *EpCAM*, *ICAM*, *TSG101* e *HSP70*). A análise de Rastreamento de Nanopartículas (tamanho e concentração) indicaram que as células do EC foram capazes de liberar VEs de diferentes tamanhos, variando entre 100 e 1000 nm. Os animais modelos de degeneração retiniana expressaram menos marcadores de VEs em comparação com os animais controles, porém, as vesículas liberadas apresentaram maior tamanho. Nossos resultados sugerem que as VEs das

células do EC podem ser um mecanismo de comunicação celular e a degeneração retiniana podem regular a síntese e liberação destas VEs.

Palavras-Chaves: Epitélio Ciliar. Vesículas Extracelulares. Degeneração Retiniana

ABSTRACT

ALMEIDA, A.M. **Characterization of microvesicles in rodent ciliary epithelial cells.** 2019. 67 Pages. Master Thesis (Systems Biology Program) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

The increased life expectancy of humans favored the increased diagnosis of chronic degenerative diseases, including those affecting the visual system. Since neuronal cells are not capable of spontaneous regeneration, different pathologies such as Retinitis Pigmentosa (RP), glaucoma, Age Macular Degeneration (AMD), can lead to tissue damage and blindness. Ciliary Epithelium (CE), an epithelial tissue adjacent to the retina, is a promising source of retinal stem/progenitor cells, as these cells can be reprogrammed into stem cells and differentiate into retinal neurons *in vitro*. Despite this potential, these cells have limited regenerative capacity, which can be controlled by factors and signals in the microenvironment. Extracellular vesicles (EVs) are synthesized and released by cells into the environment and may contain signaling components, including inhibitors of reprogramming ability. This work aimed to study the synthesis machinery of EVs present in the cells of the CE, as well as characterize its releases by these cells in terms of quantity, size and morphology. In addition, we also investigated EVs release capacity in an animal model of retinal degeneration (p23H) compared to animals without degeneration. Our results indicated that CE cells presented microvesicles in their cytoplasm and expressed the transcripts of the most common microvesicle biogenesis markers (Alix, CD63, CD81, Annexin V, EpCAM, ICAM, TSG101 and HSP70). Nanoparticle Tracking Analysis (size and concentration) indicated that CE cells were able to release EVs of different sizes, ranging from 100 to 1000 nm. Retinal degeneration model animals expressed fewer EVs markers compared to control animals, but released vesicles were larger. Our results suggest that EVs from CE cells may be a mechanism of cellular communication, and retinal degeneration may regulate the synthesis and release of these EVs.

Keywords: Ciliary Epithelium. Extracellular vesicles. Retinal Degeneration

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
Ascl1a	<i>Achaete-scute homolog 1a</i>
Brdu	<i>5-Bromo-2'-deoxyuridine</i>
CC	Corpo Ciliar
CCHC	<i>CysCysHisCys</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (DNA complementar)
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEFAP-USP	Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CHX10	<i>Ceh-10 Homeo Domain Containing Homolog</i>
C-Myc	<i>Cellular Myelocytomatosis</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
CCG	Camada das células ganglionares
CRX	<i>Cone-rod homeobox</i>
CSD	<i>Cold Shock Domain</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	<i>4', 6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DGCR8	<i>Digeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
EC	Epitélio Ciliar

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetraacético)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidermal)
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
ENP	Epitélio Não-Pigmentado
EP	Epitélio Pigmentado
EPR	Epitélio Pigmentado Retiniano
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Fibroblástico)
GADPH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde)
GLAST	<i>Glutamate Aspartate Transporter</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HSPD1	<i>Heat Shock 60kDa Protein 1</i>
IPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i> (Células-tronco pluripotente induzida)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ki67	Kiel clone 67
Lhx2	<i>LIM homeobox 2</i>
mGluR6	<i>metabotropic Glutamate Receptor 6</i> (Receptor metabotrópico de Glutamato 6)
MVBs	Corpos multivesiculares
MPS1	<i>Mucopolysaccharidosis type I</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
NGF1a	<i>Nerve growth factor 1a</i>
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
Otx2	<i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
P23H	Roedor modelo de degeneração retiniana

Pax6	<i>Paired box protein 6</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
Pre E	<i>Precursor Element</i> (Elemento Precursor)
qPCR	<i>quantitative PCR</i> (PCR quantitativo)
RD	Retinopatia Diabética
RNase	Ribonuclease
Rx	<i>Retinal homeobox</i>
SD	Sprague Dawley (modelo de roedor)
SNC	Sistema Nervoso Central
Sox2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20</i>
TCF3	<i>Transcription Factor 3</i>
TUTase	<i>Trypanosome Mitochondrial 3' Terminal Uridylyl Transferase</i>
U.A.	Unidade Arbitrária
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VEs	Vesículas extracelulares
ZMC	Zona Marginal Ciliar

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho esquemático de um corte transversal do olho humano com destaque para um aumento na área da retina .	17
Figura 2. Imagem ilustrativa de um corte sagital da região periférica da retina de pintos pós-eclosão mostrando a presença da Zona Marginal Ciliar (ZMC) e o Corpo Ciliar .	22
Figura 3. Desenho esquemático do Epitélio Ciliar (EC).	23
Figura 4: Esquema representativo da biogênese e liberação das VEs.	26
Figura 5: Imagem ilustrativa dos diferentes tipos de tamanhos de VEs.	27
Figura 6: Imagem ilustrativa dos componentes das vesículas extracelulares.	29
Figura 7. Micrografia eletrônica de transmissão das células do Epitélio Ciliar.	39
Figura 8. Presença de Marcadores de microvesículas.	40
Figura 9 - Expressão transcricional de Marcadores de microvesículas nas células do EC.	42
Figura 10. Análise do tamanho das partículas por rastreamento de partículas em aparelho NanoSight.	44
Figura 11. Morfologia das Vesículas Extracelulares.	46
Figura 12. Genotipagem dos animais P23H.	47
Figura 13. Análise morfológica por Hematoxilina e Eosina em cortes transversais de retinas de animais normais Sprague Dawley (SD).	49
Figura 14. Análise morfológica por Hematoxilina e Eosina de cortes transversais do Epitélio Ciliar de animais normais Sprague Dawley (SD) e com degeneração retiniana P23H.	50
Figura 15 - Expressão transcricional de marcadores de microvesículas nos modelos de degeneração retiniana.	52
Figura 16. Análise do tamanho das partículas por rastreamento de partículas em aparelho NanoSight.	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Retina	16
1.2 Degeneração Retiniana	18
1.3 Terapia Regenerativa Celular	20
1.4 Epitélio Ciliar e sua capacidade regenerativa	21
1.5 Corpo Ciliar e Epitélio Ciliar da Retina	22
1.6 Vesículas Extracelulares	24
1.6.1 Definição e Nomenclaturas	24
1.6.2 Conteúdo e função das vesículas extracelulares	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos Gerais	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Modelo Experimental	32
3.2 Genotipagem	32
3.3 PCR para Genotipagem	32
3.4 Coleta das células do Epitélio Ciliar	33
3.5 Cultura celular para coleta de Vesículas Extracelulares	34
3.6 Isolamento e extração das Vesículas Extracelulares	34
3.7 Análise de Rastreamento de Nanopartículas	34
3.8 Extração de RNA	35
3.9 Síntese de cDNA	35
3.10 PCR em tempo real	36
3.11 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Presença de estruturas microvesiculares nas células do Epitélio Ciliar	38
4.2 Caracterização semi quantitativa dos marcadores envolvidos na biogênese de microvesículas nas células do Epitélio Ciliar	40
4.3 Expressão transcricional dos marcadores microvesiculares	41
4.4 Quantificação de Microvesículas liberadas pelas células do EC	43
4.5 Análise Morfológica das Microvesículas do EC	45
4.6 Genotipagem dos animais P23H	47
4.7 Evolução da degeneração retiniana nos animais P23H	48
4.8 Expressão dos marcadores microvesiculares no EC de animais com degeneração retiniana	51
4.9 Quantificação de Microvesículas liberadas pelas células do EC	53
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, observa-se um aumento também no diagnóstico de doenças crônicas degenerativas, tais como complicações cardíacas, diabetes e degenerações neuronais, dentre elas, as degenerações que afetam o sistema visual (IBGE, 2018).

No Brasil, a deficiência visual apresenta a maior taxa de incidência dentre as deficiências físico-sensoriais investigadas (visual, auditiva, motora e mental, respectivamente), atingindo mais de 100 milhões de brasileiros, segundo dados do *CENSO de 2010* realizado pelo *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE*. Dentre as regiões com maior incidências estão as grandes capitais, sendo em primeiro lugar São Paulo com mais de 40 milhões, seguido por Minas Gerais com mais de 19 milhões de casos, e em terceiro lugar o Rio de Janeiro, com mais de 15 milhões (CENSO, 2010).

Do ponto de vista médico e social, a perda visual causa impacto pessoal, familiar e social, podendo incluir imobilidade psicológica, retardo psicomotor pela dificuldade em deambular e se situar no ambiente, aumentando a incidência de quedas e fraturas. Sabe-se que graus elevados de perda visual podem estar associados a um risco aumentado de depressão, transtornos de ansiedades e crises de pânico, além da necessidade de um cuidador em tempo integral ou de internação em casas de repouso.

Dentre todas as estruturas do olho, a retina é o tecido que faz parte do sistema nervoso central e que capta diretamente o estímulo luminoso, sendo essencial para o processo visual.

1.1 Retina

A retina humana tem cerca de 4,6 milhões de fotorreceptores do tipo cone e 92 milhões de fotorreceptores do tipo bastonete (CURCIO ET AL., 1990). Está localizada na parte interna/posterior do olho e é composta por camadas de células intercaladas por duas camadas sinápticas (Figura 1). A região de maior acuidade visual é a região da fóvea (região central da retina), devido à grande concentração de cones. Na região periférica da retina existe uma diminuição na concentração dos cones e, conseqüentemente, um

aumento no número de bastonetes (KOLB ET AL., 2001; CURCIO ET AL., 1990).

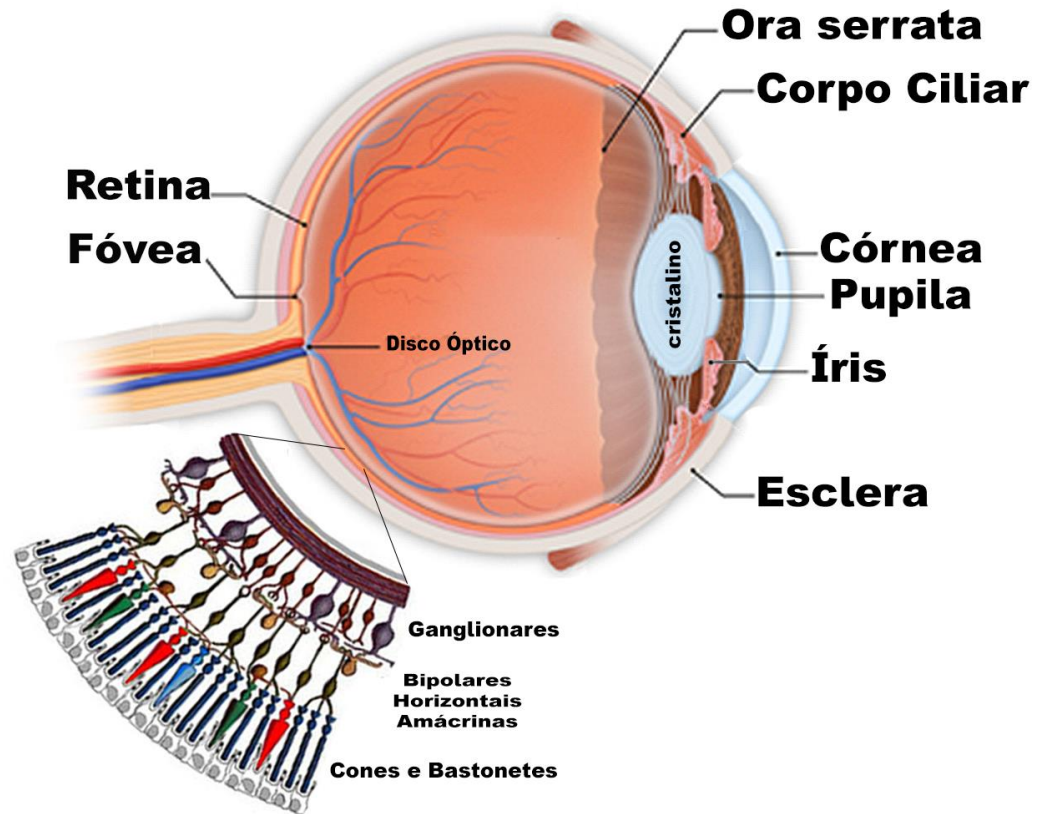


Figura 1 – Desenho esquemático de um corte transversal do olho humano com destaque para um aumento na área da retina. A luz atravessa as estruturas internas do olho até chegar na retina. Os fotorreceptores cones e bastonetes, localizados na Camada Nuclear Externa, irão realizar a fototransdução. O sinal visual é modulado pelos neurônios Bipolares, Amácrinas e Horizontais localizados na Camada Nuclear Interna, e pelas células Ganglionares, cujos axônios originam o nervo óptico. A imagem da retina é enviada ao córtex visual primário, localizado no lobo occipital do cérebro (adaptado de <https://webvision.med.utah.edu> e <https://www.aao.org>).

O estímulo visual ocorre quando os fotorreceptores se tornam hiperpolarizados sob estímulo luminoso, sendo este processo denominado de fototransdução. A fototransdução é o processo onde o fóton (luz) é reconhecido pelos pigmentos específicos dos receptores de membrana contidos nos segmentos dos fotorreceptores, que iniciam uma cascata de sinalização

intracelular. O segmento externo dos fotorreceptores contém fotopigmentos com características diferentes nos cones e bastonetes (*BROWN ET AL., 1964*).

Os fotopigmentos são compostos por uma apo-proteína denominada de opsina, ligada a uma outra molécula cromófora, 11-cis-retinaldeído, proveniente da vitamina A1 (*COHEN ET AL., 1992*). Esses fotopigmentos são diferenciados nos cones e bastonetes e reconhecem diferentes comprimentos de ondas dos fótons: cone azul (450 nm), verde (530 nm) e vermelho (565 nm); bastonetes (500 nm) (*BUCZYLKO ET AL., 1996; COHEN ET AL., 1992; AYOUB ET AL., 1991; KÜHN ET AL., 1977; BROWN ET AL., 1964*).

Em sequência, a informação visual parte dos fotorreceptores para os neurônios seguintes, denominados bipolares (Figura 1). Em conjunto com as células horizontais e amácrinas, estes neurônios processam os sinais elétricos e enviam para as células ganglionares. Os axônios das células ganglionares retinianas formam o nervo óptico, responsável por fazer conexões sinápticas com os neurônios do córtex visual primário, região de processamento visual (*KOLB ET AL., 2001*).

1.2 Degeneração Retiniana

Devido sua posição anatômica, a retina é susceptível a degenerações provenientes de fatores ambientais e genéticos, que podem resultar em perda visual ou, em casos mais avançados, a cegueira completa. A Retinose Pigmentar (RP), por exemplo, compreende um grupo heterogêneo de degenerações retinianas de origem hereditária, caracterizada pela perda das células fotorreceptoras e do Epitélio Pigmentar Retiniano - EPR (*HAMEL ET AL., 2006*). A maior parte das formas de RP ocorre inicialmente pela morte dos bastonetes, podendo ocasionar o quadro de cegueira noturna com perda do campo visual periférico. A longo prazo, ocorre o comprometimento da visão central com a disfunção ou morte dos cones, evoluindo para o quadro de cegueira antes dos 30 anos.

Atualmente já se sabe que existem pelo menos 45 ou mais genes causadores de RP, sendo sua maioria responsáveis por codificar proteínas específicas de fotorreceptores, principalmente dos bastonetes. Existe um banco

de dados online com pesquisas do mundo todo relacionados a mapeamento genético e mutações causadoras de doenças retinianas (FONTE: <https://sph.uth.edu/retnet/disease.htm>) como por exemplo, mutações no gene RHO no códon 15, caracterizada pela substituição do aminoácido asparagina pela serina, resultando em uma forma de RP (VILELA ET AL., 2018)

Pouco se sabe sobre a etiologia desta doença e não há tratamentos clínicos eficientes (SACCHETTI ET AL., 2015; CÔCO; HAN; SALLUM, 2009). Sabe-se que indivíduos que apresentam RP, podem manifestar outras doenças sistêmicas, como por exemplo, Síndrome de Usher (WOLFRUM ET AL., 2018), Amaurose Congênita de Leber (HOLLANDER ET AL., 2008), Distrofia de Cones e Bastonetes (CEHAJIC-KAPETANOVIC ET AL., 2019), Síndrome de Bardet-Biedl e Refsum (FLEISCHHAUER ET AL., 2005), sendo todas estas doenças de origem genética e que podem comprometer ainda mais a acuidade visual e a capacidade física do indivíduo.

Desta forma, modelos animais de doenças oculares hereditárias fornecem importantes ferramentas na compreensão da fisiopatologia, etiologia, genética e caracterização, ajudando na elaboração de intervenções eficientes para estas doenças. Modelos animais, como camundongos, ratos, coelhos, porcos e primatas, possuem características muito semelhantes às patologias encontradas em humanos, por isso, são de suma importância na elucidação das mutações genéticas e quais mecanismos que resultam na progressão das doenças (SAKAMI ET AL., 2014; PENNESI ET AL., 2012; CHANG ET AL., 2013).

Os modelos animais que apresentam mutações na proteína rodopsina são muito importantes para a compreensão da RP, pois são a causa mais comum de retinose pigmentar autossômica dominante humana (adRP). Um modelo animal específico com esta mutação demonstrou baixos níveis de proteína rodopsina, desalinhamento parcial dos discos e degeneração progressiva da retina (P23H) (CHANG ET AL., 2013). Os animais P23H são um conhecido modelo experimental de degeneração retiniana (MONAI, N ET AL 2018; ORHAN, E ET AL 2015). Eles apresentam uma mutação no gene da rodopsina, o que desencadeia uma degeneração dos fotorreceptores que se inicia por volta dos 30 dias de vida do animal heterozigoto. Por volta dos 180

dias, o rato P23H apresenta 90% de degeneração dos fotorreceptores e cegueira clinicamente comprovada.

Dentro dos estudos voltados para a melhor compreensão destas patologias retinianas e a busca por um tratamento mais eficiente, algumas abordagens terapêuticas voltam-se para a indução/promoção da regeneração da retina. Nesta área, células-tronco/progenitores retinianos são investigados a fim de fornecer ao tecido uma fonte celular capaz de recuperar o tecido degenerado e resgatar a função do órgão.

1.3 Terapia Regenerativa Celular

A Terapia Regenerativa Celular baseia-se na utilização de células-tronco para substituir as células ineficientes ou mortas de um tecido e reestabelecer a integridade morfológica e funcional do tecido danificado. As células-tronco podem ser definidas como unidades de organização biológica responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção de órgãos e tecidos (*BACAKOVA ET AL., 2018*). Devido sua capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em linhagem celulares distintas, apresentam um grande potencial na terapia regenerativa celular. Alguns trabalhos na literatura evidenciam a importância das células-tronco para tratar diversas patologias, como por exemplo, doenças cardíacas (*CHO ET AL., 2014*), doenças hepáticas (*TSOLAKI ET AL., 2015*), inibição da apoptose das células pulmonares (*CHENG et al., 2017*), doenças ósseas (*LI ET AL., 2017*), osteoartrite (*WANG ET AL., 2017*), câncer de mama (*PAKRAVAN ET AL., 2017*), distrofia muscular (*FRATTINI ET AL., 2017*), lesão da medula espinhal (*HUANG ET AL., 2017*), uveíte autoimune (*BAI ET AL., 2017*) e isquemia retiniana (*MOISSEIEV ET AL., 2017*).

Dentro deste assunto, sabe-se que algumas células não neuronais localizadas no olho de mamíferos (como células epiteliais e gliais) possuem a capacidade de se reprogramar em células-tronco/progenitoras neuronais retinianas após estímulos adequados, se diferenciando das propriedades e funções que exercem normalmente.

As células oculares com características de progenitores retinianos descritas até o momento são: células glias de Müller, epitélio pigmentado retiniano (EPR), Epitélio Ciliar (EC), Íris e Limbo (*GASPARINI et al., 2019; JIN ET AL., 2019; BHATIA ET AL., 2009; DAS ET AL., 2005; ARNHOLD ET AL., 2004; FISCHER E REH ET AL., 2003; HARUTA ET AL., 2001; AHMAD ET AL., 2000; TROPEPE ET AL., 2000*).

Dentre todas as fontes celulares conhecidas até o momento, a que se apresenta mais promissora para uma abordagem clínica regenerativa são as células do **Epitélio Ciliar (EC)**.

1.4 Epitélio Ciliar e sua capacidade regenerativa

Em peixes e anfíbios, a neurogênese retiniana continua no período pós-embriônico e pós-natal em uma região chamada zona marginal ciliar (ZMC), que fica na margem periférica da retina e contém uma população de células-tronco quiescentes (Figura 2). Nestes animais, a ZMC é capaz de formar todos os tipos celulares encontrados na retina adulta. A descoberta desta região em vertebrados inferiores, motivou os pesquisadores a buscarem regiões semelhantes em mamíferos (*CENTANIN ET AL., 2013; FISCHER ET AL., 2013; OTTESON AND HITCHCOCK., 2003; REH AND LEVINE., 1998; JOHNS, 1977; HOLLYFIELD, 1968*).

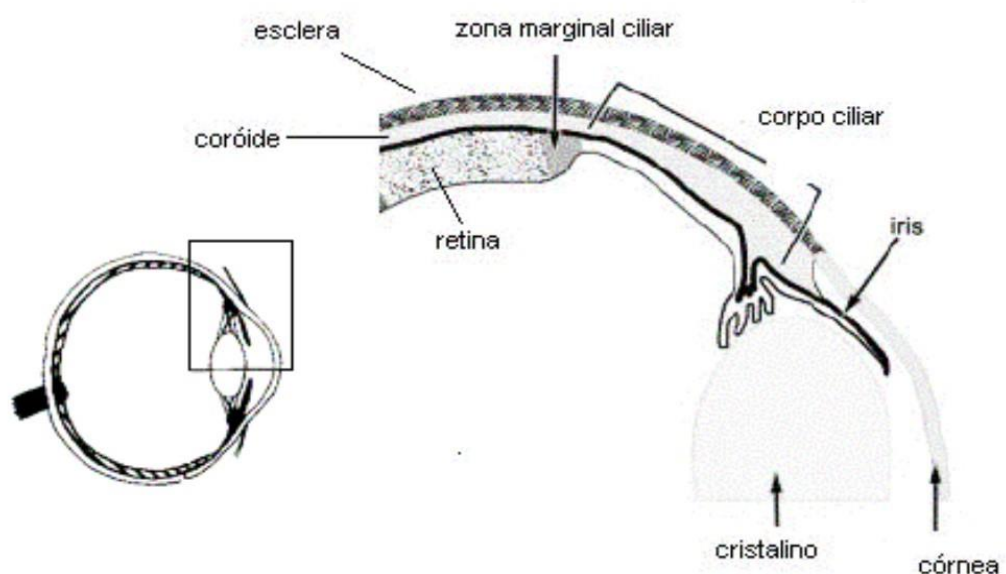


Figura 2: Imagem ilustrativa de um corte sagital da região periférica da retina de pintos pós-eclosão mostrando a presença da Zona Marginal Ciliar (ZMC) e o Corpo Ciliar. Adaptado de Fischer e Reh (2003) e Tropepe et al., 2000.

Mamíferos não possuem a ZMC, mas uma fonte de células-tronco/progenitores retinianos foi detectada na região do **Epitélio Ciliar (EC)**, dentro do Corpo Ciliar (ZHAO ET AL., 2005; KLASSEN ET AL., 2004; AHMAD ET AL., 2000; FISCHER E REH ET AL., 2000).

1.5 Corpo Ciliar e Epitélio Ciliar da retina

O Corpo Ciliar (CC) é uma estrutura complexa situada entre a íris e a retina (Figura 1). O CC forma parte do segmento anterior do olho e é um importante regulador fisiológico, agindo diretamente na percepção visual. Este tecido é composto por músculos ciliares (com fibras longitudinais, circulares e radiais) e processos ciliares. Os processos ciliares são compostos de estroma (tecido conjuntivo frouxo vascularizado), e duas camadas de tecido epitelial, denominada de Epitélio Ciliar (EC) (Figura 3). O epitélio mais externo e contínuo ao Epitélio Pigmentado Retiniano possui grande quantidade de grânulos de pigmento, recebendo o nome de **Epitélio Pigmentado (EP)**, enquanto o epitélio mais interno (em contato com o vítreo e cristalino), não é pigmentado, recebendo o nome de **Epitélio Não-Pigmentado (ENP)**. As células do ENP são maiores que as células do EP e possuem uma quantidade maior de mitocôndrias devido à alta atividade metabólica e de síntese (DELAMERE, 2005). A forma ondulada do EC permite fornecer ao epitélio uma grande área de superfície para secreção do humor aquoso, glicoproteínas do vítreo, antioxidantes, enzimas e neuropeptídios (DELAMERE, 2005; BISHOP; BUTTERY; POLAK, 2002; COCA-PRADOS; ESCRIBANO; ORTEGO, 1999). Fibras zonulares conectam o CC ao cristalino e, em conjunto com a atividade dos músculos ciliares, promovem a acomodação do cristalino (ajuste do foco) (HANSSEN; FRANC; GARRONE, 2001; RAVIOLA, 1971). O EC é

anatomicamente dividido em duas regiões, uma próxima à retina denominada pars plana, seguida da pars plicata.

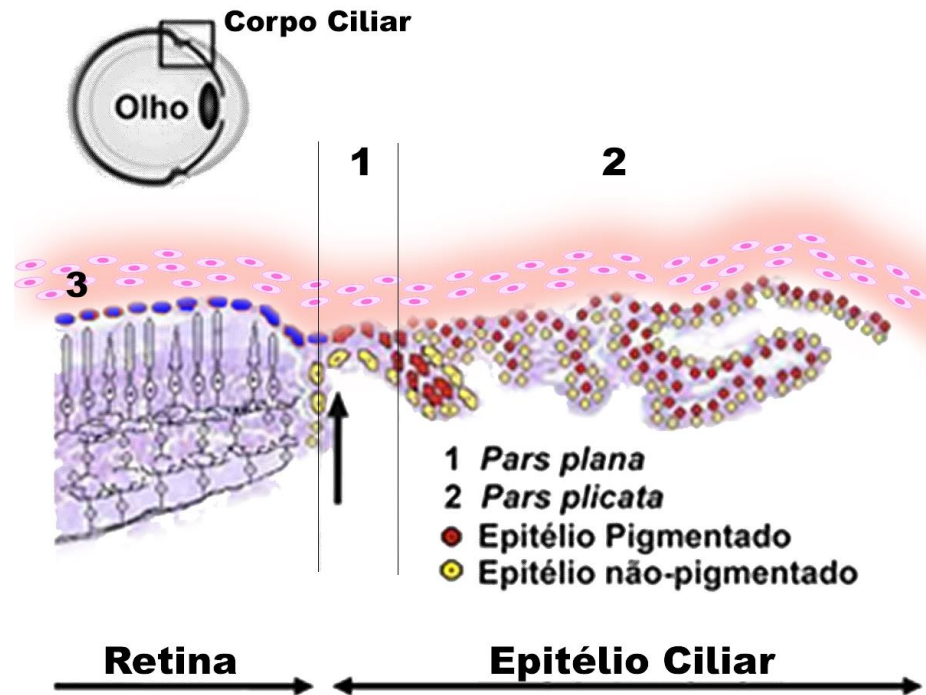


Figura 3. Desenho esquemático do Epitélio Ciliar (EC). O EC se localiza adjacente à retina e é composto por uma bicamada epitelial: Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP). Anatomicamente é classificado em pars plana (1) e pars plicata (2). O EC está em contato com os músculos ciliares (não identificados na figura) e a coróide (3). A seta indica o final da retina à esquerda e começo do Epitélio Ciliar à direita. Adaptado de (DEL DEBBIO et al., 2014)

Ao serem expostas às condições ambientais que mimetizam o desenvolvimento retiniano precoce e tardio, estas células epiteliais são capazes de perder algumas das propriedades epiteliais (incluindo a pigmentação) e formam uma estrutura tridimensional denominada neuroesfera. Neuroesferas são aglomerados de células-tronco progenitoras heterogêneas formadas a partir da desdiferenciação de células adultas quando expostas a estímulos de fatores de crescimento. Nessas condições, passam a expressar fatores de transcrição como Pax6, Sox2, Chx10, Rx, Lhx2 e Nestina. *In vitro*

estas células foram capazes de gerar neurônios e células gliais, inclusive fotorreceptores (FISCHER ET AL., 2003; BHATTACHARYYA ET AL., 2003; PEVNY ET AL., 2003; LU ET AL., 2002; TROPEPE ET AL., 2000, DAS ET AL., 2005).

In vivo, a capacidade progenitora e de diferenciação das células do EC foi comprovada em roedores e humanos através de ativação local por meio de injeções intraoculares de fatores de crescimento ou por transplante (XU ET AL., 2007; CHACKO ET AL., 2003). Estudos demonstraram que injeções de fatores de crescimento foram capazes de ativar o potencial de células-tronco do EC, resultando na expressão de características embrionárias e expressão de proteínas marcadoras do ciclo celular (ABDOUH E BENIER., 2006)

Apesar da presença destes mecanismos de reparo, a retina de mamíferos apresenta um potencial muito limitado de regeneração, o que implica na presença de mecanismos celulares ou microambientais que controlem negativamente esta função. Estes mecanismos podem ser fatores secretados pelas próprias células ou pelas células circunvizinhas, que são liberados ao meio extracelular e desencadeiam respostas celulares específicas.

As vesículas extracelulares liberadas pelas células são conhecidas por conterem conteúdos diversos e desempenharem importante função na comunicação entre as células, podendo conter fatores que controlem as funções fisiológicas diversas.

1.6 Vesículas Extracelulares

1.6.1 Definição e Nomenclaturas

O termo **Vesículas Extracelulares (VEs)** é uma denominação geral para componentes extracelulares revestidos de uma bicamada lipídica, que podem ser sintetizadas e liberadas por diversas células e em diversas condições, como por exemplo, células cancerígenas. Essas pequenas estruturas com tamanho entre 30nm a 1µm são liberadas por vários tipos de organismos procariotos a eucariotos, sendo capazes de transmitir informações para outras células. Este evento facilita a comunicação intercelular pelo contato ou pela internalização dos conteúdos, seja por sua fusão com a membrana

plasmática ou por endocitose da VE por células “receptoras”, influenciando a função da mesma e também no microambiente (BAEK ET AL., 2019; WITWER ET AL., 2019; TODOROVA ET AL., 2017; YÁÑEZ-MÓ ET AL., 2015; KIM ET AL., 2015; COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; BORGES ET AL., 2013; VAN NIEL ET AL., 2006).

Atualmente, existem diversas nomenclaturas na literatura para descrevê-las. As nomenclaturas microvesículas, micropartículas ou nanopartículas se referem aos tamanhos. Quanto ao tipo celular/tecido de origem, estas estruturas podem ser classificadas como oncossomos ou prostassomos. Quanto à sua localização, as VEs são classificadas em exossomos, exovesículas ou ectossomos. Também pode-se classificar estas estruturas quanto à sua possível função, recebendo a nomenclatura de argossomo, vesícula matriz, epididimossomo, tolerossomo, promissomo, dexossomo ou texossomo. Além disso, também existem os corpos apoptóticos, estruturas heterogêneas liberadas após o processo de apoptose em forma de fragmentos de restos celulares (GYÖRGY ET AL., 2011; TURÍÁK ET AL., 2011). (THÉRY ET AL., 2018; GARDINER ET AL., 2016; COCUCCI AND MELDOLESI., 2015; GOULD AND RAPOSO., 2013; STEIN AND LUZIO., 1991). A formação e liberação das VEs ocorre através do brotamento externo da membrana plasmática ou através do brotamento interno da membrana endossômica, resultando na formação de corpos multivesiculares (MVBs), que liberam vesículas após a fusão com a membrana plasmática (Figura 4) (ABELS ET AL., 2016).

Nesse trabalho, classificaremos as vesículas liberadas pelas células do EC de forma generalizada como Vesículas Extracelulares também, por conta do desconhecimento da natureza e características destas estruturas em nosso tecido.

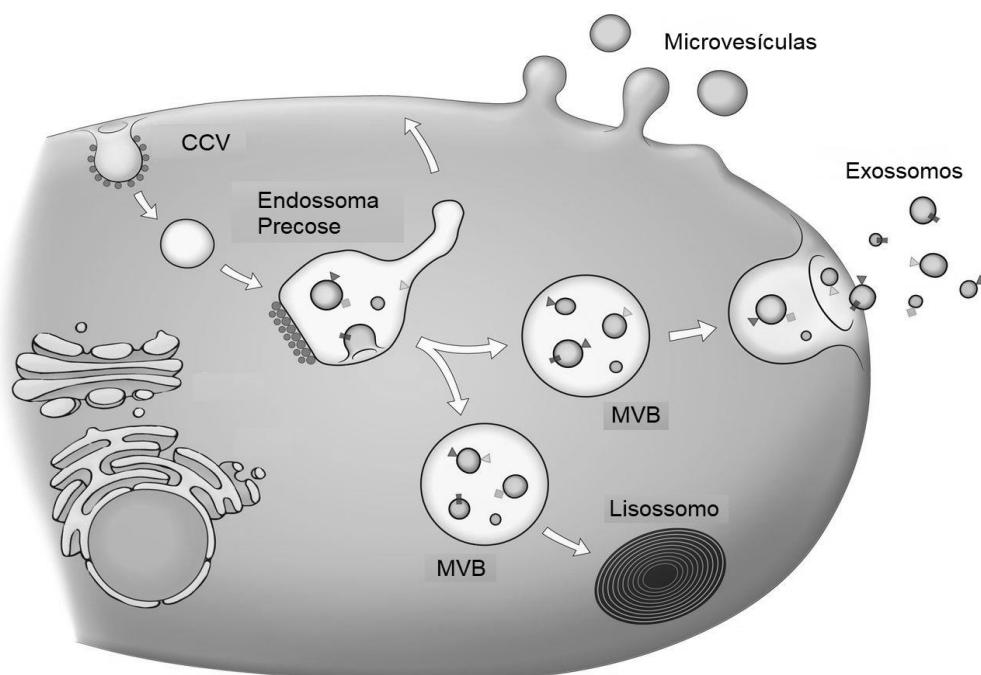


Figura 4: Esquema representativo da biogênese e liberação das VEs. Os corpos multivesiculares (MVB) brotam diretamente da membrana plasmática, enquanto os exossomos são formados nas vesículas intraluminais (ILVs) e armazenados em vacúolos semelhantes aos MVBs. Os exossomos vão ser liberados após a fusão da membrana plasmática dos MVB com a membrana da célula. Outros MVbs vão se fundir com os lisossomos. Os pontos em vermelho são uma proteína denominada de clatrina (CCV), importante no processo de formação das vesículas. Os retângulos e triângulos representam proteínas de membranas e transmembranas. Adaptado: RAPOSO ET AL., 2013.

As VEs participam do tráfego intracelular ou intercelular, sendo estas denominadas de vesículas secretoras ou transportadoras; estas vesículas podem ser formadas através da membrana plasmática por brotamento direto; já outras podem ser formadas no interior das células, como por exemplo, os endossomos; e posteriormente são secretadas através da membrana plasmática; outras vesículas extracelulares como os exossomos, são formadas em endossomos tardios ou corpos multivesiculares e em seguida secretados (GANGODA ET AL., 2014; ANDALOUSSI ET AL., 2013; SIMONS; RAPOSO, 2009).

As classificações mais comuns usadas atualmente na literatura combinam propriedades gerais relacionadas com tamanho, mecanismo de formação principais marcadores destas vesículas. Nestas condições, as principais exossomos, microvesículas e os corpos apoptóticos (Figura 5 e Tabela 1).

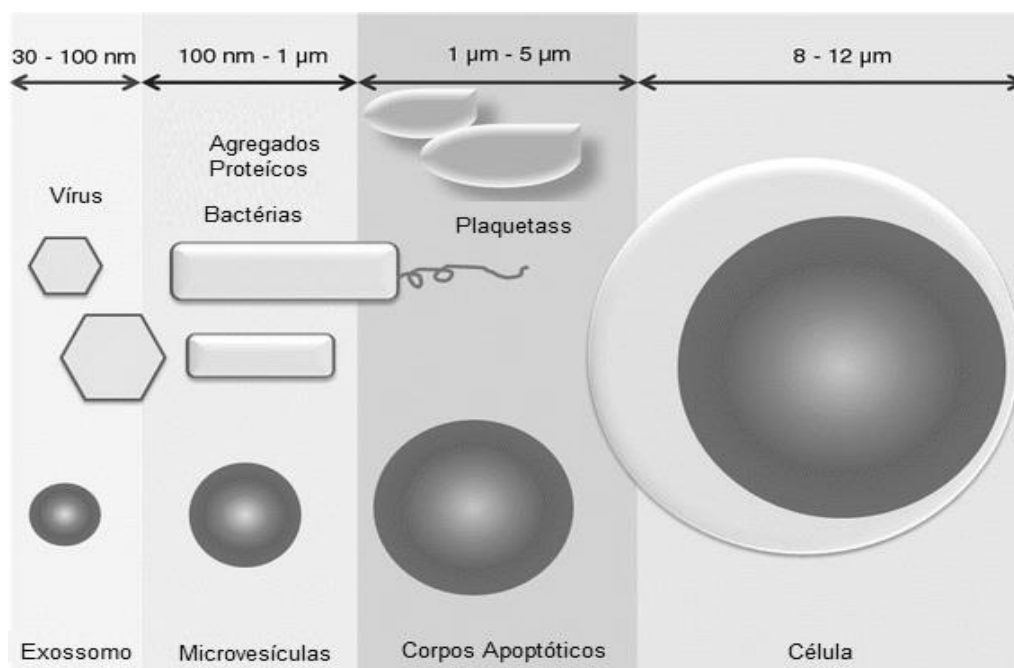


Figura 5: Imagem ilustrativa dos diferentes tipos de tamanhos de VEs. Os exossomos tem um tamanho próximo aos vírus, enquanto as microvesículas possuem um tamanho aproximado as bactérias e agregados proteicos. Os corpos apoptóticos e as plaquetas apresentam um tamanho variando entre 1-5µm. Adaptado: RAPOSO ET AL., 2013.

Tabela 1: Principais características dos diferentes tipos de Vesículas Extracelulares (VEs). Adaptado: RAPOSO ET AL., 2013.

	Exossomos	Microvesículas	Corpos apoptóticos
Tamanho	30 – 100nm	100nm - 1µm	1 - 5 µm
Biogênese	Exocitose dos Corpos multivesiculares	Brotamento direto da membrana	Fragmentação das células
Marcadores	Anexina V, CD63, CD81, TSG101	EpCAM, ICAM, Anexina V	Anexina V e marcadores de DNA

1.6.2 Conteúdo e função das vesículas extracelulares

Em termos de composição e atividades biológicas, as VEs são derivadas de tipos celulares diferentes, portanto, são molecularmente distintas umas das outras (LI ET AL., 2019; MENG ET AL., 2019; KLINGEBORN ET AL., 2017; BORIACHEK ET AL., 2017; PACE ET AL., 2016).

As VEs liberadas ao meio extracelular contêm uma variedade de receptores de superfície celular, proteínas de sinalização intracelular e diversos materiais moleculares derivados das células de origem (figura 6). (THÉRY ET AL., 2018; ABELS ET AL., 2016). A atividade biológica das VEs também pode variar dependendo do estado da célula doadora (por exemplo, em repouso, ativo, quiescente) e do agente estimulante de sua liberação (YANG ET AL., 2018). Desta forma, as vesículas extracelulares são uma importante ferramenta de comunicação intercelular e de comunicação célula-microambiente, transportando complexas mensagens biológicas derivadas de moléculas que não são secretadas por vias secretoras clássicas ou que são sujeitas a degradação extracelular (D'ASTI EY AL., 2012). Estas estruturas possuem grande número e variedade de moléculas que podem ativar várias vias de sinalização simultaneamente, além disso, podem percorrer longas distâncias sem alterarem suas estruturas e manterem o conteúdo seguro (DE MAIO ET AL., 2011).

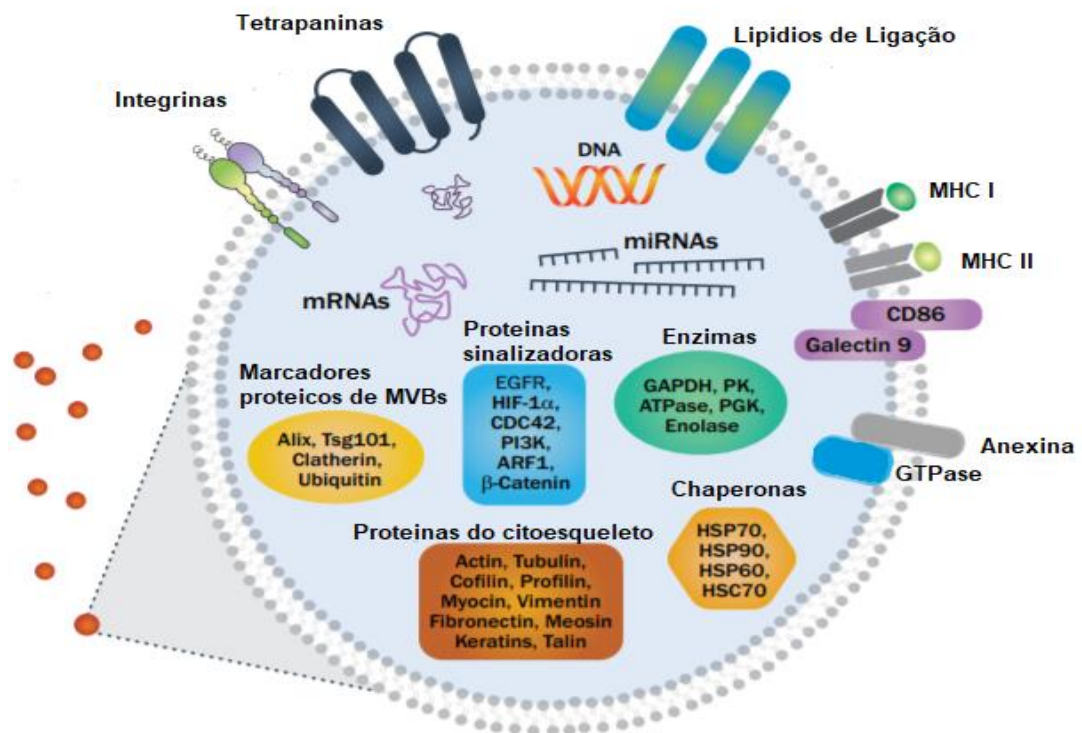


Figura 6: Imagem ilustrativa dos componentes das vesículas extracelulares. As VEs são compostas por diversas moléculas importantes, como proteínas sinalizadoras, proteínas de citoesqueleto, lipídios de ligação, receptores de histocompatibilidade, enzimas, RNAs e DNA. Adaptado: <https://www.novusbio.com/research-areas/cell-biology/Exosome-research-tools>

Atualmente sabe-se que quase todos os tipos celulares liberam VEs, como por exemplo, células hepáticas (ROYO ET ALI., 2019); cardíacas (GAO ET AL., 2019); tecido adiposo (KITA ET AL., 2019); fígado (ISHIGURO ET ALI., 2019); câncer gástrico (KAGOTA ET AL., 2019); músculo esquelético (ROME ET AL., 2019); bexiga, rim, próstata (LEE ET AL., 2018) e células-tronco (GRANGE ET AL., 2019). Por conterem características de sua célula de origem e serem encontradas em fluídos biológicos, são promissores biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de doenças, como mieloma múltiplo e câncer renal, por exemplo (LI ET AL., 2019; GRANGE ET AL., 2015).

A função das vesículas extracelulares está diretamente relacionada com o seu conteúdo, que vai depender do tipo celular o qual foi originado (MURALIDHARAN-CHARI ET AL., 2010) e das condições de cultivo (CHOI ET AL., 2015). Essas vesículas extracelulares podem transferir seus conteúdos

para células alvo, que desencadearão respostas celulares específicas, dependendo deste conteúdo (D'ASTI ET AL., 2012; KALRA ET AL., 2012; VADER ET AL., 2014).

O estudo das VEs liberadas por células-tronco apresenta um interesse terapêutico. Dados da literatura demonstraram que VEs de tipos diferentes de células-tronco melhoraram a vascularização renal (AGHAJANJ NARGESI ET AL., 2017), regularam imunomoduladores (BÖRGES ET AL., 2017) e melhoraram as condições fisiológicas nos casos de modelos de doenças pulmonares (MONSEL ET AL., 2016), lúpus (PEREZ-HERNANDEZ ET AL., 2017) e osteoartrite (LI ET AL., 2019).

Existem dois bancos de dados que agrupam informações a respeito da composição das vesículas extracelulares: "EVpedia" (<http://ecpedia.info>) (KIM, D.K. ET AL., 2015) e "Vesiclepedia" (<http://microvescles.org>) (KALRA ET AL., 2012). De forma geral, as VEs podem conter proteínas citoplasmáticas e de membrana, como por exemplo, selectinas e integrinas (THÉRY ET AL., 2018; ANDALOUSSI ET AL., 2013), lipídios (colesterol) e ácidos nucleicos (mRNA e miRNA) (CHOI ET AL., 2015; COLOMBO ET AL., 2014; THÉRY., 2014).

Dentre as principais proteínas das VEs encontram-se proteínas de transporte de membrana (anexinas); proteínas apresentadoras de antígenos (MHC, do inglês, "Major Histocompatibility Complex"); proteínas adesivas (integrinas); proteínas de membrana (LAMP, do inglês, "lysosome-associated membrane protein"); proteínas nucleares (histonas) e proteínas do citoesqueleto (actina) (NAIR ET AL., 2018; CHOI ET AL., 2015; COLOMBO ET AL., 2014)

Dentro do exposto, nosso trabalho teve como objetivo estudar as VEs liberadas pelas células do Epitélio Ciliar de roedores, desvendando suas características morfométricas. Também estudamos as VEs liberadas oelo EC de animais modelos de degeneração retiniana, a fim de investigar o efeito da lesão da retina na capacidade de síntese e liberação destas vesículas. Por serem células com potencial de reprogramação em células-tronco, a análise de suas VEs se torna importante para compreender este mecanismo de comunicação celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar as Vesículas Extracelulares sintetizadas e liberadas pelas células do EC de animais normais e com degeneração retiniana.

2.2 Objetivos Específicos

1. Análise morfológica da ultra-estrutura celular das células do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) do EC quanto a presença de vesículas plasmáticas por Microscopia Eletrônica;
2. Estudo da expressão transcricional dos principais marcadores de VEs expressos nas células do EP e ENP por PCR em tempo real;
3. Isolamento das VEs liberadas para o meio extracelular através de experimentos de cultura celular;
4. Identificação das características morfométricas (quantidade e tamanho) das vesículas liberadas pelas células do EC por análise de rastreamento de nanopartículas (NanoSight);
5. Análise das VEs liberadas por animais modelos de degeneração retiniana (P23H)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo Experimental

Os animais em experimentação foram manipulados segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo nº75/34, aprovado em 25/08/2015). Ratos adultos controle (Sprague Dawley) e com degeneração retiniana (P23H) foram mantidos em biotério com temperatura controlada de 23°C, em regime de fotoperíodo 12h claro:12h escuro (período claro começando às 7:00h) e recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

3.2 Genotipagem dos animais P23H

Tecidos extraídos das orelhas dos animais foram submetidos a extração do DNA pela adição de 50µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100mM NaCl e SDS 1%) e 8µl da enzima proteinase K, seguido de incubação no termomix (*Eppendorf Model 5436 Thermomixer*) a 55°C, sob agitação constante por 4h. Após incubação, as amostras foram resfriadas e submetidas a temperatura de 95°C por 10 minutos para a inativação da proteinase K. Após os 10 minutos, foi adicionado 350µl do tampão TE (100 mL de solução de Tris-HCl [1M, pH: 8,0] / 20 mL de EDTA [0,5 M, pH: 8,0]) e 2.5µl de RNase para neutralizar a reação por 20 minutos a 37°C.

3.3 PCR para genotipagem

Para cada 1µl de DNA extraído, foram adicionados 17,8 µl de água, 2.5 µl de tampão 10x, 1.25 µl de MgCl₂, Taq Polimerase e os primers específicos FR1 e FR2 como controle endógeno, e POH1 e POH2 para identificar a mutação nos animais P23H. As amostras foram amplificadas no termociclador

(*BIO-RAD T100 Thermal Cycler*), segundo programa descrito na Tabela 2 e em seguida analisadas em gel de agarose 1,5%.

Tabela 2. Programa do Termociclador para Genotipagem

Temperatura/Tempo	
95°C	5 minutos
94°C	30 segundos
61°C	1 minuto
72°C	1 minuto
94°C	30 segundos
60°C	1 minuto
72°C	1 minuto
94°C	30 segundos
59°C	1 minuto
72°C	1 minuto
94°C	30 segundos
58°C	1 minuto
72°C	1 minuto
94°C	30 segundos
57°C	1 minuto
72°C	1 minuto
94°C	30 segundos
56°C	1 minuto
72°C	1 minuto
94°C	30 segundos
55°C	1:30
72°C	1 minuto
23x	
72°C	10 minutos
4°C	∞

3.4 Coleta das células do Epitélio Ciliar

Para cada experimento foram utilizados um pool de 7 a 10 animais, sendo analisados 3 pools diferentes (N=3). Após a eutanásia, os olhos foram enucleados e mantidos em *Hank's Balanced Salt Solution – HBSS (Sigma)* sem cálcio (pH 7.4). Posteriormente, a córnea, o cristalino, o humor vítreo e aquoso, e a íris foram removidos. Uma tira de tecido ocular contendo o Epitélio Ciliar (EC) foi obtido, e o epitélio pigmentado (EP) foi separado manualmente do epitélio não-pigmentado (ENP). As amostras obtidas foram utilizadas imediatamente ou mantidas em freezer -80 °C até o posterior uso.

3.5 Cultura celular para coleta de Vesículas Extracelulares

Após a dissecação e separação do EP e ENP, as células foram tratadas com 0.3mg/ml colagenase (Sigma; 78 U/ml) e 0.04mg/ml de hialuronidase (Sigma; 38 U/ml) à 37°C por 35 minutos. Após incubação, as células foram homogeneizadas manualmente e em seguida, lavadas com *HBSS* e centrifugadas (*Centrifuge Eppendorf 5810*) em temperatura ambiente a 2200rpm por 5 minutos. As células foram então incubadas com 0.25% de tripsina e 50µl de DNase (1mg/ml) por 35 minutos a 37°C e novamente homogeneizadas. Em seguida, as células foram contadas e plaqueadas à 1×10^5 células/ml em meio livre de *SFB* (*Soro Fetal Bovino*), contendo DMEM/F12, 1X N2 suplemento (*GIBCO*), 2 mM l-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina. As células foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 48hs.

3.6 Isolamento e extração das Vesículas Extracelulares

Para isolar as VEs liberadas pelas células, o sobrenadante das células do EP e do ENP foi coletado após 48h de cultivo. Este foi centrifugado à 2000 g por 30 minutos à temperatura ambiente para retirada de células e *debris*. Após descarte do pellet, foi adicionado 500µl do *kit Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media, cat# 4478359, Invitrogen)* ao sobrenadante. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 4°C *overnight*.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas à 10.000 g por 1h à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspendidos em PBS (*Phosphate Buffered Saline, 1x, pH 7.4*) para leitura no NanoSight ou fixados para Microscopia Eletrônica.

3.7 Análise de Rastreamento de Nanopartículas

A quantificação das VEs foi realizada através do equipamento NanoSight no centro de pesquisa A. C. Camargo Câncer Center. O NanoSight utiliza a tecnologia de *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)* para quantificar a distribuição de partículas de 10nm a 1000nm em meio líquido, utilizando

propriedades de espalhamento de luz e movimento *Browniano* para se obter a distribuição de tamanho e concentração das partículas em suspensão. As amostras das VEs foram extraídas a partir do *kit Total Exosome Isolation (Invitrogen)* e posteriormente ressuspensas em 50µl de *PBS* ultrafiltrado e mantidas no gelo. Para analisar no NanoSight uma nova diluição foi realizada, onde 10µl das amostras foram diluídas em 490µl de *PBS* e um volume de 1 ml foi inserido no equipamento para efetuar a análise das VEs.

3.8 Extração de RNA

Após eutanásia, enucleação e dissecação do EP e ENP, o RNA das amostras dos animais controles (SDs) e com degeneração retiniana (P23H) foram extraídos pelo método de trizol (*Invitrogen*). Inicialmente, 1ml de trizol foi adicionado às amostras e homogeneizadas, em seguida incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Após os 5 minutos, foram adicionados 200µl de Clorofórmio (*Synth*) nas amostras e homogeneizadas com o auxílio de um *vortex* por 15 minutos. Após 3 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas à 12.000 rcf por 15 minutos à 4°C. Logo após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado 500µl de isopropanol (*Sigma*) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Novamente as amostras foram centrifugadas (*Centrifuge Eppendorf 5418R*) a 12.000 rcf por 15 minutos à 4°C, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 1 ml de etanol (*Merck*) 95% e agitado por inversão. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rcf por 15 minutos à 4°C e os tubos foram mantidos abertos por 10 minutos para secar o pellet completamente. Para ressuspender o pellet, foram adicionados 30µl de água livre de DNase e RNase e as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro (*Thermo Scientific - Genesys™ 10S UV-Vis*).

3.9 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído e quantificado. Ao RNA foi adicionado 5µl de primers randômicos, 10µl de tampão de PCR 5x, 5µl de DTT 100mM, 2.5µl dNTP 10mM, 1µl de RNasin e 2 µl de Superscript III RT

(*In vitro*). Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador à 37°C por 60 minutos, 42°C por 30 minutos e 70°C por 10 minutos. Após a síntese de cDNA foi realizado um PCR convencional (qualitativo) para verificar a presença ou ausência de transcritos específicos relacionados com a biogênese de vesículas extracelulares (Tabela 3) e o *GAPDH* como controle endógeno.

3.10 PCR em Tempo Real

O cDNA foi amplificado com Sybr Green e primers específicos indicados na Tabela 3 no equipamento *7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*. As medidas foram feitas utilizando triplicatas e controle negativo sem amostra (branco). Os resultados foram calculados com base nos valores de CT e normalizados pela expressão do gene controle interno *GAPDH*.

Tabela 3. Lista de primers específicos

Genes	Sequence Forward	Sequence Reverse
<i>Flotilina1</i>	5' AAGACGAAGCAGCAGATCGAG 3'	5' CTCGCGCCTTGCTATCTCCT 3'
<i>Alix</i>	5' GGCGTGATAAATGAGGAGGCT 3'	5' GTCCCTCCTGTTTCTTCAGAG 3'
<i>Anexina V</i>	5' CTGGGACGGACGATCACACC 3'	5' ACGTGGCGAAGTTCTTCCTAAA 3'
<i>ICAM1</i>	5' CCGTGGGAATGAGACACTGA 3'	5' TGCCTGACCTCGGAGACATT 3'
<i>Tsg101</i>	5' GTTATCATTCCCACAGCCCCA 3'	5' GGTCTATTACTCCCCGCCTC 3'
<i>EpCam</i>	5' GGGGGAGTCCTTGTTCATT 3'	5' CTGCTAACACCACCACGACA 3'
<i>CD81</i>	5' CTCATTGCTGTGGGAGCTGT 3'	5' CACTGGGACTCCTGGATGG 3'
<i>CD63</i>	5' AACTATAGCGGCATGGCTGA 3'	5' CTCACAAAAGCAATGCCCA 3'
<i>Hsp70</i>	5' CAGGTGAACTACAAGGGCGA 3'	5' GCTGCGAGTCGTTGAAGTAG 3'
<i>EEA1</i>	5' ATCCGAAGGCTCGCTACAGA 3'	5' TGGTCTCTACTTCCCGCAGTT 3'
<i>GAPDH</i>	5' ACAGTCCATGCCATCACTGCC 3'	5' GCCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'

3.11 Análise Estatística

Para os experimentos de PC, pools das amostras de 7-10 animais diferentes foram coletados, sendo analisados 3-5 pools. Os dados foram representados em unidades arbitrárias (U.A.), sendo o valor estimado relativo ao valor da curva padrão ou valores de CT (PCR), com o uso dos genes *gapdh* como controle endógeno. As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram

avaliadas pelo test-T de Student ou ANOVA, em Software GraphpadPrism. Em todos os casos o critério de significância foi dado pelo valor de $P < 0,05$ e os resultados apresentados pela Média \pm SEM

4. RESULTADOS

4.1 Presença de estruturas microvesiculares nas células do Epitélio Ciliar

As células do Epitélio Ciliar de animais selvagens adultos (controles) foram analisadas quanto a presença de estruturas microvesiculares em seu citoplasma por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 7).

As células do EP apresentam grandes vesículas contendo pigmentos em seu citoplasma, ausentes nas células do ENP. Na região de comunicação entre as células é possível identificar estruturas esféricas no citoplasma referentes às Vesículas Intracelulares (setas amarelas do quadro superior direito). Próximas às membranas plasmáticas de cada tipo celular também foram observadas estruturas vesiculares invaginadas (setas amarelas nos quadros inferiores) características de microvesículas. Estes dados indicam que as células do EC produzem vesículas citoplasmáticas.

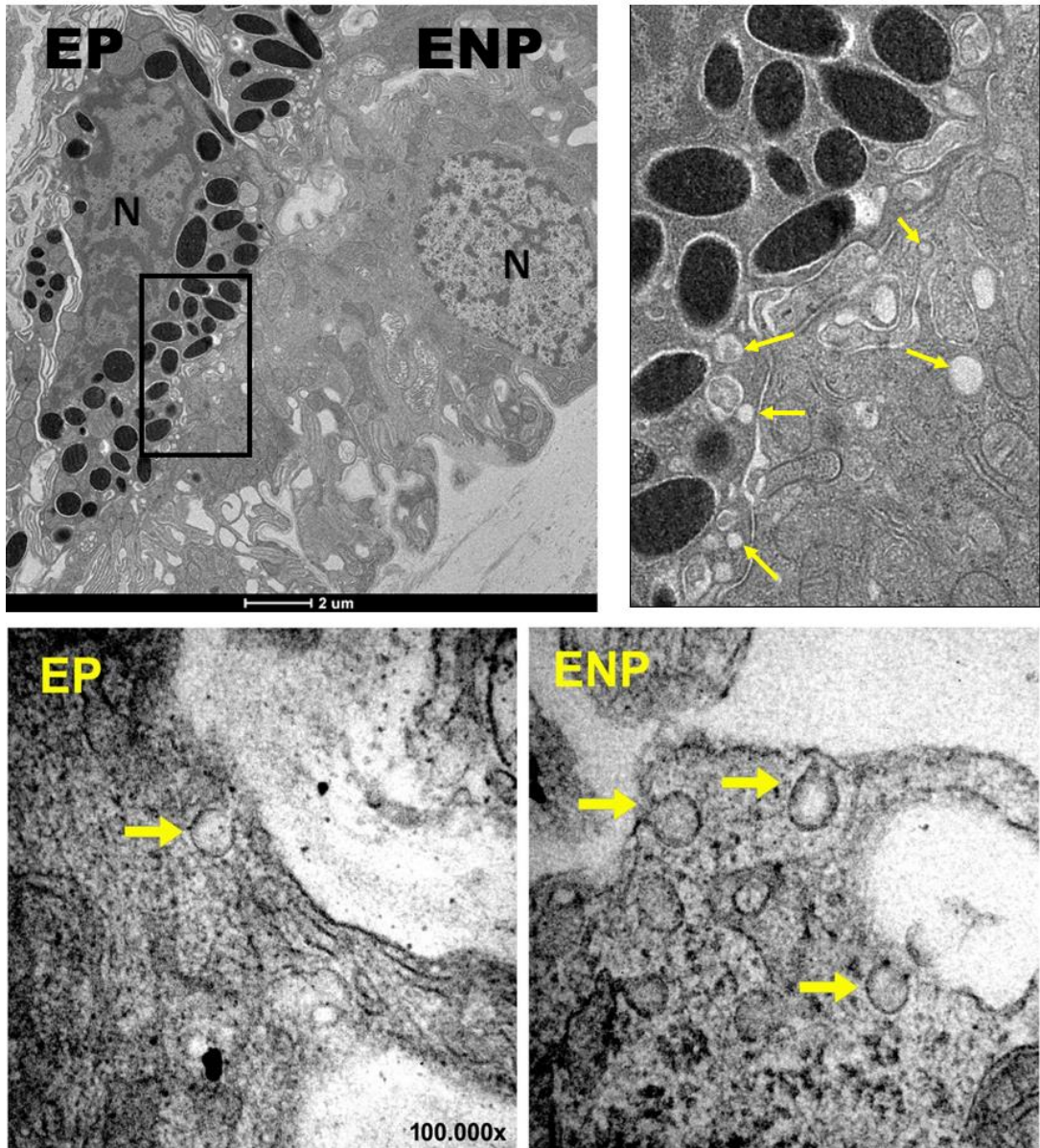


Figura 7. Micrografia eletrônica de transmissão das células do Epitélio Ciliar. No quadro superior esquerdo estão os dois tipos celulares do EC de animais pigmentados, indicando a presença de vesículas de pigmento no Epitélio Pigmentado (EP) e sua ausência no Epitélio Não-Pigmentado (ENP). O quadro superior direito é um detalhe do quadro à esquerda, indicando a presença de microvesículas na região de contato entre as duas células epiteliais (setas amarelas). Os quadros inferiores indicam a presença de vesículas intracelulares (setas amarelas) próximas às membranas das células do EP e ENP. Aumento de 100.000 vezes

4.2 Caracterização semi-quantitativa dos marcadores envolvidos na biogênese de microvesículas nas células do Epitélio Ciliar

Após detectar a presença de microvesículas no citoplasma das células do EC, realizamos uma primeira investigação para identificar a presença dos genes mais comuns envolvidos na composição e formação destas microvesículas.

Como as microvesículas/exossomos destas células ainda não foram estudadas, nós primeiro investigamos a presença dos genes relacionados com a biogênese das microvesículas expressos nas células do Epitélio Ciliar. Esta abordagem baseou-se no fato de que a maioria das vesículas secretadas apresentam composição estrutural similar a das suas células de origem.

A primeira análise de PCR semi-quantitativo indicou que as células do Epitélio Ciliar de animais adultos selvagens apresentaram a expressão de todos transcritos estudados (Figura 8).

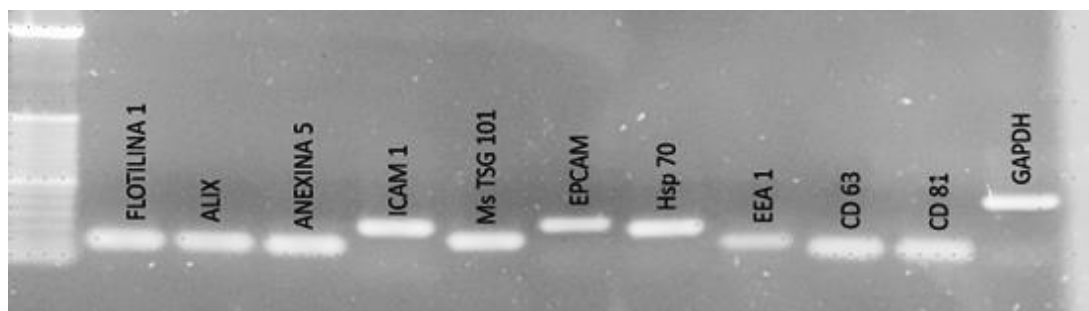


Figura 8. Presença de Marcadores de microvesículas. Análise por PCR convencional para os marcadores envolvidos na composição e biogênese de microvesículas expressos pelas células do Epitélio Ciliar de animais adultos controles.

4.3 Expressão transcricional dos marcadores microvesiculares

Como a análise de PCR convencional não é adequada para quantificação de expressão de transcritos, realizamos experimento de PCR em tempo real quantitativo nas células do EP e ENP de animais adultos controles (Figura 9).

Observamos que todos os transcritos estudados foram mais expressos nas células do EP em comparação com as células do ENP, com exceção de hsp70, que não apresentou diferenças estatísticas entre as células do EP e ENP. Estes dados sugerem que as células do EC possuem os principais marcadores de VEs e que são expressos de forma diferenciada entre as células desta estrutura.

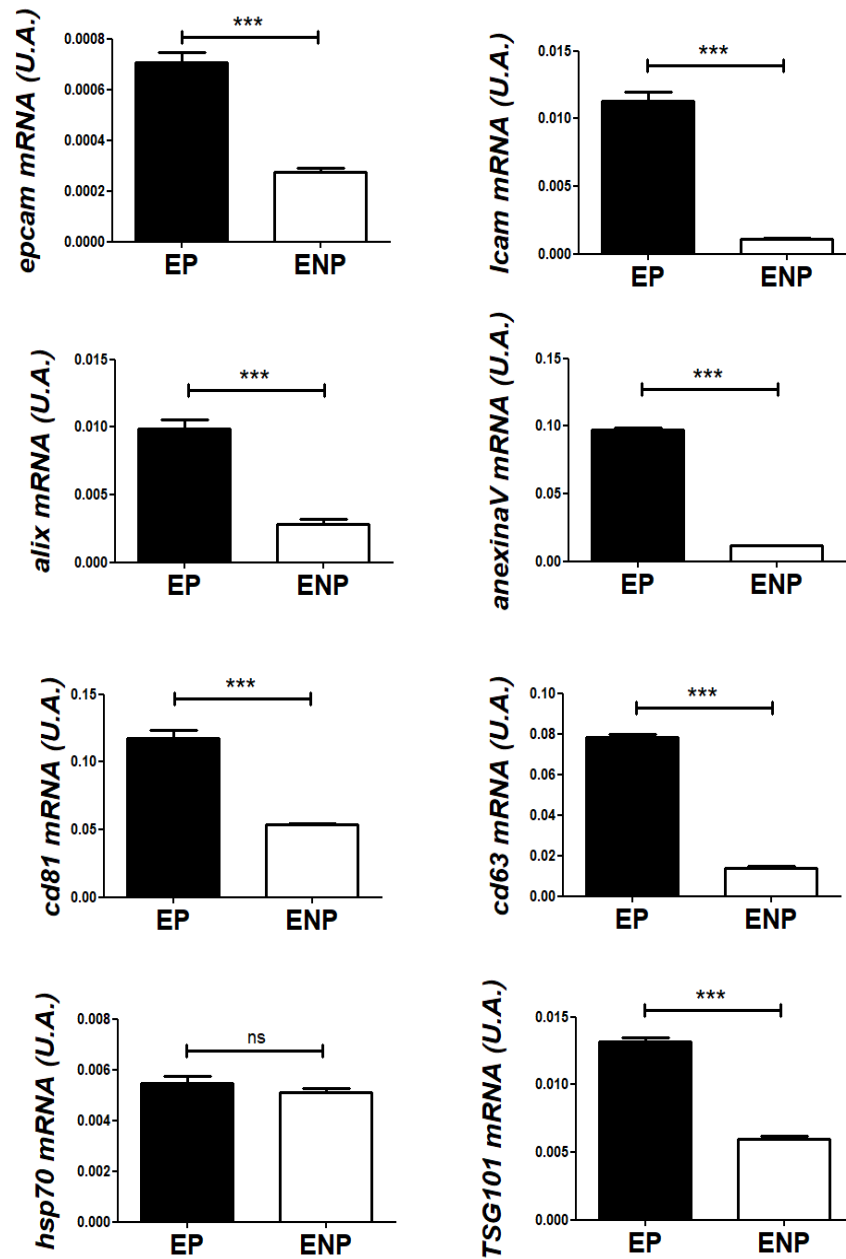


Figura 9 - **Expressão transcricional de Marcadores de microvesículas nas células do EC.** Análise por PCR em tempo real da expressão dos transcritos de *epcam*, *icam*, *alix*, *anexinaV*, *cd81*, *cd63*, *hsp70* e *tsg101* nas células do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) de animais normais controles. Resultados apresentados em média \pm erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *** $p < 0,0005$, ns = não significativo.

4.4 Quantificação de Microvesículas liberadas pelas células do Epitélio Ciliar

Nosso próximo passo foi verificar se as células do EC eram capazes de liberar microvesículas ao meio extracelular. Através do equipamento NanoSight, capaz de rastrear partículas no meio, realizamos a análise da quantidade e do tamanho de VEs isoladas a partir do meio de cultivo do EP e ENP.

As células do EP de animais controles apresentaram grande quantidade de vesículas de tamanho médio de 200nm (~3.3 partículas/ml), 350 nm (~3.7 partículas/ml) e partículas maiores, de aproximadamente 550 nm (~1.5 partículas/ml) (Figura 10 A, B e E).

As células do ENP também foram capazes de liberar VEs, porém, em quantidade maior que as células do EP (ENP= 3255; EP= 2375), e tamanhos maiores, contendo microvesículas de 200 nm (~2 partículas/ml), 250nm (4.5 partículas/ml), 400nm (~4 partículas/ml), 550nm (~4 partículas/ml), 800 nm (~1 partícula/ml) e 1µm (~1.5 partículas/ml) (Figura 10C, D e E).

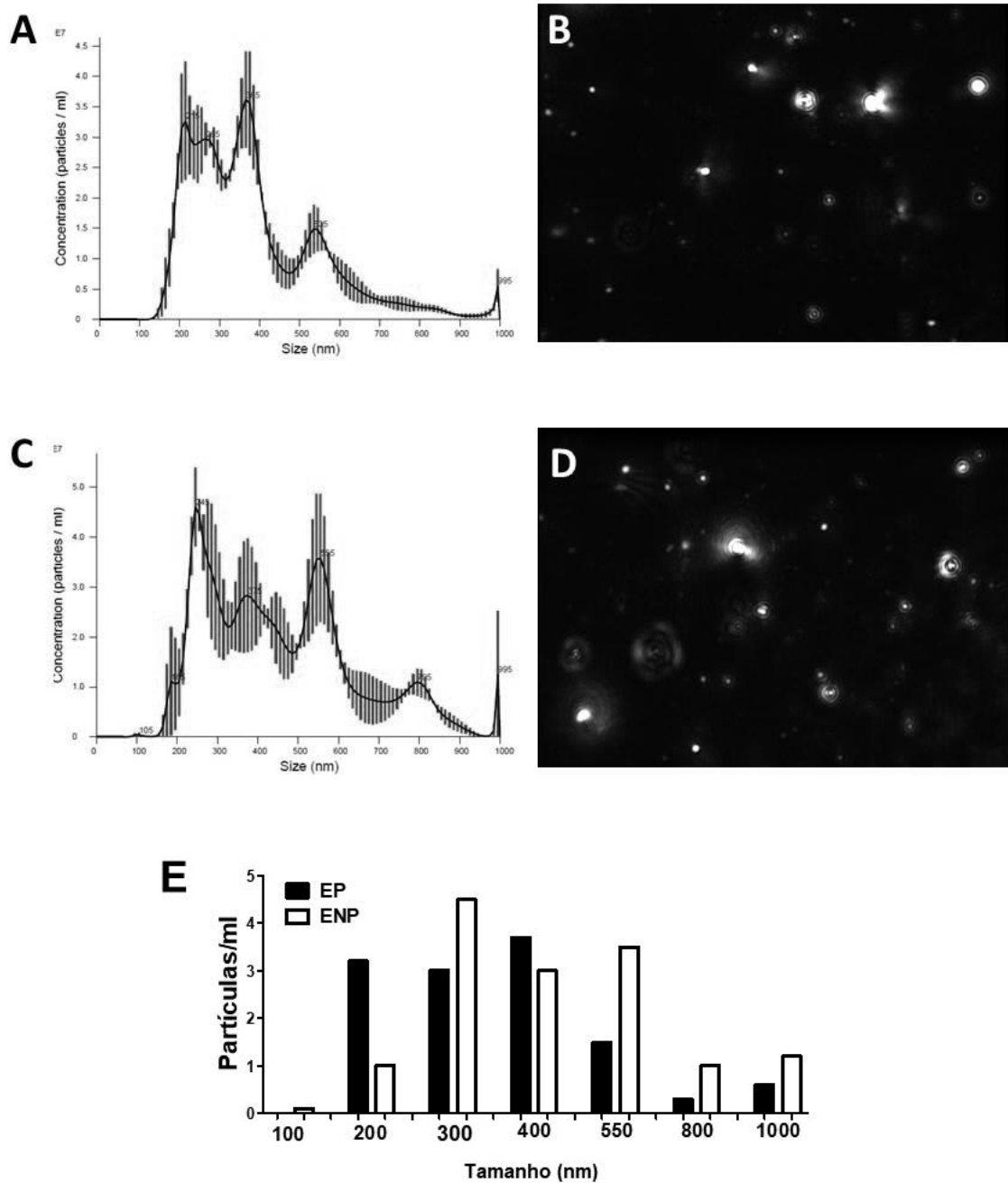


Figura 10. **Análise do tamanho das partículas por rastreamento de partículas em aparelho NanoSight.** (A) Gráfico da quantidade média dos tamanhos das partículas por ml liberadas pelas células do Epitélio Pigmentado de animais controles. (B) Imagem capturada das partículas quantificadas liberadas pelo EP de animais controles. (C) Gráfico da quantidade média dos tamanhos das partículas por ml liberadas pelas células do Epitélio Não-Pigmentado de animais controles. (D) Imagem capturada das partículas quantificadas liberadas pelo ENP de animais controles. (E) gráfico comparativo da contagem de VEs liberadas pelas células do EP e ENP.

4.5 Análise Morfológica das Microvesículas do Epitélio Ciliar

As microvesículas do EC liberadas ao meio extracelular foram coletadas e preparadas para análise ultra-estrutural em microscópio eletrônico de transmissão.

No panorama geral, detectamos grande quantidade de microvesículas no preparado histológico, algumas destas agrupadas e outras isoladas (Figura 11A). Ao analisar estas estruturas individualmente, detectamos vesículas de tamanhos diferenciados (Figura 11B, C e D), corroborando com os resultados obtidos pelo rastreamento de nanopartículas.

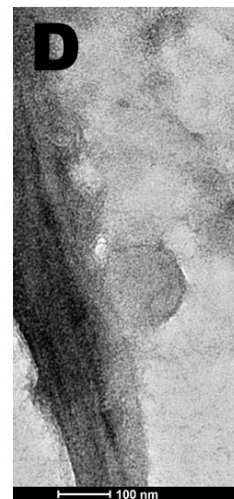
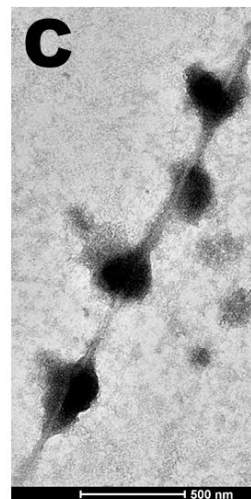
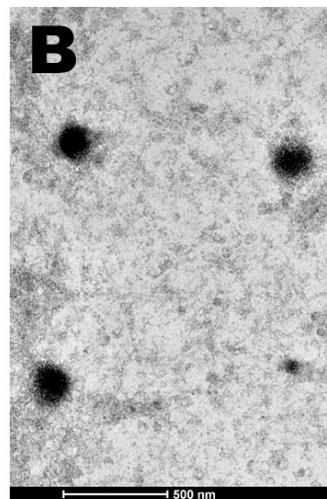
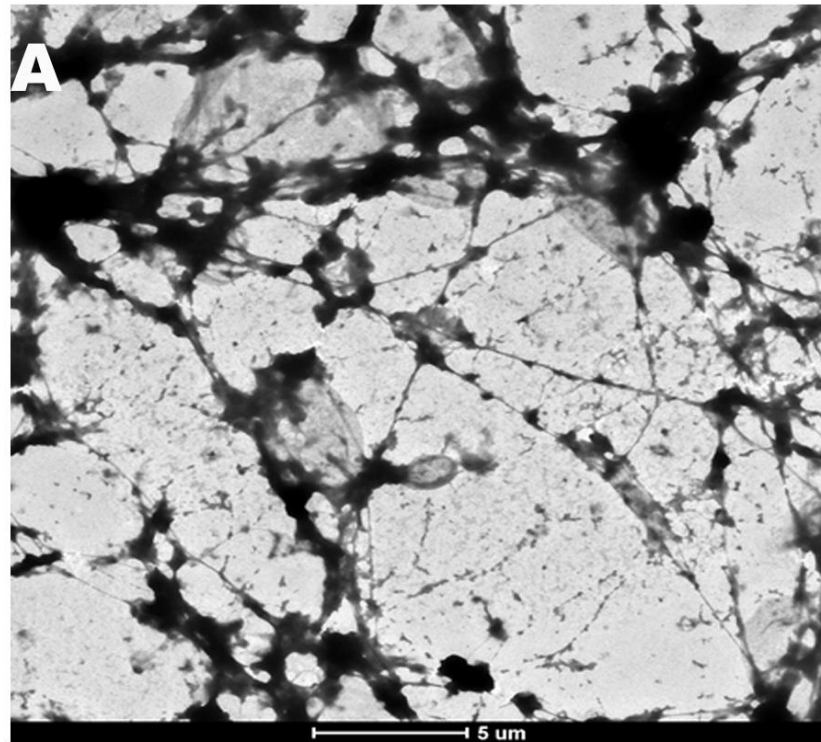


Figura 11. Morfologia das Vesículas Extracelulares. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão da ultra-estrutura de microvesículas liberadas por células do Epitélio Pigmentado de animais controles (A). Note os aumentos diferentes entre as figuras (A=500nm e B=1000nm) .

4.6 Genotipagem dos animais P23H

Os animais P23H, modelo de degeneração retiniana, apresentam uma substituição da prolina por uma histidina na posição 23 da rodopsina (R23 RHO). Por causa de alterações na forma desta proteína mutada, a rodopsina P23H é incapaz de iniciar de forma eficiente o processo de fototransdução, resultando na degeneração dos fotorreceptores.

Por serem heterozigotos, os animais P23H precisam ser genotipados para comprovar a presença da mutação degenerativa, antes de sua análise.

Os primers FR1 FR2 foram utilizados para detecção da transcrição do gene controle, e os primers POH1 POH2 foram confeccionados para detectar a mutação no gene P23H, que é responsável pela proteína rodopsina, presente nos fotorreceptores.

Todos os animais (controles e mutantes) apresentaram a expressão do gene controle de peso molecular de 1500pb (Figura 12). Os animais que apresentaram o gene da mutação, indicaram pela presença de uma banda adicional de peso molecular de 750 pb. Apenas estes animais foram selecionados para os experimentos de análise de degeneração.

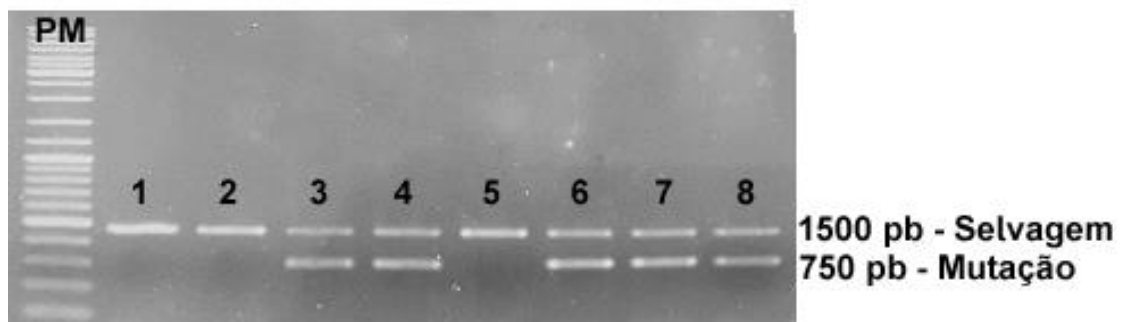


Figura 12. Genotipagem dos animais P23H. Análise por PCR convencional para a presença da mutação na rodopsina presente nos animais modelos de degeneração retiniana P23H.

4.7 Evolução da degeneração retiniana nos animais P23H

As retinas dos animais P23H sofrem processo de degeneração ao longo do desenvolvimento do animal (Figura 13). Nos primeiros dias (5 e 10 dias pós-natal) as retinas se apresentaram de forma semelhante nos animais controles (SDs) e com a degeneração retiniana (P23H), onde se observou a camada neuroblástica acentuada e poucas definições das futuras camadas plexiformes e nucleares.

Aos 35 dias, detectou-se uma discreta diminuição na espessura das camadas dos fotorreceptores nos animais com degeneração, observando-se diminuição na camada nuclear externa e na região dos segmentos internos e externos dos fotorreceptores.

Aos 100 dias de vida, a diferença entre as camadas dos fotorreceptores dos animais selvagens e dos animais com degeneração retiniana foi bastante evidente, indicando uma diminuição de mais de 50% na espessura da camada dos núcleos dos fotorreceptores e aproximadamente 70% de diminuição da camada dos segmentos dos fotorreceptores.

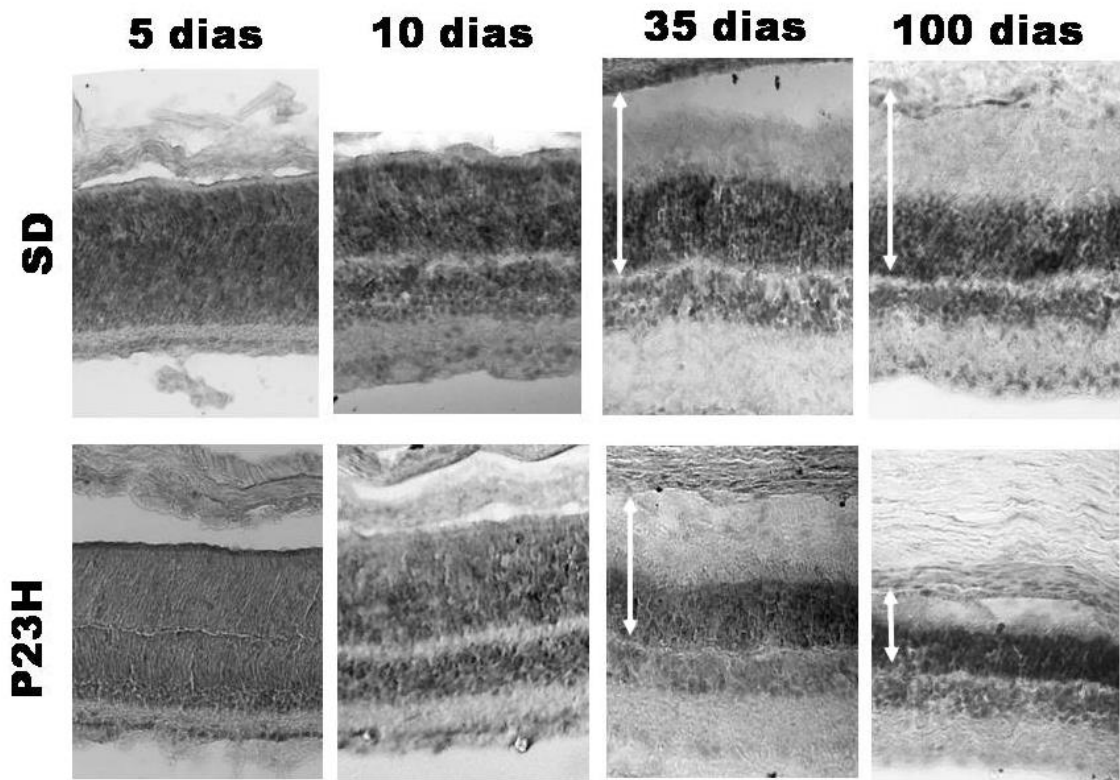


Figura 13. Análise morfológica por Hematoxilina e Eosina em cortes transversais de retinas de animais normais Sprague Dawley (SD) e com degeneração retiniana P23H. As setas indicam a espessura da camada dos fotorreceptores, incluindo a camada nuclear externa, de coloração mais escura, e a camada dos segmentos dos fotorreceptores (internos e externos), de coloração mais clara. A camada dos fotorreceptores se inicia abaixo das células do epitélio pigmentado retiniano (na extremidade superior da seta) e termina na camada plexiforme externa (na extremidade inferior da seta). Aumento médio de 40x.

A análise morfológica da região do Epitélio Ciliar não indicou alterações evidentes na morfologia da estrutura de animais controles e de animais com degeneração retiniana (Figura 14). Observou-se no detalhe da figura 14 (A e B) que as retinas da região marginal, próximas das regiões do EC, apresentaram a mesma espessura das camadas dos fotorreceptores (setas duplas), indicando que a degeneração retiniana atingiu a região central retiniana de forma diferente que na sua extremidade.

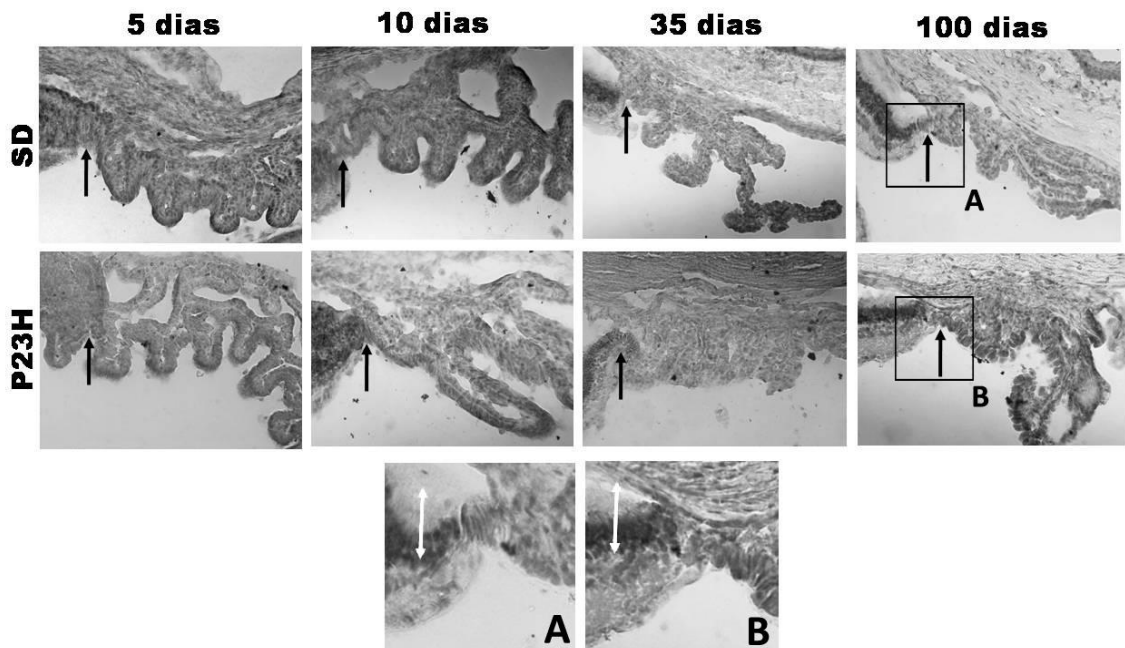


Figura 14. Análise morfológica por Hematoxilina e Eosina de cortes transversais do Epitélio Ciliar de animais normais Sprague Dawley (SD) e com degeneração retiniana P23H. As setas pretas indicam o final da retina à esquerda e início do EC à direita. Em (A) e (B) se encontram figuras em maior aumento do especificado acima. As setas duplas brancas em A e B indicam a espessura da camada dos fotorreceptores na periferia da retina. Aumento médio de 40x.

4.8 Expressão dos marcadores microvesiculares no EC de animais com degeneração retiniana

Os animais com degeneração retiniana apresentaram padrão de expressão dos marcadores vesiculares de forma diferenciada dos animais controles (Figura 15). Nestes animais, foram encontrados mais expressos no EP os transcritos de icam, alix, anexinaV, cd63 e tsg101. Em contrapartida, os transcritos de epcam e hsp70 foram mais expressos nas células do ENP. Estes resultados sugerem que a degeneração retiniana interfere com a expressão dos marcadores vesiculares e, possivelmente, com sua composição.

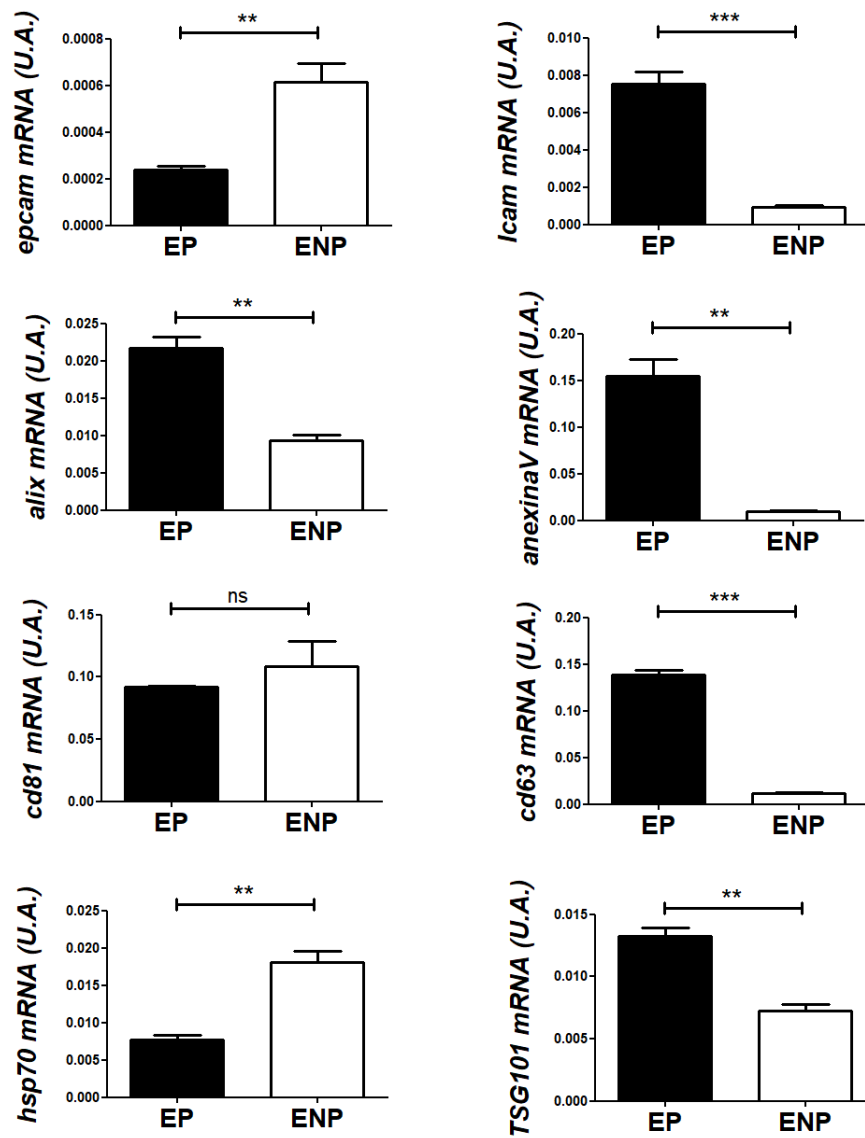


Figura 15 - Expressão transcricional de marcadores de microvesículas nos modelos de degeneração retiniana. Análise por PCR em tempo real da expressão dos transcritos de *epcam*, *icam*, *alix*, *anexinaV*, *cd81*, *cd63*, *hsp70* e *tsg101* nas células do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) de animais P23H. Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. ** $p < 0,005$ ***, $p < 0,0005$, ns = não significativo.

4.9 Quantificação de Microvesículas liberadas pelas células do Epitélio Ciliar

Nossa análise quantitativa da liberação das microvesículas liberadas pelas células do EP dos animais com degeneração retiniana indicaram um padrão semelhante de distribuição comparado com os animais controles, sendo em sua maioria microvesículas pequenas de 200 e 300 nm (~4.5 e 5.5 partículas/ml, respectivamente), e menor quantidade de microvesículas maiores, como 400 e 700nm (~3.5 e 1 partículas/ml, respectivamente) (Figura 16A, B e E).

Em contrapartida, as células do ENP de animais P23H apresentaram maior quantidade de liberação de microvesículas de tamanhos maiores e mais variados em comparação com as células do ENP de animais controles, 155nm (~0.5 partículas/ml), 200 e 300 nm (~1.5 partículas/ml), 500 nm (~2.5 partículas/ml), 600 e 700 nm (~ 1 partícula/ml) e 1 μ m (~2 partículas/ml) (Figura 16C, D e E).

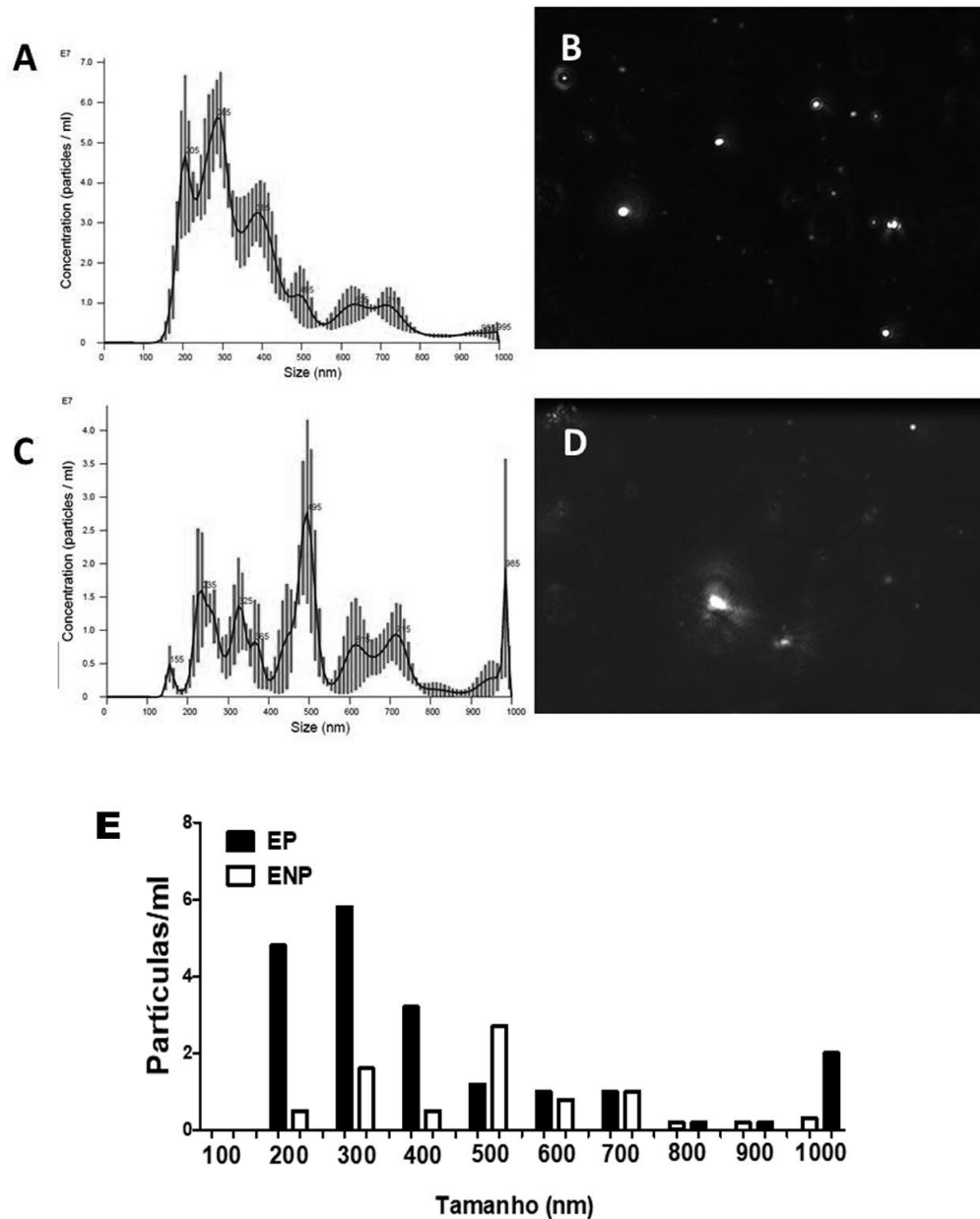


Figura 16. Análise do tamanho das partículas por rastreamento de partículas em aparelho NanoSight. (A) Gráfico da quantidade média dos tamanhos das partículas por ml liberadas pelas células do Epitélio Pigmentado de animais com degeneração retiniana P23H. (B) Imagem capturada das partículas quantificadas liberadas pelo EP de animais P23H. (C) Gráfico da quantidade média dos tamanhos das partículas por ml liberadas pelas células do Epitélio Não-Pigmentado de animais P23H. (D) Imagem capturada das partículas quantificadas liberadas pelo ENP de animais P23H. (E) gráfico comparativo da contagem de VEs liberadas pelas células do EP e ENP.

5. DISCUSSÃO

Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar e liberar diversas moléculas para o meio extracelular dentro de estruturas vesiculares, com ação parácrina e/ou endócrina. Essas vesículas contêm uma grande variedade de receptores em sua superfície celular, proteínas de sinalização intracelular e material genético derivado de sua célula de origem (LI ET AL., 2019; MENG ET AL., 2019; KLINGEBORN ET AL., 2017; BORIACHEK ET AL., 2017; PACE ET AL., 2016). Estudos recentes demonstraram que as VEs podem influenciar o microambiente celular de forma benéfica, como por exemplo, VEs liberadas pelas células-tronco, que demonstraram induzir efeitos terapêuticos em modelos animais cardíacos (LI ET AL., 2019; CHEN ET AL., 2018; PEREZ-HERNANDEZ ET AL., 2017; MONSEL ET AL., 2016), devido a sua capacidade de transferir moléculas bioativas para células receptoras ou liberar conteúdos para o microambiente, resultando em mudanças no comportamento e/ou fenótipo celular ou de próprio microambiente.

Nesse trabalho, demonstramos que as células do EC são capazes de produzir e liberar VEs, sendo estas em quantidade e tamanhos variados.

As VEs têm se demonstrado um importante biomarcador de prognóstico e diagnóstico para diferentes fisiopatologias, como o câncer por exemplo. Já foi demonstrado que VEs desempenham importante papel na fisiologia de células-tronco (ZHANG ET ALI., 2016; TAYLOR ET AL., 2013), sendo, inclusive, utilizadas em estudos experimentais para tratar doenças neurodegenerativas.

Dados recentes demonstraram resultados positivos no tratamento de Parkinson em modelo animal utilizando vesículas como terapia alternativa, onde foi observada uma melhora no quadro clínico e sintomatologia dos animais. A partir disso, diversos grupos independentes consideram promissora a utilização de vesículas no tratamento de doenças neurodegenerativas (PICCA ET AL., 2019; VOGEL ET AL., 2018). Na medicina regenerativa, alguns estudos pré-clínicos sugerem que as VEs podem reproduzir o mesmo efeito do tratamento com células-tronco, sendo um promissor substituto para terapia celular (LEE ET AL., 2019).

No EC, detectamos que as células do EP apresentaram VEs de tamanhos menores em comparação com as células do ENP. Isso pode refletir

no conteúdo e função destas VEs. Sabe-se que as células do ENP são altamente secretoras, produzindo uma variedade de substâncias enviadas ao ambiente interno do olho e que farão parte da composição do vítreo. Estudos complementares são necessários para analisar a composição destas VEs e compreender seu papel ambiente ocular.

Detectamos que os animais modelos de degeneração da retina apresentaram diferenças na expressão dos marcadores de microvesículas, assim como liberaram VEs de tamanhos diferenciados em comparação com os animais controles. Isso sugere que o processo degenerativo interfere na síntese destas VEs, que, provavelmente, também tenham conteúdos e funções diferenciadas.

Ratos transgênicos com a mutação P23H na rodopsina apresentam maior susceptibilidade a danos nas células fotorreceptoras em comparação a animais normais. Sabe-se também que a degeneração retiniana se deve a exposição elevada a luz, que conseqüentemente afeta a rodopsina levando a perda das células fotorreceptoras por meio de apoptose (CHEN ET AL., 2014; SAKAMI ET AL., 2014; SOTOCA ET AL., 2014).

Sabe-se há mais de 100 mutações *RHO* diferentes, representando 10% dos casos de RP. *RHO* é um gene responsável por codificar a proteína Rodopsina, composta por uma parte proteína *Opsina* ligada a uma parte não proteica derivada da vitamina A, o cromóforo conjugado *11-cis-retinal*. Após a absorção da luz, o cromóforo isomeriza-se em *all-trans-retinal*, sofrendo alterações conformacionais da rodopsina, subsequentes a ativação da cascata de fototransdução, produzindo reações que levam a impulsos nervosos. (MONAI ET AL., 2018; NAKAMURA ET AL., 2017; CHIANG ET AL., 2016; CHEN ET AL., 2015; ORHAN ET AL., 2015; INGLEHEARN ET AL., 1991; SUNG ET AL., 1993; DRYJA ET AL., 1990).

Ensaio para analisar a função destas vesículas nas células-alvo são fundamentais para a compreensão do efeito destas estruturas no tecido de animais controles e em situação de degeneração retiniana.

6. CONCLUSÕES

Uma vez que as Vesículas Extracelulares apresentam importante funções de sinalização entre as células de um microambiente, seu estudo nas células do EC se torna fundamental, pois estas células são conhecidas por serem potenciais fontes de células-tronco retinianas e desempenham papéis importantes na fisiologia do olho.

Neste trabalho mostramos que as células do EC apresentam estruturas microvesiculares em seu citoplasma e que liberam vesículas ao meio extracelular. Uma vez que expressam os marcadores de vesículas mais conhecidos na literatura atualmente, acredita-se que estes marcadores desempenhem função importante na biogênese destas vesículas.

As células do EP e ENP apresentam diferenças na quantidade de transcritos destes marcadores, o que pode refletir nas características morfológicas e quantidades diferenciadas de VEs liberadas ao meio extracelular.

Nos animais com degeneração retiniana, as VEs liberadas pelas células do ENP se apresentaram maiores que nos animais controles, sugerindo que esta condição interfira diretamente com a síntese e conteúdo destas vesículas.

De forma geral, o conhecimento das características das VEs liberadas pelas células do EC pode gerar informações importantes sobre a resposta tecidual durante os processos degenerativos da retina e possível tentativa de regeneração deste tecido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO, AM, Arnault E, Perron M. Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(8-9):993-1001.
- ANTIMISIARIS, Sophia G et al. "Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery." *Pharmaceutics* vol. 10,4 218. 6 Nov. 2018, doi:10.3390/pharmaceutics10040218
- ARNHOLD, S. et al. Iris pigment epithelial cells: a possible cell source for the future treatment of neurodegenerative diseases. *Exp Neurol*, v. 187, n. 2, p. 410-7, Jun 2004. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144867> >.
- ANDALOUSSI SE, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(5):347-57.
- ARRAUD, N. et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis And Haemostasis*, [s.l.], v. 12, n. 5, p.614-627, maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12554>.
- ABELS, Erik R, and Xandra O Breakefield. "Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake." *Cellular and molecular neurobiology* vol. 36,3 (2016): 301-12. doi:10.1007/s10571-016-0366-z
- AKERS, Johnny C et al. "Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies." *Journal of neuro-oncology* vol. 113,1 (2013): 1-11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8.
- ABDOUH, M.; BERNIER, G. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Exp. Eye Res.*, v. 83, n. 1, p. 153-164, 2006.
- AYOUB, George S.; COPENHAGEN, David R.. Application of a fluorometric method to measure glutamate release from single retinal photoreceptors. *Journal Of Neuroscience Methods*, [s.l.], v. 37, n. 1, p.7-14, mar. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90016-s](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(91)90016-s).
- ABRAMOFF, Michael & Garvin, Mona & Sonka, Milan. (2010). Retinal Imaging and Image Analysis. *Biomedical Engineering, IEEE Reviews in.* 3. 169 - 208. 10.1109/RBME.2010.2084567.
- AGHAJANI NARGESI, Arash et al. "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges." *Stem cell research & therapy* vol. 8,1 273. 4 Dec. 2017, doi:10.1186/s13287-017-0727-7
- BROWN, Paul K; WALD, GEORGE., Visual Pigments in Single Rods and Cones of the Human Retina. *SCIENCE*, 144:45-51, 1964.
- BÖRGER, Verena et al. "Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents." *International journal of molecular sciences* vol. 18,7 1450. 6 Jul. 2017, doi:10.3390/ijms18071450
- BRONISZ, Agnieszka; GODLEWSKI, Jakub; CHIOCCA, E. Antonio. Extracellular Vesicles and MicroRNAs: Their Role in Tumorigenicity and Therapy for Brain Tumors. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.361-376, 17 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-015-0293-4>.
- BUCZYLKO, J.; Saari, J.C.; Crouch, R.K. and Palczewski, K.: Mechanisms of opsin activation. *J Biol Chem* 271:20621-20630, 1996.
- BAEK, Gyuhyeon et al. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutics and as a Drug Delivery Platform." *Stem cells translational medicine* vol. 8,9 (2019): 880-886. doi:10.1002/sctm.18-0226.
- BÖRGER V, Bremer M, Ferrer-Tur R, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1450.

- BATHINI, S et al. "Nano-Bio Interactions of Extracellular Vesicles with Gold Nanoislands for Early Cancer Diagnosis." *Research (Washington, D.C.)* vol. 2018 3917986. 9 Oct. 2018, doi:10.1155/2018/3917986.
- BORDAY C., Cabochette P., Parain K., Mazurier N., Janssens S., Tran H. T., Sekkali B., Bronchain O., Vleminckx K., Locker M. et al. (2012). Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development* 139, 3499-3509. 10.1242/dev.079582
- BÉLANGER, Marie-claude; ROBERT, Benoit; CAYOUILLE, Michel. Msx1-Positive Progenitors in the Retinal Ciliary Margin Give Rise to Both Neural and Non-neural Progenies in Mammals. *Developmental Cell*, [s.l.], v. 40, n. 2, p.137-150, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.020>
- BACAKOVA, Lucie et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 36, n. 4, p.1111-1126, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>.
- BHATIA, Bhairavi et al. "Adult retinal stem cells revisited." *The open ophthalmology journal* vol. 4 30-8. 8 Jul. 2010, doi:10.2174/1874364101004010030
- BAI, L. et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes on Experimental Autoimmune Uveitis. *Sci Rep.* 2017 Jun 28;7(1):4323. doi: 10.1038/s41598-017-04559-y. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659587>>.
- BHATTACHARYYA A. & Svendsen C.N. 2003. Human neural stem cells: a new tool for studying cortical development in Down's syndrome. *Genes Brain Behav.* 2:179-186.
- BHATIA, B. et al. Distribution of Müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Exp Eye Res*, v. 89, n. 3, p. 373-82, Sep 2009. ISSN 1096-0007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379736> >.
- BORGES, F T et al. "Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases." *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas* vol. 46,10 (2013): 824-30. doi:10.1590/1414-431X20132964
- BORIACHEK, Kseniia et al. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small*, [s.l.], v. 14, n. 6, p.1702153-1702165, 28 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201702153>.
- COHEN, G.B.; Yang, T.; Robinson, P.R.: Mechanism of activation and inactivation of opsin: role of Glu13 and Lys269. *Biochemistry* 31:12592-12601, 1992
- CHENG, X. et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration. *J Cell Mol Med.* 2017 Aug 14. doi: 10.1111/jcmm.13316. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28805297>>.
- CURCIO, Christine A. et al. Human photoreceptor topography. *The Journal Of Comparative Neurology*, [s.l.], v. 292, n. 4, p.497-523, 22 fev. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902920402>.
- CEHAJIC-KAPETANOVIC, Jasmina et al. Clinical and Molecular Characterization of PROM1-Related Retinal Degeneration. *Jama Network Open*, [s.l.], v. 2, n. 6, p.195752-195762, 14 jun. 2019. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.5752>.
- CHANG, Bo. "Mouse models for studies of retinal degeneration and diseases." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 935 (2013): 27-39. doi:10.1007/978-1-62703-080-9_2
- CHEN, Carol W et al. "Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction." *Cardiovascular research* vol. 114,7 (2018): 1029-1040. doi:10.1093/cvr/cvy067.
- CÔCO, Monique; HAN, Sang Won; SALLUM, Juliana Maria Ferraz. Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, [s.l.], v. 72, n. 4, p.560-

- 566, ago. 2009. FaC UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27492009000400026>.
- COCUCCI E, Meldolesi J. Exosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015;25(6):364–372.
- CIREGIA, Federica et al. “Extracellular Vesicles in Brain Tumors and Neurodegenerative Diseases.” *Frontiers in molecular neuroscience* vol. 10 276. 31 Aug. 2017, doi:10.3389/fnmol.2017.00276.
- CERVENY KL, Varga M, Wilson SW. Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Dev Neurobiol.* 2012 Mar;72(3):328-45. doi: 10.1002/dneu.20917.
- CHOI DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev.* 2015 Jul-Aug;34(4):474-90. doi: 10.1002/mas.21420. Epub 2014 Jan 14.
- CHOI, Hongyoon, and Dong Soo Lee. “Illuminating the physiology of extracellular vesicles.” *Stem cell research & therapy* vol. 7,1 55. 16 Apr. 2016, doi:10.1186/s13287-016-0316-1. DESROCHERS, Laura M et al. “Extracellular Vesicles: Satellites of Information Transfer in Cancer and Stem Cell Biology.” *Developmental cell* vol. 37,4 (2016): 301-309. doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.019.
- CHEN, Yuanyuan et al. “A High-Throughput Drug Screening Strategy for Detecting Rhodopsin P23H Mutant Rescue and Degradation.” *Investigative ophthalmology & visual science* vol. 56,4 (2015): 2553-67. doi:10.1167/iovs.14-16298.
- COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell And Developmental Biology*, [s.l.], v. 30, n. 1, p.255-289, 11 out. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- CHARGAFF E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946; 166:189–97.
- CHIANG, Wei-Chieh et al. “Ablation of Chop Transiently Enhances Photoreceptor Survival but Does Not Prevent Retinal Degeneration in Transgenic Mice Expressing Human P23H Rhodopsin.” *Advances in experimental medicine and biology* vol. 854 (2016): 185-91. doi:10.1007/978-3-319-17121-0_25
- CHOHAN, Annu et al. Müller stem cell dependent retinal regeneration. *Clínica Chimica Acta*, [s.l.], v. 464, p.160-164, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.11.030>.
- CENTANIN, L.; WITTBRODT, J. Retinal neurogenesis. **Development**, [s.l.], v. 141, n. 2, p.241-244, 31 dez. 2013. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.083642>.
- CHO, Gun-Sik et al. “Regenerative medicine for the heart: perspectives on stem-cell therapy.” *Antioxidants & redox signaling* vol. 21,14 (2014): 2018-31. doi:10.1089/ars.2014.6063
- DAI, Guang-Chun et al. “Tendon stem/progenitor cell ageing: Modulation and rejuvenation.” *World journal of stem cells* vol. 11,9 (2019): 677-692. doi:10.4252/wjsc.v11.i9.677
- D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn, and Dolores Di Vizio. “Biology and proteomics of extracellular vesicles: harnessing their clinical potential.” *Expert review of proteomics* vol. 11,3 (2014): 251-3. doi:10.1586/14789450.2014.874290
- DAS, A. V. et al. Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res*, v. 45, n. 13, p. 1653-66, Jun 2005. ISSN 0042-6989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15792841> >.
- DAS, A.V. et al. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev Biol*, v. 273, n. 1, p. 87-105, Sep 2004. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302600> >.
- D'ASTI, E. et al. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol*, v. 3, p. 294, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934045> >.

- DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, v. 16, n. 3, p. 235-49, May 2011. ISSN 1466-1268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20963644> >.
- DUTTAGUPTA, R. et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*, v. 6, n. 6, p. e20769, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698099> >.
- DRYJA TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*. 1990;343(6256):364–6.
- EI YAKOUBI, Warif et al. “Hes4 controls proliferative properties of neural stem cells during retinal ontogenesis.” *Stem cells (Dayton, Ohio)* vol. 30,12 (2012): 2784-95. doi:10.1002/stem.1231
- FISCHER, Andy J.; BOSSE, Jennifer L.; EL-HODIRI, Heithem M. The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Experimental Eye Research*, [s.l.], v. 116, p.199-204, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.08.018>.
- FISCHER, A. J.; REH, T. A. Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev Biol*, v. 259, n. 2, p. 225-40, Jul 2003. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871698> >.
- FISHER, A.J.; REH, T.A. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev. Biol.*, v. 220, n. 2, p. 197-210, 2000.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Laura et al. “Retinal Vascular Degeneration in the Transgenic P23H Rat Model of Retinitis Pigmentosa.” *Frontiers in neuroanatomy* vol. 12 55. 29 Jun. 2018, doi:10.3389/fnana.2018.00055
- FERREIRA, Andrea da Fonseca, and Dawidson Assis Gomes. “Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair.” *Bioengineering (Basel, Switzerland)* vol. 6,1 4. 30 Dec. 2018, doi:10.3390/bioengineering6010004
- FLEISCHHAUER, J; A NJOH, W; NIEMEYER, G. Syndromic Retinitis Pigmentosa: ERG and Phenotypic Changes. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, [s.l.], v. 222, n. 03, p.186-190, mar. 2005. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-857973>.
- FRATTINI, P. et al. Autologous intramuscular transplantation of engineered satellite cells induces exosome-mediated systemic expression of Fukutin-Related Protein and rescues disease phenotype in a murine model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2I. *Hum Mol Genet*. 2017 Jun 29. doi: 10.1093/hmg/ddx252. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28666318>>.
- GANGODA, L. ET AL. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomic*, p.1-37, 11 out.2014.
- GASPARINI, Sylvia J. et al. Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives. *Progress In Retinal And Eye Research*, [s.l.], v. 69, p.1-37, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.11.001>.
- GARDINER C, Di Vizio D, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016; 5:32945.
- GIEBEL B, Kordelas L, Börger V. Potencial clínico de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais / células estromais . *Investig* . 2017; 4 (10): 84–84.
- GAO, Xiao-Fei et al. “Exosomes in Coronary Artery Disease.” *International journal of biological sciences* vol. 15,11 2461-2470. 7 Sep. 2019, doi:10.7150/ijbs.36427
- GRANGE, C et al. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Kidney Regeneration. *Cells*. 2019 Oct 11;8(10). pii: E1240. doi: 10.3390/cells8101240
- GREENING, David W. et al. A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture

- Methods. *Methods in Molecular Biology*, [s.l.], p.179-209, 2015. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_15.
- GRANGE, Cristina et al. Role of HLA-G and extracellular vesicles in renal cancer stem cell-induced inhibition of dendritic cell differentiation. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-11, dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-2025-z>.
- GOULD SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
- GILL, Sukhvinder et al. "Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond." *FEMS microbiology reviews* vol. 43,3 (2019): 273-303. doi:10.1093/femsre/fuy042.
- GYÖRGY, Bence et al. "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles." *Cellular and molecular life sciences: CMLS* vol. 68,16 (2011): 2667-88. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
- GURDON JB. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10: 622–640.
- HARDING C., Heuser J., Stahl P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor release. *EUR J. Cell Biol*. 35, 256-263.
- HARUTA, M. et al. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci*, v. 4, n. 12, p. 1163-4, Dec 2001. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704762> >.
- HAMEL, Christian. "Retinitis pigmentosa." *Orphanet journal of rare diseases* vol. 1 40. 11 Oct. 2006, doi:10.1186/1750-1172-1-40
- HOLLANDER, Anneke I. Den et al. Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Progress In Retinal And Eye Research*, [s.l.], v. 27, n. 4, p.391-419, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.05.003>.
- HOLLYFIELD, J.G. Differential addition of cells to the retina in *Rana pipiens* tadpoles. *Dev. Biol.*, v. 18, n. 2, p. 163-79, 1968.
- HUANG, JH. et al. Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Attenuates Apoptosis, Inflammation and Promotes Angiogenesis after Contusion Spinal Cord Injury in Rats. *J Neurotrauma*. 2017 Jun 30. doi: 10.1089/neu.2017.5063. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28665182>>.
- INGLAHEARN CF, Bashir R, Lester DH, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS. A 3-bp deletion in the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 1991;48(1):26–30.
- ISHIGURO, K et al. Isolation of Tissue Extracellular Vesicles from the Liver. *J Vis Exp*. 2019 Aug 21;(150). doi: 10.3791/58649.
- INAGAKI, Emi et al. "Skin-Derived Precursors as a Source of Progenitors for Corneal Endothelial Regeneration." *Stem cells translational medicine* vol. 6,3 (2017): 788-798. doi:10.1002/sctm.16-0162
- IWAFUCHI-DOI, Makiko, and Kenneth S Zaret. "Pioneer transcription factors in cell reprogramming." *Genes & development* vol. 28,24 (2014): 2679-92. doi:10.1101/gad.253443.114
- JIN, Zi-bing et al. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Progress In Retinal And Eye Research*, [s.l.], v. 69, p.38-56, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.11.003>.
- JOHNS P.R. 1977. Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J. Comp. Neurol*. 176:343–357. 10.1002/cne.901760304.
- JOHNS, P. R. Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J. Comp. Neurol.*, v. 176, n. 3, p. 343-357, 1977.

- JUAN, Thomas; FÜRTHAUER, Maximilian. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, [s.l.], v. 74, p.66-77, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.022>.
- JEON, Sohee, and Il-Hoan Oh. "Regeneration of the retina: toward stem cell therapy for degenerative retinal diseases." *BMB reports* vol. 48,4 (2015): 193-9. doi:10.5483/bmbrep.2015.48.4.276
- JAN, Arif Tasleem et al. "Perspective Insights of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: A Critical Appraisal." *Frontiers in aging neuroscience* vol. 9 317. 29 Sep. 2017, doi:10.3389/fnagi.2017.00317
- KIM, Dae-kyum et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal Of Extracellular Vesicles*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.20384-20392, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.20384>.
- KIM, Dae-kyum et al. EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, [s.l.], v. 40, p.4-7, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.005>.
- KÜHN, Hermann et al. Phosphorylation of rhodopsin as a possible mechanism of adaptation. *Biophysics Of Structure And Mechanism*, [s.l.], v. 3, n. 2, p.175-180, 1977. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00535815>.
- KALRA H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, et al. (2012) Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLOS Biology* 10(12): e1001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>.
- KOLB, H. et al. Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res*, v. 131, p. 3-26, 2001. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420950> >.
- KUBOTA R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Mar 31; 134(1-2):31-41.
- KLINGEBORN, Mikael et al. "Roles of exosomes in the normal and diseased eye." *Progress in retinal and eye research* vol. 59 (2017): 158-177. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.04.004
- KLASSEN, HJ ET AL., Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 45 (2004), pp. 4167-4173
- KAGOTA agota, Shuji et al. "Analysis of Extracellular Vesicles in Gastric Juice from Gastric Cancer Patients." *International journal of molecular sciences* vol. 20,4 953. 22 Feb. 2019, doi:10.3390/ijms20040953
- KITA, S et al. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 129(10):4041-4049, 2019 Oct 1. doi: 10.1172/JCI129193.
- LEE, Jingyun et al. "Altered Proteome of Extracellular Vesicles Derived from Bladder Cancer Patients Urine." *Molecules and cells* vol. 41,3 (2018): 179-187. doi:10.14348/molcells.2018.2110
- LI, Beibei et al. PiRNA-823 delivered by multiple myeloma-derived extracellular vesicles promoted tumorigenesis through re-educating endothelial cells in the tumor environment. *Oncogene*, [s.l.], v. 38, n. 26, p.5227-5238, 19 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-0788-4>.
- LI, Jiao Jiao et al. "Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Treating Joint Injury and Osteoarthritis." *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* vol. 9,2 261. 14 Feb. 2019, doi:10.3390/nano9020261
- LENER T, Gimona M, Aigner L, et al. Applying extracellular vesicles-based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2015;(4)30087
- LI, Yujuan et al. "Malignant ascite-derived extracellular vesicles inhibit T cell activity by upregulating Siglec-10 expression." *Cancer management and research* vol. 11 7123-7134. 29 jul. 2019, doi:10.2147/CMAR.S210568.

- LI, Na et al. "Recent advances of exosomes in immune-mediated eye diseases." *Stem cell research & therapy* vol. 10,1 278. 30 Aug. 2019, doi:10.1186/s13287-019-1372-0
- LU, B et al. Transplantation of EGF-responsive neurospheres from GFP transgenic mice into the eyes of rd mice. *Brain Research*, [s.l.], v. 943, n. 2, p.292-300, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02906-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02906-2).
- LI, Q. et al. Extracellular vesicle-mediated bone metabolism in the bone microenvironment. *J Bone Miner Metab.* 2017 Aug 1. doi: 10.1007/s00774-017-0860-5. Review. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28766139>>.
- LAVAIL, Matthew M et al. "Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration." *Experimental eye research* vol. 167 (2018): 56-90. doi:10.1016/j.exer.2017.10.023
- LEE, Jae Hoon et al. "Therapeutic use of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in acute lung injury." *Transfusion* vol. 59,S1 (2019): 876-883. doi:10.1111/trf.14838
- MOISSEIEV, E. et al. Protective Effect of Intravitreal Administration of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells on Retinal Ischemia. *Curr Eye Res.* 2017 Jun 21:1-10. doi: 10.1080/02713683.2017.1319491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28636406>>.
- MENG, Wanrong et al. "Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment." *Molecular cancer* vol. 18,1 57. 30 Mar. 2019, doi:10.1186/s12943-019-0982-6
- MOSHIRI, Ala, and Thomas A Reh. "Persistent progenitors at the retinal margin of ptc+/- mice." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 24,1 (2004): 229-37. doi:10.1523/JNEUROSCI.2980-03.2004
- MURALIDHARAN-CHARI, Vandhana et al. "Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression." *Journal of cell science* vol. 123, Pt 10 (2010): 1603-11. doi:10.1242/jcs.064386.
- MONSEL, Antoine et al. "Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases." *Expert opinion on biological therapy* vol. 16,7 (2016): 859-71. doi:10.1517/14712598.2016.1170804
- MONAI, Natsuki et al. "Characterization of photoreceptor degeneration in the rhodopsin P23H transgenic rat line 2 using optical coherence tomography." *PloS one* vol. 13,3 e0193778. 9 Mar. 2018, doi:10.1371/journal.pone.0193778
- MORRISON, Sean J, and Allan C Spradling. "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." *Cell* vol. 132,4 (2008): 598-611. doi:10.1016/j.cell.2008.01.038
- NAKAMURA, Paul A et al. "Small molecule Photoregulin3 prevents retinal degeneration in the RhoP23H mouse model of retinitis pigmentosa." *eLife* vol. 6 e30577. 17 Nov. 2017, doi:10.7554/eLife.30577
- NAIR, Rohini Ravindran et al. "LPS-Challenged Macrophages Release Microvesicles Coated With Histones." *Frontiers in immunology* vol. 9 1463. 27 jun. 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.01463
- ORHAN, Elise et al. "Genotypic and phenotypic characterization of P23H line 1 rat model." *PloS one* vol. 10,5 e0127319. 26 May. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0127319.
- OTTESON DC, Hitchcock PF. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res.* 2003 Apr; 43(8):927-36.
- PIETRO Maria Bertelli, Edoardo Pedrini, Jasenka Guduric-Fuchs, Elisa Peixoto, Varun Pathak, Alan W. Stitt & Reinhold J. Medina (2019) Vascular regeneration for ischemic retinopathies: Hope from cell therapies, *Current Eye Research*, DOI: 10.1080/02713683.2019.1681004
- PRICE, Brandee A et al. "Mislocalization and degradation of human P23H-rhodopsin-GFP in a knockin mouse model of retinitis pigmentosa." *Investigative ophthalmology & visual science* vol. 52,13 9728-36. 28 Dec. 2011, doi:10.1167/iovs.11-8654

- PEREZ-HERNANDEZ, Javier et al. "Extracellular Vesicles as Therapeutic Agents in Systemic Lupus Erythematosus." *International journal of molecular sciences* vol. 18,4 717. 28 Mar. 2017, doi:10.3390/ijms18040717
- PAKRAVAN, K. et al. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017 Jul 24. doi: 10.1007/s13402-017-0335-7. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741069>.
- PACE, Karma R et al. "Exosomal L1CAM Stimulates Glioblastoma Cell Motility, Proliferation, and Invasiveness." *International journal of molecular sciences* vol. 20,16 3982. 16 Aug. 2019, doi:10.3390/ijms20163982
- PENNESI, Mark E et al. "Animal models of age related macular degeneration." *Molecular aspects of medicine* vol. 33,4 (2012): 487-509. doi:10.1016/j.mam.2012.06.003
- PEVNY L. & Rao M.S. 2003. The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci*. 26:351-359.
- PICCA, Anna et al. "Mitochondrial-Derived Vesicles as Candidate Biomarkers in Parkinson's Disease: Rationale, Design and Methods of the EXosomes in PARKinson Disease (EXPAND) Study." *International journal of molecular sciences* vol. 20,10 2373. 14 May. 2019, doi:10.3390/ijms20102373
- REH T.A., and Levine E.M. 1998. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J. Neurobiol*. 36:206–220. 10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<206: AID-NEU8>3.0.CO;2-5.
- ROBBINS, Paul D, and Adrian E Morelli. "Regulation of immune responses by extracellular vesicles." *Nature reviews. Immunology* vol. 14,3 (2014): 195-208. doi:10.1038/nri3622
- ROYO, Felix et al. "Differences in the metabolite composition and mechanical properties of extracellular vesicles secreted by hepatic cellular models." *Journal of extracellular vesicles* vol. 8,1 1575678. 11 Feb. 2019, doi:10.1080/20013078.2019.1575678
- ROME, Sophie et al. "Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art." *Frontiers in physiology* vol. 10 929. 9 Aug. 2019, doi:10.3389/fphys.2019.00929
- SUNG CH, Davenport CM, Nathans J. Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain. *J Biol Chem*. 1993;268(35):26645–9
- SIMONS, M; raposo, g. exosomes-vesicles carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, v.21, n.4. 575-81, ago. 2009.
- STEIN JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J*. 1991;274 (Pt 2):381–43.
- SUN, Xiao et al. "Application potential of stem/progenitor cell-derived extracellular vesicles in renal diseases." *Stem cell research & therapy* vol. 10,1 8. 8 Jan. 2019, doi:10.1186/s13287-018-1097-5
- STRAZNICKY K., and Gaze R.M. 1971. The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 26:67–79.
- SAKAMI, Sanae et al. "P23H opsin knock-in mice reveal a novel step in retinal rod disc morphogenesis." *Human molecular genetics* vol. 23,7 (2014): 1723-41. doi:10.1093/hmg/ddt561
- SOTOCA, Jorge V et al. "Hearing impairment in the P23H-1 retinal degeneration rat model." *Frontiers in neuroscience* vol. 8 297. 17 Sep. 2014, doi:10.3389/fnins.2014.00297
- SIZOVA, Olga S et al. "Modulation of cellular signaling pathways in P23H rhodopsin photoreceptors." *Cellular signalling* vol. 26,4 (2014): 665-672. doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.008

- SIMONS, Mikael; RAPOSO, Graça. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion In Cell Biology*, [s.l.], v. 21, n. 4, p.575-581, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>.
- STOORVOGEL, Willem et al. The Biogenesis and Functions of Exosomes. *Traffic*, [s.l.], v. 3, n. 5, p.321-330, maio 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x>.
- SACCHETTI, Marta et al. “Systematic Review of Randomized Clinical Trials on Safety and Efficacy of Pharmacological and Nonpharmacological Treatments for Retinitis Pigmentosa.” *Journal of ophthalmology* vol. 2015 (2015): 737053. doi:10.1155/2015/737053.
- THÉRY, Clotilde et al. “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.” *Journal of extracellular vesicles* vol. 7,1 1535750. 23 nov. 2018, doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
- TODOROVA, Dilyana et al. “Extracellular Vesicles in Angiogenesis.” *Circulation research* vol. 120,10 (2017): 1658-1673. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309681.
- TRAMS EG, Lauter CJ, Norman Salem J., Heine U. (1981). Esfoliação de ectoenzimas de membrana na forma de micro-vesículas . *Biochim. Biophys. Acta* 645, 63–70. 10.1016 / 0005-2736 (81) 90512-5.
- TAYLOR, Douglas D, and Cicek Gerçel-Taylor. “The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids.” *Frontiers in genetics* vol. 4 142. 30 Jul. 2013, doi:10.3389/fgene.2013.00142
- TAKAHASHI, Kazutoshi; YAMANAKA, Shinya. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, [s.l.], v. 126, n. 4, p.663-676, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- TANG, Xia et al. “Bipotent progenitors as embryonic origin of retinal stem cells.” *The Journal of cell biology* vol. 216,6 (2017): 1833-1847. doi:10.1083/jcb.201611057.
- TODD L, Suarez L, Squires N, Zelinka CP, Gribbins K, Fischer AJ. Comparative analysis of glucagonergic cells, glia, and the circumferential marginal zone in the reptilian retina. *J Comp Neurol*. 2016 Jan 1; 524(1):74-89
- TSOLAKI, Eleftheria, and Evangelia Yannaki. “Stem cell-based regenerative opportunities for the liver: State of the art and beyond.” *World journal of gastroenterology* vol. 21,43 (2015): 12334-50. doi:10.3748/wjg.v21.i43.12334
- VAN NIEL, Guillaume et al. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *The Journal Of Biochemistry*, [s.l.], v. 140, n. 1, p.13-21, 1 jul. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvj128>.
- VADER, Pieter et al. “Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy.” *Trends in molecular medicine* vol. 20,7 (2014): 385-93. doi: 10.1016/j.molmed.2014.03.002.
- VOGEL, Andrew et al. “Neural stem cell derived extracellular vesicles: Attributes and prospects for treating neurodegenerative disorders.” *EBioMedicine* vol. 38 (2018): 273-282. doi:10.1016/j.ebiom.2018.11.026
- VILELA, Manuel Ap et al. “New mutation in codon 15 RHO gene associated with retinitis pigmentosa.” *International medical reports reports journal* vol. 11 339-344. November 20, 2018, doi: 10.2147 / IMCRJ.S179105.
- WAN, Yinan et al. “The ciliary marginal zone of the zebrafish retina: clonal and time-lapse analysis of a continuously growing tissue.” *Development (Cambridge, England)* vol. 143,7 (2016): 1099-107. doi:10.1242/dev.133314.
- WANG, Y. et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Aug 14;8(1):189. doi: 10.1186/s13287-017-0632-0. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28807034>>.
- WITWER, Kenneth W et al. “Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications.” *Journal of extracellular vesicles* vol. 8,1 1609206. 29 Apr. 2019, doi:10.1080/20013078.2019.1609206.

- WILLBOLD E, Layer PGEur. A Hidden Retinal Regenerative Capacity from the Chick Ciliary Margin is Reactivated In Vitro, that is Accompanied by Down regulation of Butyrylcholinesterase. *J Neurosci.* 1992; 4(3):210-220.
- WOLFRUM, Uwe; NAGEL-WOLFRUM, Kerstin. Das Usher-Syndrom, eine Ziliopathie des Menschen. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, [s.l.], v. 235, n. 03, p.273-280, mar. 2018. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/a-0573-9431>.
- XU, Zhengli et al. "Tumor-derived exosomes educate fibroblasts to promote salivary adenoid cystic carcinoma metastasis via NGF-NTRK1 pathway." *Oncology letters* vol. 18,4 (2019): 4082-4091. doi:10.3892/ol.2019.10740.
- YÁÑEZ-MÓ, María et al. "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions." *Journal of extracellular vesicles* vol. 4 27066. 14 May. 2015, doi:10.3402/jev.v4.27066
- YANG, Mu-Qing et al. "Interferon regulatory factor 1-Rab27a regulated extracellular vesicles promote liver ischemia/reperfusion injury." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 67,3 (2018): 1056-1070. doi:10.1002/hep.29605
- ZHAO, X ET AL., Growth factor-responsive progenitors in the postnatal mammalian retina. *Dev. Dyn.*, 232 (2005), pp. 349-358