



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**



**TAMARA MELETTI DA SILVA GOULART**

**MANIPULAÇÃO DE FATORES INTRÍNSECOS E  
EXTRÍNSECOS VISANDO A DIFERENCIAÇÃO  
DE FOTORRECEPTORES A PARTIR DE  
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS**

**Rio de Janeiro  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**TAMARA MELETTI DA SILVA GOULART**

**MANIPULAÇÃO DE FATORES INTRÍNSECOS E  
EXTRÍNSECOS VISANDO A DIFERENCIAÇÃO  
DE FOTORRECEPTORES A PARTIR DE  
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Rafael Linden



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**  
**2009**

Meletti, Tamara

Manipulação de fatores intrínsecos e extrínsecos visando a diferenciação de fotorreceptores a partir de células-tronco embrionárias murinas / Tamara Meletti – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2009.

XVIII, 111f.: 29 il.; 29,7 cm

Orientador: Rafael Linden.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2009.

Referências bibliográficas: f. 100-111.

1. Células-tronco 2.Fotorreceptores 3. Transdução gênica 4. Meio condicionado 5.Diferenciação. I. Linden, Rafael. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biofísica. III. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurogênese, Programa de Neurobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF<sup>o</sup>), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação do professor Rafael Linden, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**“Manipulação de fatores intrínsecos e extrínsecos visando a diferenciação de fotorreceptores a partir de células-tronco embrionárias murinas”**

**TAMARA MELETTI DA SILVA GOULART**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)**

**Rio de Janeiro, 14 de agosto de 2009.**

---

**DR. FERNANDO GARCIA DE MELLO**

---

**DRA. JENNIFER LOWE**

---

**DRA. TATIANA LOBO COELHO DE SAMPAIO**

---

**DR. RAFAEL LINDEN  
(ORIENTADOR)**

---

**DRA. MARIA CHRISTINA FIALHO DE MELLO  
(REVISORA)**

*Dedico este trabalho aos  
meus pais Tânia Mara e  
Luciano e à minha avó  
Nelly.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tânia e Luciano, base de tudo que construí até hoje; meus grandes exemplos de respeito, determinação e caráter. Obrigada por tudo! Por terem sempre colocado minha educação e meus estudos como prioridade, pelo sacrifício, dedicação e por muitas vezes abdicarem de suas coisas em favor das minhas. Obrigada por acreditarem em mim e no meu potencial, pela torcida e o incentivo, as caronas ao Fundão nos infinitos fins de semana e feriados, pelo amor incondicional! Amo vocês!!!

À minha avó Nelly, pelo cuidado e dedicação de sempre. Obrigada pela paciência e os mimos, por se preocupar, torcer e acreditar em mim, por sempre ir ao portão me ver sair de casa, por me ouvir cantando no chuveiro e pelo carinho que tem por mim. Te amo, vó!

À minha irmã, Samira, pela parceria, torcida e incentivo de sempre. Por aturar minhas palhaçadas e meu mau humor, pelos momentos de diversão e os papos cabeça, por acreditar que eu podia chegar até aqui... Também amo você.

A toda a minha família, pelo apoio material e espiritual, pelas loucuras e momentos de distração, por estarem sempre junto comigo, torcendo e vibrando com o meu sucesso. Muito obrigada, pessoal!

Ao meu chefe e orientador, Rafael Linden, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Neurogênese, pela orientação e incentivo e por confiar na minha capacidade de desenvolver um projeto tão desafiador. Obrigada, Rafael!

Ao Stevens Rehen, o Bitty, pela colaboração, por disponibilizar seu laboratório e equipamentos para que eu fizesse alguns experimentos, pelas discussões de idéias e resultados e por não se incomodar com a minha presença constante no LANDIC. Muito obrigada!

À Hilda Petrs, pessoa fundamental para o desenvolvimento desse trabalho, por me ensinar tudo o que sei hoje de biologia molecular, por ajudar na construção dos plasmídeos, pelas sugestões feitas, por todas as dúvidas tiradas (mesmo de longe), pelos papos e troca de idéias profissionais e pessoais. Muito obrigada mesmo, Hilda!!! Sem você esse trabalho não seria possível...

À Aline Fernandes, colaboradora mais que especial, também foi de suma importância no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por me ensinar todas as manhas e truques da cultura de células-tronco, pelas idéias, sugestões e discussões de protocolos e resultados. Pela amizade, confiança, os papos, almoços, brincadeiras e desenhinhos no MSN, por me ouvir em dias bons e ruins e por me ajudar a não deixar a “peteca cair”. “Tamo junto”, Marie! É “nozes”!!!

Ao Vinícius Ribas, que além de ter sido parceiro de correria no “bio mol avançada para iniciantes em 6 meses”, fez comigo todas as fotos confocais desse trabalho. Vini, obrigada pela paciência e boa vontade de ter perdido dias preciosos para fazer as fotos comigo. Obrigada pela amizade e disponibilidade!

À Juliana, “coleguinha” de bancada, pela amizade, pelo olhar crítico e as excelentes sugestões dadas nessa dissertação. Por dividir os tips da sua gavetinha e pelas cantorias em dias de imuno. Ju, muito obrigada pela força e o incentivo de sempre!

Ao Rafa Mariante, Camila, Lucianne e Roberta, pela amizade, sugestões, dicas e críticas valiosas a esse trabalho, pelos momentos de descontração, piadas, brincadeiras e os papos que deixavam os longos dias de trabalho mais leves e animados! Obrigada, pessoal, as coisas foram mais fáceis com vocês por perto!

A todo o Laboratório de Neurogênese, sem exceções, professores e alunos (não vou citar nomes porque somos muitos e corro o risco de esquecer alguém!), galerinha parceira e louca, sempre disposta a ajudar, que me fez crescer como profissional e como pessoa. Valeu, galera!!!! Obrigada por tudo!

Aos técnicos do lab, Talita, Tibúrcio, Gildo e Nilson “cabeça”, fundamentais para que esse trabalho fosse realizado com sucesso. Com certeza há um pouco de cada um nos meus experimentos!

A toda a galera do LANDIC, laboratório que virou minha segunda casa no Fundão, pela troca de idéias, as informações e discussões científicas, as colaborações e as risadas certas nos momentos que passava com vocês. Obrigadão por tudo, gente!

À Lilian de Sá e todo o pessoal da Unidade Genômica, que fez os seqüenciamentos e sempre abriu as portas do lab com a maior boa vontade, para o que eu precisasse!

Ao pessoal dos Laboratórios de Neuroquímica e Neurobiologia da Retina, parceiros de discussões, seminários, equipamentos e festinhas.

À Mari Stelling, pessoinha que eu adoro, pelo carinho, amizade, as conversas, o apoio moral e por não se importar de eu, vez ou outra, ir “gastar o oxigênio” do laboratório! Valeu, Mari!!!

A todos os meus amigos, por sempre me apoiarem e entenderem minha falta de tempo.

Às agências de fomento que financiaram esse trabalho, CAPES e CNPq.

**MUITO OBRIGADA A TODOS VOCÊS!!!**

*“Idéias ousadas são como as peças de xadrez que se movem para frente; podem ser comidas, mas podem começar um jogo vitorioso.”*

*Johann Goethe*

## RESUMO

A retina se desenvolve de maneira bastante controlada e a formação de tipos celulares específicos ocorre em ondas de diferenciação altamente reguladas por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fotorreceptores são as células da retina responsáveis pela conversão dos sinais luminosos vindos do ambiente em sinais neurais, que iniciam o processo visual. Alguns genes importantes para a especificação do fenótipo fotorreceptor já são conhecidos, entre eles destacam-se *Otx2*, *Crx* e *Nrl*. Mutações ou alterações na regulação desses e outros genes causam retinopatias degenerativas, como a retinose pigmentar. Nesse contexto, há uma grande expectativa nas terapias celulares, particularmente as com células-tronco embrionárias, que surgem como uma fonte potencial de fotorreceptores para reposição. Nesse trabalho buscamos estabelecer modelos para a diferenciação em fotorreceptores a partir de células-tronco embrionárias murinas, através da transdução de genes envolvidos com a indução do fenótipo fotorreceptor ou através do tratamento das células com meio condicionado de retina. A superexpressão de *Otx2*, *Crx* ou *Nrl*, isoladamente, aumentou a expressão dos três genes, sugerindo que eles estão modulando sua rede de transcrição nas células-tronco. O tratamento com meio condicionado induziu maior migração de progenitores neurais, além de gerar aumento na expressão de CRX e NRL, bem como diminuição do marcador de proliferação ki67, indicando que esse tratamento acelera a diferenciação das células, provavelmente direcionando-as para a linha de fotorreceptores. Os modelos propostos neste trabalho visam estabelecer um protocolo eficiente e seguro para futuros testes de terapia celular para retinopatias, como a retinose pigmentar, além de poder contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela determinação do fenótipo fotorreceptor.

## ABSTRACT

The retina develops in a controlled way and the formation of specific cell types occurs in waves of differentiation highly regulated by both intrinsic and extrinsic factors. The photoreceptors are the retinal cells responsible for transducing the light stimuli from the environment into neural signals that initiate the visual process. Several important genes for the specification of photoreceptor are known, among which *Otx2*, *Crx* and *Nrl*. Mutations or changes in the regulation of these genes cause degenerative retinal diseases such as retinitis pigmentosa. Thus, there is considerable expectation in cell based therapies, particularly those with embryonic stem cells, which emerge as a potential source for replacement of photoreceptors. In this study we aimed to establish models for the differentiation of murine embryonic stem cells into photoreceptors, both through the transduction of genes involved in the induction of photoreceptor phenotype or by treatment of cells with retinal conditioned medium. The overexpression of each *Otx2*, *Crx* or *Nrl*, alone, increased the expression of these three genes, suggesting that they modulate their own transcription network in stem cells. Treatment with conditioned medium improved the migration of neural progenitors, and increased the expression of both CRX and NRL, as well as a decrease of the proliferation marker Ki67, indicating that this treatment accelerates cell differentiation, perhaps by directing the cells to the photoreceptor lineage. The models proposed in this work aim to establish an efficient and safe protocol for further testing of cell based therapies for retinopathies such as retinitis pigmentosa, and may contribute to the understanding of cellular and molecular mechanisms responsible for the determination of photoreceptor differentiation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	Adenovírus Associado
BSA	Albumina Sérica Bovina
bZIP	Domínio Zipper de Leucina Básico
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CHX10	Homólogo do Homeodomínio ceh-10 (fator de transcrição)
CIAP	Fosfatase Alcalina de Intestino de Bezerro
CNG3	Canal de Cátion Dependente de Nucleotídeo Cíclico -3
Crx	<i>Cone Rod</i> Homeobox (fator de transcrição)
CTEs	Células-tronco Embrionárias
CTR	Controle
DAPI	Diaminofenilindol (intercalante de DNA)
DKK1	Dickkopf-1 - Inibidor da Via de Wnt
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EBs	Corpos Embrióides
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblastos - 2
GCL	Camada de Células Ganglionares
Gcn5	Histona Acetilase
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Glia
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
IGF-1	Fator de Crescimento do Tipo Insulina 1
INL	Camada Nuclear Interna
IPL	Camada Plexiforme Interna
KSR	Substitutivo de Soro <i>knockout</i>
LeftyA	Inibidor da Via de Nodal
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
Maf	Homólogo do Oncogene de Fibrosarcoma Musculoaponeurótico (subfamília de fatores de transcrição)
MCR	Meio Condicionado de Retina
MEFs	Fibroblastos Embrionários Murinos
N2	Suplemento Para Manutenção de Células Neurais
NBL	Camada Neuroblástica
NR2e3	Receptor Nuclear Subfamília 2, Grupo E, Membro 3 (receptor específico de fotorreceptores)
NRL	Zipper de Leucina da Retina Neural (fator de transcrição)
OCT-4	Octâmero- 4 (fator de transcrição)
ONL	Camada Nuclear Externa
OPL	Camada Plexiforme Externa
Otx2	<i>Orthodenticle</i> Homeobox 2
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Qrx	Homeobox da Retina Tipo Q50 (fator de transcrição)
RA	Ácido Retinóico
Rbp3	Proteína Ligadora de Retinol 3
RP	Retinose Pigmentar
RPE	Epitélio Pigmentado da Retina

RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SSEA-1	Antígeno Embrionário Estágio-Específico 1
TR $\beta$ 2	Receptor Nuclear do Hormônio da Tireóide
UF11	Plasmídeo Viral Desenvolvido na Universidade Da Flórida

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema mostrando a estrutura e o desenvolvimento da retina	21
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática de um fotorreceptor do tipo bastonete.....	25
<b>Figura 3</b>	Esquema exemplificando a complexa rede de regulação entre fatores de transcrição no desenvolvimento de fotorreceptores	35
<b>Figura 4</b>	A retinose pigmentar causa perda da visão periférica.....	37
<b>Figura 5</b>	Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias	43
<b>Figura 6</b>	Mapas dos plasmídeos originais contendo os genes Otx2, Crx e Nrl.....	61
<b>Figura 7</b>	Padronização dos PCRs para os genes Otx2, Crx e Nrl.....	62
<b>Figura 8</b>	Amplificação dos genes de diferenciação em fotorreceptor por PCR.....	62
<b>Figura 9</b>	Análise dos plasmídeos UF11 ligados aos genes de fotorreceptores por clivagem com SmaI.....	64
<b>Figura 10</b>	Mapas dos plasmídeos de expressão em eucariotos contendo os genes de diferenciação em fotorreceptores.....	65
<b>Figura 11</b>	Transfecções em células HEK293 com os plasmídeos contendo os genes de diferenciação em fotorreceptores.....	67
<b>Figura 12</b>	Manutenção da cultura de células-tronco embrionárias murinas em estado pluripotente.....	69
<b>Figura 13</b>	Transfecção de células-tronco embrionárias murinas pluripotentes com o plasmídeo UF11-GFP.....	70
<b>Figura 14</b>	Comparação entre as transfecções feitas em colônias ou corpos embrióides derivados de células-tronco embrionárias murinas.....	71
<b>Figura 15</b>	Expressão de OTX2 em corpos embrióides submetidos à transfecção com genes de diferenciação em fotorreceptores...	74

<b>Figura 16</b>	Expressão de CRX em corpos embriões transfectados com genes de fotorreceptores.....	75
<b>Figura 17</b>	Expressão de NRL em corpos embriões transfectados com genes de diferenciação em fotorreceptores.....	76
<b>Figura 18</b>	Expressão dos fatores de transcrição OTX2, CRX e NRL em células-tronco transfectadas.....	77
<b>Figura 19</b>	Tratamento de células-tronco embrionárias com meio condicionado de retina.....	79
<b>Figura 20</b>	Tratamento de células-tronco embrionárias com meio condicionado de retina.....	80
<b>Figura 21</b>	Expressão de nestina nos corpos embriões tratados ou não com meio condicionado de retina.....	81
<b>Figura 22</b>	Corpos embriões tratados ou não com meio condicionado de retina expressam Tuj1.....	82
<b>Figura 23</b>	OTX2 é expresso de maneira semelhante nos corpos embriões tratados ou não com meio condicionado de retina...	84
<b>Figura 24</b>	A expressão de CRX é maior nos corpos embriões tratados com meio condicionado de retina.....	85
<b>Figura 25</b>	O fator de transcrição NRL é expresso em mais células quando os corpos embriões são tratados com meio condicionado de retina.....	86
<b>Figura 26</b>	A expressão de rodopsina é bastante parecida nas células tratadas ou não com meio condicionado de retina.....	87
<b>Figura 27</b>	O marcador de proliferação Ki67 é mais expresso nas células tratadas com meio controle.....	89
<b>Figura 28</b>	Efeito da concentração do meio condicionado de retina sobre a migração de células-tronco embrionárias.....	90
<b>Figura 29</b>	Em 5 dias de migração, as diferentes concentrações do meio condicionado de retina apresentam efeito similar.....	91

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificar os genes de fotorreceptores.....	49
<b>Tabela 2</b>	Comparação da expressão dos fatores de transcrição de fotorreceptores entre os grupos transfectados com os diferentes genes.....	77

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1	RETINA – ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO.....	19
1.2	DETERMINAÇÃO CELULAR NA RETINA.....	22
1.3	FOTORRECEPTORES – ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	24
1.4	GENES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO DE FOTORRECEPTORES.....	27
1.4.1	Crx.....	27
1.4.2	Otx2.....	30
1.4.3	Nrl .....	32
1.5	RETINOPATIAS DEGENERATIVAS.....	36
1.6	TERAPIAS CELULARES EM RETINA.....	38
1.7	CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	42
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>47</b>
3.1	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO CONTENDO GENES DE DIFERENCIAÇÃO DE FOTORRECEPTORES.....	47
3.2	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO CONTENDO GENES DE DIFERENCIAÇÃO DE FOTORRECEPTORES.....	49
3.3	CULTURA DE CÉLULAS HEK293.....	51
3.4	TRANSFECCÃO DE CÉLULAS HEK293 COM LIPOFECTAMINA	52
3.5	CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS	52
3.6	PREPARAÇÃO DO FEEDER LAYER.....	53
3.7	FORMAÇÃO DE CORPOS EMBRIÓIDES E PRÉ-DIFERENCIAÇÃO NEURAL.....	53
3.8	TRANSFECCÃO COM NUCLEOFECTOR.....	54
3.9	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS CORPOS EMBRIÓIDES.....	55
3.10	PREPARAÇÃO DE MEIO CONDICIONADO DE RETINA.....	55

3.11	INDUÇÃO NEURAL E TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO DE RETINA.....	56
3.12	IMUNOCITOQUÍMICA.....	57
3.13	COLORAÇÃO COM VERMELHO NEUTRO.....	58
3.14	CONTAGEM DAS CÉLULAS QUE MIGRARAM A PARTIR DOS CORPOS EMBRIÓIDES TRATADOS COM MEIO CONDICIONADO DE RETINA.....	58
3.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
4.1	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO EM EUCARIOTOS CONTENDO GENES DE DIFERENCIAÇÃO EM FOTORRECEPTORES.....	60
4.2	CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS E TRANSFEÇÃO COM OS GENES DE DIFERENCIAÇÃO EM FOTORRECEPTOR.....	68
4.3	EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE RETINA SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS.....	78
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Retina - estrutura e desenvolvimento

A retina está localizada na superfície interna posterior do globo ocular. É o tecido responsável pela detecção de estímulos luminosos vindos do ambiente externo, transduzindo-os em atividade elétrica (Kandel *et al.*, 2003). Ela surge durante estágios precoces do desenvolvimento e é derivada da vesícula óptica, uma evaginação do neuroectoderma, sendo, portanto, parte do sistema nervoso central (SNC) (Smerdon, 2000; Kandel *et al.*, 2003).

Durante o período neonatal a retina é composta por duas camadas celulares, separadas por uma camada crescente de processos. A camada celular mais interna é a camada de células ganglionares (GCL), composta nos primeiros dias pós-natal apenas por células ganglionares (Perry *et al.*, 1983). O estrato celular mais externo é composto majoritariamente por células alongadas e em processo de divisão. Esta camada é chamada de neuroblástica (NBL) e pode ser comparada à zona ventricular do encéfalo (Alexiades e Cepko, 1996; Linden, 2000; Donovan e Dyer, 2005).

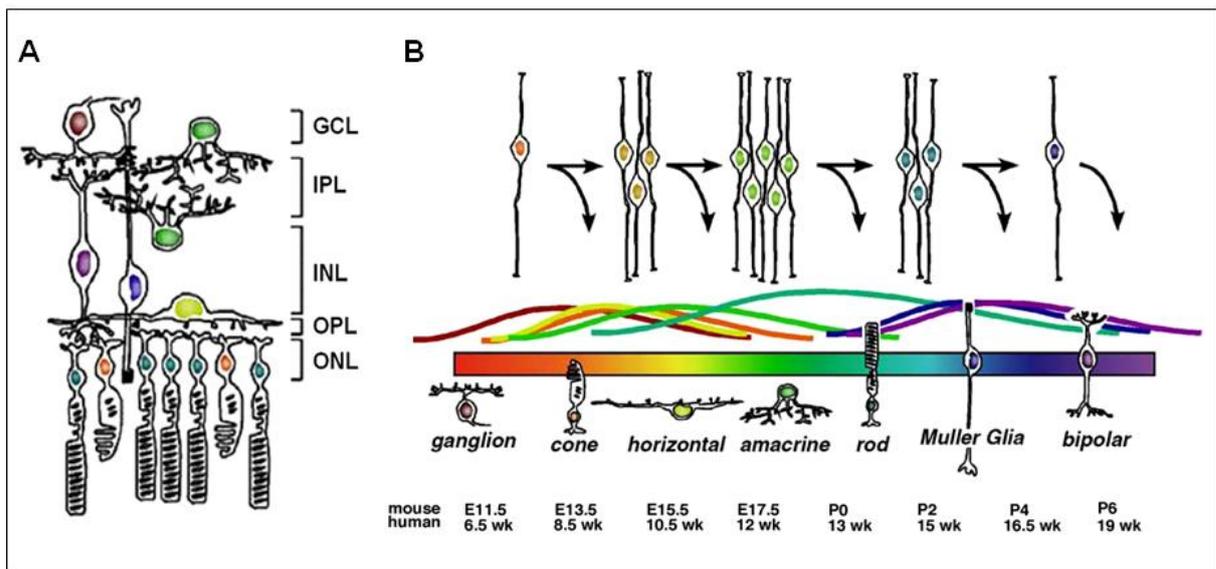
A retina madura apresenta cinco camadas distintas, sendo três nucleares e duas plexiformes. As camadas nucleares são: camada de células ganglionares (GCL), composta por células ganglionares e amácrinas deslocadas; camada nuclear interna (INL), formada por células bipolares, amácrinas, interplexiformes e horizontais; e camada nuclear externa (ONL), formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores. As camadas plexiformes externa e interna (OPL e IPL, respectivamente) encontram-se entre as camadas nucleares e são formadas pelos processos das células que as delimitam (Linden *et al.*, 1999; Linden, 2000; Donovan e Dyer, 2005) (Figura 1 - A). Além de neurônios, a retina também possui células

gliais, representadas pela microglia, de linhagem hematopoiética, que se localiza na camada ganglionar e na camada plexiforme interna; e a glia de Müller, que é derivada de linhagem astrocitária e exclusiva do tecido retiniano (Cepko, 1993). As células de Müller se estendem desde a superfície vítrea até o epitélio pigmentado da retina (RPE); exibem forma bipolar e emitem processos que se interdigitam com os neurônios retinianos (Moshiri *et al.*, 2004). O epitélio pigmentado da retina localiza-se posteriormente à retina neural; é formado por uma camada única de células epiteliais pigmentadas, que mantêm íntimo contato com os fotorreceptores (Smerdon, 2000).

A retina neural adulta destaca-se tanto pela diversidade de tipos celulares que possui quanto pela forma ordenada e laminar com que essas células se distribuem (Linden *et al.*, 1999; Poggi *et al.*, 2005). Essa organização complexa é gerada durante o desenvolvimento através de uma série de eventos (Cepko *et al.*, 1996). Inicialmente a retina é composta por uma população celular homogênea, na qual todas as células são capazes de se dividir e não existem camadas celulares ou plexiformes distintas. Ao longo do desenvolvimento, entretanto, se torna notável a correspondência entre as células formadas e suas posições dentro das camadas da retina. Assim, a formação de cada tipo celular diferenciado e corretamente localizado inclui diversos passos: divisões mitóticas, uma mitose terminal (que define o momento de nascimento da célula), migração para uma das camadas da retina, aquisição de um fenótipo específico (correspondente à camada onde a célula se posiciona) e, finalmente, formação de conexões sinápticas (Adler, 1993).

Os progenitores da retina são multipotentes e o tipo celular gerado após a mitose terminal dependerá de fatores intrínsecos (os genes expressos por cada célula) e extrínsecos (fatores solúveis presentes no microambiente retiniano) que

atuam na célula (Sicinski *et al.*, 1995; Jensen e Wallace, 1997; Levine *et al.*, 2000). Uma característica importante da retinogênese dos vertebrados é que a geração de tipos celulares específicos ocorre em ondas relativamente sobrepostas e em uma seqüência cronológica definida e conservada: primeiro são formadas as células ganglionares, depois fotorreceptores do tipo cone e células horizontais, seguidas por células amácrinas, fotorreceptores do tipo bastonetes, células gliais de Müller e, por fim, células bipolares (Marquardt e Gruss, 2002; Donovan e Dyer, 2005) (Figura 1 – B).



**Figura 1: Esquema mostrando a estrutura e o desenvolvimento da retina.** (A) Estrutura da retina adulta. Na ilustração, pode-se notar a organização das células em camadas nucleares e plexos. GCL - camada de células ganglionares; IPL - camada plexiforme interna; INL - camada nuclear interna. OPL - camada plexiforme externa; ONL – camada nuclear externa. (B) Principais classes de células da retina na ordem do desenvolvimento. As curvas coloridas correspondem ao período de formação de cada tipo celular. (Modificado de Donovan e Dyer, 2005).

## 1.2 Determinação celular na retina

O momento de saída do ciclo celular é um fator importante no desenvolvimento da retina, por isso a proliferação é rigorosamente regulada nesse tecido para produzir o número e a proporção adequada de cada tipo celular. Alterações na proliferação e no tempo de saída do ciclo de células progenitoras podem alterar a composição da retina. Por exemplo, se progenitores saem prematuramente do ciclo celular, a produção de tipos celulares iniciais, como cones e células horizontais, aumentará em detrimento de tipos celulares tardios, como a glia de Müller e células bipolares. Em contrapartida, se as células se mantêm proliferantes por mais tempo, haverá menos células de tipos iniciais e mais células de tipos tardios (Sicinski *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 2000; Donovan e Dyer, 2005).

Os mecanismos celulares e moleculares que levam uma célula progenitora a assumir um fenótipo diferenciado e o papel de fatores intrínsecos e extrínsecos na retinogênese vêm sendo identificados ao longo dos anos. Estudos com injeção intracelular de traçadores ou retrovírus revelaram que os progenitores são multipotentes e podem gerar qualquer tipo celular da retina (Holt *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1990; Fekete *et al.*, 1994). A única exceção parece ser dos fotorreceptores do tipo bastonete, cujos progenitores previamente marcados são capazes de gerar clones formados apenas por bastonetes, o que torna possível a hipótese de que existe um progenitor comprometido exclusivamente com formação de bastonetes (Turner *et al.*, 1990).

Inicialmente, duas propostas foram formuladas para explicar a determinação celular na retina: 1- os progenitores multipotentes adquirem seu fenótipo ao longo do processo de migração e estabelecimento em camadas específicas; ou 2- logo após a mitose terminal as células se comprometem a um fenótipo específico (Adler, 1993).

Essas hipóteses privilegiam, respectivamente, a ação individual de sinais externos ou internos durante a retinogênese.

Entretanto, em 1990, Watanabe e Raff demonstraram que tanto sinais externos quanto fatores internos participam da diferenciação de fotorreceptores. Ao colocar células provenientes de retinas de ratos no 15º dia embrionário (E15) em um ambiente rico em células de retina de ratos com um dia pós-natal (P1), os autores observaram que o potencial proliferativo e o tempo necessário para a expressão de rodopsina de células E15 não se alterava, porém a proporção de células E15 que expressavam rodopsina após 4 ou 6 dias em cultura com células P1 era cerca de 40 vezes maior nessas condições (Watanabe e Raff, 1990). Assim, os progenitores da retina alteram suas propriedades e possuem capacidades diferentes de resposta, dependendo do momento em que saem do ciclo celular, sendo, portanto, intrinsecamente distintos. Por outro lado, a presença de sinais extrínsecos também é importante e pode modular a diferenciação para um determinado destino celular, desde que a célula esteja madura para receber esses sinais (Watanabe e Raff, 1990; Cepko *et al.*, 1996).

Em acordo com esses dados, Belliveau e Cepko, utilizando uma estratégia semelhante de co-cultura, observaram que o ambiente neonatal induz a produção de fotorreceptores. A interação entre progenitores retinianos de camundongos E16 com células P0, no entanto, gerou um resultado surpreendente: houve indução de fotorreceptores do tipo cone e não bastonetes, ao contrário do que era esperado. Além disso, o número de células amácrinas produzidas foi muito reduzido (Belliveau e Cepko, 1999). Isso sugere que o ambiente P0 possui os sinais necessários para induzir a diferenciação em fotorreceptores, porém os progenitores em E16 são

programados para gerar cones e a ação do ambiente externo não é suficiente para mudar o programa dessas células.

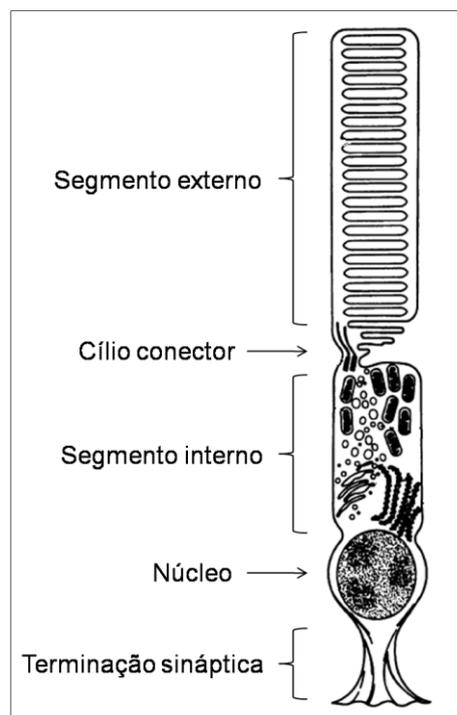
Algumas outras evidências que apóiam a idéia de que fatores presentes no microambiente retiniano influenciam o destino de células pós-mitóticas se relacionam aos mecanismos de retroalimentação apresentados por alguns tipos celulares. Células amácrinas e ganglionares, por exemplo, podem inibir a diferenciação de progenitores da retina nesses tipos celulares, e isso se dá provavelmente através da secreção de fatores solúveis (Waid e McLoon, 1998; Belliveau e Cepko, 1999).

Dessa forma, os resultados acumulados ao longo dos anos sugerem que as células progenitoras da retina passam por uma série de “estados de competência”, estabelecidos durante o desenvolvimento. Cada um desses estados favorece a especificação de um ou mais tipos celulares e envolvem, provavelmente, propriedades intrínsecas. Estas propriedades, por sua vez, determinam a capacidade de resposta dos progenitores aos sinais extrínsecos presentes na retina em desenvolvimento (Yang, 2004).

### **1.3 Fotorreceptores - estrutura e função**

Fotorreceptores são as células da retina responsáveis pela fototransdução, ou seja, a transdução de luz em sinal neural que inicia o processo visual (Kandel *et al.*, 2003). São células altamente especializadas, que desenvolveram uma estrutura organizada e compartimentalizada. Um fotorreceptor pode ser subdividido em quatro regiões: segmentos externos, segmentos internos, núcleo e terminações sinápticas (Young, 1967) (Figura 2). Os segmentos externos são compostos por discos de membrana, que contêm o pigmento visual (rodopsina, nos bastonetes, e opsinas de

cones, nos cones) e outros componentes da fototransdução. O pigmento visual é a proteína mais abundante nos segmentos externos. Os segmentos internos contêm organelas, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, além de mitocôndrias que ficam imediatamente adjacentes ao segmento externo a fim de suprir a elevada demanda energética associada à fototransdução. Os segmentos internos e externos estão ligados por cílios conectores, que permitem a passagem de proteínas e outras moléculas entre essas duas regiões dos fotorreceptores. As terminações sinápticas transmitem o sinal neuronal desencadeado pela luz para os neurônios de segunda ordem da retina – as células bipolares e horizontais (Young, 1967; Fu e Yau, 2007).



**Figura 2: Representação esquemática de um fotorreceptor do tipo bastonete.** As divisões estruturais e os segmentos encontrados nos fotorreceptores estão destacados (modificado de Berson, 1996).

Os vertebrados possuem duas classes de fotorreceptores: os cones e os bastonetes. Os cones respondem a intensidades de luz de maior amplitude e são responsáveis pela visão a cores. Os bastonetes respondem a intensidades baixas de luz e não distinguem cor. Em humanos a visão é baseada majoritariamente em cones, que podem ser de três tipos (azul, verde e vermelho), definidos por sua maior sensibilidade a diferentes comprimentos de onda. Em camundongos e ratos, ao contrário, a visão é quase completamente baseada em bastonetes. Aproximadamente 75% das células da retina de camundongos são fotorreceptores, dos quais 97% são bastonetes. Esses animais possuem apenas dois tipos de cones, sensíveis a comprimentos de onda de baixa ou média intensidade (Jeon *et al.*, 1998; Morrow *et al.*, 1998).

A maior parte dos dados obtidos sobre a fototransdução em vertebrados é proveniente de estudos em bastonetes. No escuro, essas células mantêm uma corrente constante de cátions através da membrana dos segmentos externos (corrente de escuro), o que gera um estado estável, despolarizado, que mantém uma liberação constante de glutamato nos terminais sinápticos. O estímulo luminoso induz a isomerização do 11-cis-retinal, presente na rodopsina, levando à ativação dessa proteína (Okada *et al.*, 2001; Kefalov *et al.*, 2003). Ao ser ativada, a rodopsina dispara uma cascata que envolve uma série de outras proteínas, e culmina numa diminuição de GMPc intracelular (Okada *et al.*, 2001; Fu e Yau, 2007). Isso leva ao fechamento dos canais de membrana responsáveis pelo influxo de cátions, que são dependentes de GMPc (canais dependentes de nucleotídeos cíclicos), causando uma parada na corrente de escuro e produzindo uma hiperpolarização da membrana. Esta hiperpolarização diminui ou elimina a liberação sináptica de glutamato, que constitui a resposta à luz. Este sinal é então processado por outros

neurônios na retina e depois é transmitido para centros superiores no cérebro (Baylor, 1996; Ebrey e Koutalos, 2001; Fu e Yau, 2007).

Durante o desenvolvimento, como mencionado anteriormente, os cones são gerados em estágios iniciais na retina embrionária, em uma curta janela de tempo, enquanto bastonetes se formam em um período mais extenso, principalmente durante o desenvolvimento pós-natal (Marquardt e Gruss, 2002; Donovan e Dyer, 2005; Adler e Raymond, 2008). Os fatores que determinam a diferenciação de fotorreceptores são bastante estudados, o que faz com que estes sejam os neurônios mais bem caracterizados do sistema nervoso de vertebrados, e os mecanismos que levam a essa determinação se tornam mais evidentes a cada dia (Morrow *et al.*, 1998).

## **1.4 Genes envolvidos na diferenciação de fotorreceptores**

### **1.4.1 Crx**

Alguns dos genes envolvidos na diferenciação de fotorreceptores foram identificados durante as duas últimas décadas. Em 1997, dois grupos descreveram *Crx*, um fator de transcrição codificado por um gene homeobox da família *Otd/Otx*, que é expresso abundantemente em fotorreceptores e pinealócitos (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997). No olho de camundongos esse gene é expresso a partir do dia embrionário 12.5 (E12.5), na região externa da retina em desenvolvimento, onde se formará a camada de fotorreceptores. Esse período coincide com a formação de cones e o início da formação de bastonetes. *Crx* também é observado na face externa da retina após o nascimento, quando há uma diferenciação maciça de bastonetes, e seu pico de expressão se dá no 6º dia pós-

natal (P6). Isso se correlaciona com o aumento na expressão de rodopsina e outros genes da cascata de fototransdução, entre P6 e P8 (Nir *et al.*, 1984; Hicks e Barnstable, 1987; Ahmad *et al.*, 1990; Stepanik *et al.*, 1993). Finalmente, quando a ONL já está formada, *Crx* é restrito a essa camada. Em P9 a expressão desse gene sofre uma pequena queda, mas persiste até a idade adulta (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997). Foi demonstrado, ainda, que CRX é capaz de se ligar e trans-ativar seqüências promotoras presentes em vários genes específicos de fotorreceptores, como rodopsina, opsinas de cones, fosfodiesterase- $\beta$  e arrestina (Furukawa *et al.*, 1997, Livesey *et al.*, 2000). Além disso, foi mostrado que a superexpressão de *Crx* determina uma retina com número maior de bastonetes; e o bloqueio da sua expressão, em contrapartida, impede a diferenciação terminal de fotorreceptores, inibindo a formação dos segmentos externos (Furukawa *et al.*, 1997). Chen e colaboradores observaram que CRX age sinergicamente com NRL – outro fator de transcrição envolvido na diferenciação de fotorreceptores – e a interação entre essas duas proteínas permite uma expressão maior de rodopsina em relação à expressão induzida por esses fatores isoladamente (Chen *et al.*, 1997).

Estudos genéticos em humanos revelaram que mutações no gene *Crx* estão associadas a retinopatias que afetam os fotorreceptores, como a distrofia de cones e bastonetes, retinose pigmentar e amaurose congênita de Leber (Freund *et al.*, 1997; Swain *et al.*, 1997; Sohocki *et al.*, 1998; Swaroop *et al.*, 1999; Rivolta *et al.*, 2001). Além disso, animais *knockout* para *Crx* não apresentam nenhuma função detectável de fotorreceptor. Análises ultraestruturais revelaram que as retinas negativas para *Crx* não desenvolvem os segmentos externos e degeneram. Esses animais também falham em formar o aparato de fototransdução e apresentam conexões sinápticas anormais na camada plexiforme externa (Furukawa *et al.*, 1999; Morrow *et al.*,

2005). Animais heterozigotos para *Crx*, por outro lado, possuem função normal dos fotorreceptores, mas apresentam um atraso na maturação desses neurônios (Furukawa *et al.*, 1999). Um estudo com células progenitoras demonstrou que a indução da expressão de *Crx* em estágios precoces do desenvolvimento da retina gera interrupção na proliferação e induz a diferenciação de células-tronco da retina em fotorreceptores. As células que superexpressam *Crx* apresentam marcadores de fotorreceptores, como rodopsina, opsina de cone, fosfodiesterase e CNG3, e são sensíveis à luz (Jomary e Jones, 2008). Juntos, esses dados reforçam a idéia de que *Crx* tem um papel fundamental na diferenciação terminal e na função de fotorreceptores.

CRX é um trans-ativador de vários genes específicos de fotorreceptores, porém os mecanismos associados com essa função ainda são pouco conhecidos. Já foi demonstrado que CRX pode se ligar diretamente às regiões promotora ou *enhancer* de seus genes alvo, ativando sua transcrição (Peng e Chen, 2005). Contudo, ensaios de transfecção transitória demonstraram que CRX, sozinho, apresenta atividade apenas moderada, mesmo em relação ao gene da rodopsina (Chen *et al.*, 1997). Assim, um mecanismo mais eficiente pelo qual CRX pode ativar a transcrição gênica parece ser a interação com outros fatores de transcrição. Interações funcionais já relatadas com CRX incluem outros fatores específicos de fotorreceptores como NRL, Nr2e3 e Qrx (Mitton *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005). CRX também interage com fatores associados ao remodelamento do DNA, como a ataxina-7 (La Spada *et al.*, 2001) e Gcn5, uma histona acetiltransferase que participa do desenovelamento da cromatina (Peng e Chen, 2007). Sendo assim, um possível mecanismo para a ativação transcricional induzida por CRX consiste no remodelamento da cromatina. Uma questão relacionada à função

de CRX envolve o entendimento de como retinas negativas para esse gene desenvolvem fotorreceptores em estágios iniciais, se CRX é crítico para a expressão de tantos genes específicos desses neurônios. A explicação aceita é que outro fator apresenta um papel redundante ao de CRX na determinação do destino celular de fotorreceptores, compensando parcialmente sua falta.

#### **1.4.2 *Otx2***

Apesar de todos os estudos mostrarem um claro envolvimento de *Crx* com o desenvolvimento de fotorreceptores, ficou evidente também, como mencionado anteriormente, que este não era o único gene envolvido na diferenciação desses neurônios, já que animais *knockout* para *Crx* possuíam fotorreceptores em fase inicial de desenvolvimento (Furukawa et al, 1999). Assim, em 2003 foi descrito o envolvimento de *Otx2* na diferenciação de fotorreceptores (Nishida *et al.*, 2003). *Otx2* é também um gene homeobox da família *Otd/Otx*, que é expresso em estágios bastante precoces do desenvolvimento embrionário. Inicialmente tem sua expressão dispersa pelo ectoderma e epiblasto, mas ao longo do tempo sua expressão se limita à região anterior do embrião. Mais tarde durante o desenvolvimento e após o nascimento, a expressão de *Otx2* se restringe ao prosencéfalo, mesencéfalo e olhos (Simeone *et al.*, 1993).

Nishida e colaboradores demonstraram, através de uma estratégia bastante elegante com o uso de um *knockout* condicional, que retinas negativas para *Otx2* apresentam uma ausência total de células rodopsina-positivas, indicando um papel fundamental desse gene na determinação do destino celular de fotorreceptores em desenvolvimento (Nishida et al, 2003). Além disso, o grupo demonstrou que OTX2 pode se ligar ao promotor de *Crx* e regular positivamente a expressão desse gene; e

ainda mostrou uma correlação entre a expressão de *Otx2* e *Crx*: em camundongos, a expressão de *Otx2* tem início em E11.5 e aumenta em E12.5, junto com a indução na expressão de *Crx*, coincidindo com o desenvolvimento de cones. Em E17.5 a expressão de *Otx2* se intensifica na parte externa da camada neuroblástica, onde é estabelecida a zona de expressão de *Crx*. Após o nascimento, em P6, quando há o pico de expressão de *Crx* e maturação dos bastonetes, a expressão de *Otx2* reduz na camada nuclear externa e aumenta na região externa da camada nuclear interna, sugerindo um papel desse gene também no desenvolvimento de células bipolares (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 2003).

OTX2 participa da indução da diferenciação de fotorreceptores e é importante também para a diferenciação terminal desses neurônios (Koike *et al.*, 2007). Além disso já foi demonstrado, com o uso de *knockouts* condicionais específicos para células bipolares, que OTX2 participa da diferenciação dessas células. Os resultados constituem evidências de que animais negativos para *Otx2* apresentam retina com função eletrofisiológica alterada e marcação significativamente menor para a proteína cinase C e Chx10 – ambos marcadores de células bipolares (Koike *et al.*, 2007).

Mutações em *Otx2* já foram identificadas em humanos. O fenótipo heterozigoto para *Otx2* causa má formações oculares, como microftalmia e anoftalmia, além de gerar retinopatias semelhantes à retinose pigmentar e amaurose congênita de Leber (Ragge *et al.*, 2005). Estudos com animais revelaram que o homozigoto negativo para *Otx2* é letal, devido a defeitos na gastrulação e má formação das regiões rostrais do encéfalo (Acampora *et al.*, 1995; Matsuo *et al.*, 1995; Ang *et al.*, 1996). Por outro lado, a superexpressão de *Otx2* em progenitores da retina causa um aumento no número de fotorreceptores gerados (Nishida *et al.*,

2003) e induz a diferenciação de fotorreceptores, identificada pela expressão de rodopsina, em células progenitoras derivadas da margem ciliar e da Iris (Akagi *et al.*, 2004).

A ação de OTX2 parece envolver a regulação de genes chave para o desenvolvimento de fotorreceptores. Dois alvos diretos de OTX2 são conhecidos. Um deles é *Rbp3*, um gene independente de CRX que é expresso tanto em cones como em bastonetes (Bobola *et al.*, 1999; Furukawa *et al.*, 1999); e o outro é *Crx*, cuja expressão é abolida em retinas *knockout* para *Otx2* (Nishida *et al.*, 2003). Já foi mostrado que OTX2 aumenta a atividade de *Crx*, ligando-se à região promotora deste gene (Hennig *et al.*, 2008). OTX2 também pode se ligar e auto-ativar seu próprio promotor (Martinez-Morales *et al.*, 2003), além de se ligar ao promotor de vários outros genes alvos de CRX, como rodopsina e opsinas de cone, na presença ou ausência deste, embora de maneira menos eficaz (Peng e Chen, 2005).

#### **1.4.3 *Nrl***

Outro fator de transcrição bastante conhecido e estudado que está envolvido com a diferenciação de fotorreceptores é o zíper de leucina da retina neural (*Nrl*), um zíper de leucina básico (bZIP) da subfamília *Maf*, inicialmente clonado a partir de uma biblioteca de cDNA de retina humana adulta (Swaroop cols., 1992). Em camundongos, foi demonstrado por RT-PCR e hibridização *in situ* que a expressão de *Nrl* tem início em E14.5 e permanece durante todo o desenvolvimento e na idade adulta (Liu *et al.*, 1996). Recentemente, utilizando um transgene GFP dirigido pelo promotor de *Nrl*, Akimoto e colaboradores conseguiram identificar a expressão desse gene já em retinas E12. Nesse estudo, os autores observaram que a expressão de *Nrl* ocorre logo após a mitose terminal em células comprometidas com

o fenótipo de bastonetes, e afirmam que esse é o marcador mais precoce de bastonetes já descrito (Akimoto *et al.*, 2006). Esse gene só é expresso em fotorreceptores desse tipo (Swain *et al.*, 2001) e sua ação é fundamental na determinação e manutenção desses neurônios.

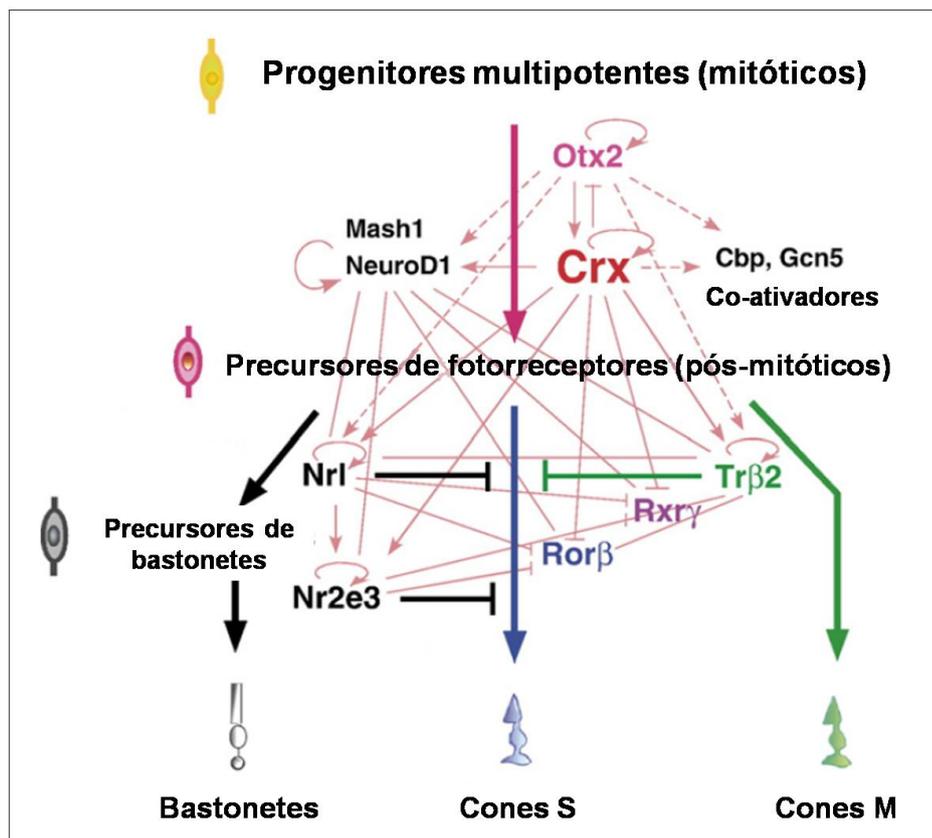
Mutações em *Nrl* já foram identificadas em humanos, sendo responsáveis por alguns tipos de retinose pigmentar (Bessant *et al.*, 1999; Nishiguchi *et al.*, 2004). Nos pacientes com mutações recessivas de *Nrl*, a função de cones azuis é preservada (Nishiguchi *et al.*, 2004). Esses dados estão de acordo com resultados obtidos em animais *knockout* para *Nrl*, em que a deleção desse gene causa perda total da expressão de rodopsina e da função de bastonetes, com um aumento na expressão de opsinas S e na função de cones do tipo S (Mears *et al.*, 2001). Estudos ultraestruturais mostraram que retinas negativas para *Nrl* apresentam dobras e rosetas nos estágios iniciais do desenvolvimento, são formadas exclusivamente por cones, com segmentos externos mais curtos que o de retinas selvagens e morfologia alterada (Mears *et al.*, 2001; Daniele *et al.*, 2005). Além disso, animais transgênicos expressando *Nrl* em todos os precursores de fotorreceptor, sob controle do promotor de *Crx*, possuem apenas fotorreceptores do tipo bastonete, sem expressão de moléculas ou função detectável de cones. Por outro lado, precursores de cones derivados de animais *knockout* para *Nrl*, que expressam esse gene sob comando do promotor de opsina S, apresentam características semelhantes a bastonetes e têm a expressão de genes específicos de cones parcialmente reduzida (Oh *et al.*, 2007). Juntos, esses dados sugerem fortemente um papel de *Nrl* na especificação de fotorreceptores do tipo bastonetes.

Estudos com retinas negativas para *Nrl* sugerem um papel desse gene na regulação da expressão de uma série de proteínas envolvidas nos processos de

fototransdução, regulação transcricional, transporte e sinalização intracelular (Yoshida *et al.*, 2004). Ainda em animais negativos para *Nrl*, foi observado que a expressão de genes específicos de bastonetes é perdida, enquanto a expressão de genes de cones é aumentada, sugerindo que NRL reprime, direta ou indiretamente, genes de cones. Alguns trabalhos mostram que NRL pode se ligar diretamente a promotores de genes de cones, incluindo opsina S, opsina M, arrestina de cone e do fator de transcrição Tr $\beta$ 2, também específico de cones (Peng e Chen, 2005; Oh *et al.*, 2007, Hennig *et al.*, 2008), indicando uma ação direta de NRL.

Por outro lado, os efeitos de NRL estão particularmente relacionados com a ativação do receptor nuclear Nr2e3 (Mears *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006, Oh *et al.*, 2008). Em camundongos, o fenótipo negativo para NRL causa perda na expressão de Nr2e3; já a expressão ectópica de Nr2e3 em precursores de fotorreceptores de animais *knockout* para *Nrl* muda o fenótipo de cones em desenvolvimento para fotorreceptores similares a bastonetes, reproduzindo o efeito da expressão de NRL (Cheng *et al.*, 2006). Além disso, foi recentemente demonstrado que NRL se liga diretamente ao promotor de Nr2e3, aumentando sua expressão, sinergicamente com CRX (Oh *et al.*, 2008). Estudos usando um gene repórter sob comando dos promotores de opsina S e opsina M mostraram que NRL é capaz de ativar esses genes *in vitro* (Peng *et al.*, 2005). Além disso, repressores de cones são regulados positivamente na ausência de NRL e genes de cones são superexpressos em retinas deficientes para NR2e3, mas com expressão normal de NRL, e este gene, sozinho, pode apenas parcialmente suprimir o desenvolvimento de cones na ausência de Nr2e3 (Peng *et al.*, 2005, Oh *et al.*, 2008). Juntos, esses dados sugerem que NRL, como um repressor, não age diretamente, mas sim indiretamente, através de Nr2e3 e outros fatores.

Os fatores descritos acima, e outros não mencionados, participam de uma rede muito bem regulada de interações (Figura 3). Essa regulação é essencial no controle espaço-temporal da expressão gênica em fotorreceptores e garante um correto desenvolvimento e manutenção dessas células. Alterações em qualquer um dos componentes (mutações ou mudanças nos níveis de expressão) podem desfazer o equilíbrio dessa complexa rede, resultando em defeitos no desenvolvimento ou em degeneração dos fotorreceptores.



**Figura 3: Esquema exemplificando a complexa rede de regulação entre fatores de transcrição no desenvolvimento de fotorreceptores.** Fotorreceptores se desenvolvem a partir de progenitores multipotentes. Os fatores de transcrição envolvidos na diferenciação e determinação de tipos específicos de fotorreceptores e as relações estabelecidas entre esses fatores estão mostrados na figura (modificado de Hennig *et al.*, 2008).

## 1.5 Retinopatias degenerativas

Retinopatias degenerativas são doenças que atingem indivíduos de todas as faixas etárias e podem afetar a retina de diferentes maneiras. Dentre as que afetam os fotorreceptores podem ser destacadas a retinose pigmentar (RP), amaurose congênita de Leber e as maculopatias (Milam *et al.*, 1998; Hamel, 2007; den Hollander *et al.*, 2008).

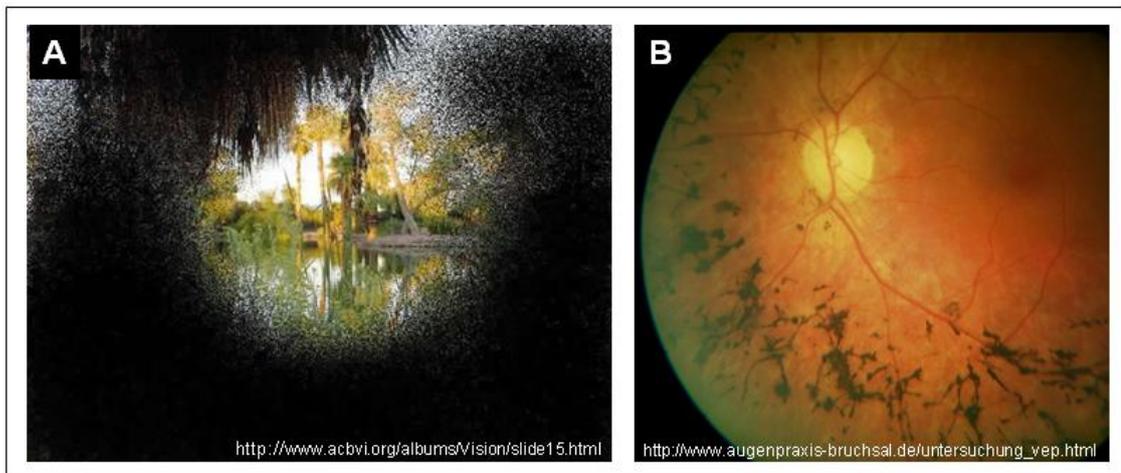
A amaurose congênita de Leber é a retinopatia mais severa, causando cegueira ou insuficiência visual grave nos pacientes antes de 1 ano de idade (den Hollander *et al.*, 2008). É uma doença genética hereditária que pode gerar degeneração preferencial de cones ou bastonetes ou afetar ambos os tipos de fotorreceptores (Hamel, 2007).

As maculopatias afetam uma região da retina chamada de mácula. Causam perda de campo visual central e a forma mais prevalente é a relacionada à idade. Nessa retinopatia, a degeneração majoritária é de cones, mas os bastonetes podem também ser perdidos em estágios mais tardios da doença (Hamel, 2007).

A retinose pigmentar é a mais prevalente das retinopatias degenerativas, com incidência de aproximadamente 1:4000 (Berson, 1993). É geneticamente heterogênea, podendo ocorrer de forma autossômica dominante, recessiva, ligada ao cromossomo X, multigênica, sindrômica ou de forma esporádica, sendo que esta última corresponde a 50% dos casos (Dryja, 1992, Farrar *et al.*, 2002). Nos casos hereditários, mais de 30 genes já foram associados a essa doença (Phelan e Bok, 2000).

O termo retinose pigmentar, na realidade, se refere a um grupo heterogêneo de doenças que causam degeneração de fotorreceptores (Milam *et al.*, 1998). Inicialmente, há perda da função e viabilidade de bastonetes. Em um estágio mais

avançado, com a progressão da morte dos bastonetes, a viabilidade celular dos cones é também comprometida, o que muitas vezes resulta na perda completa da visão (Farrar *et al.*, 2002). Os pacientes geralmente relatam dificuldade de adaptação visual, cegueira noturna e perda do campo visual periférico intermediário, já na adolescência. Com a progressão da doença, há perda do campo visual periférico e eventual perda da visão central (Figura 4A). Alguns pacientes ficam cegos antes dos 30 anos e a maioria já é considerada cega antes dos 60 anos de idade. A histopatologia da RP inclui a presença de pigmento ao redor da retina periférica, fato que dá nome à doença (Berson, 1996) (Figura 4B). Os dados disponíveis indicam que a RP representa a causa mais prevalente de incapacidade visual entre indivíduos em idade produtiva (Farrar *et al.*, 2002).



**Figura 4: A retinose pigmentar causa perda da visão periférica.** A- exemplo de perda do campo visual periférico em casos de retinose pigmentar; B- Exame de fundo de olho mostrando os depósitos de pigmentos encontrados em pacientes com essa doença.

Diversos tratamentos para RP vêm sendo desenvolvidos. Dentre as estratégias adotadas incluem-se: transplante de fotorreceptores normais ou de células de epitélio pigmentado (Silverman *et al.*, 1992; Little *et al.*, 1996), tratamento com fatores que prolongam a sobrevivência de fotorreceptores (LaVail *et al.*, 1998; Ogilvie *et al.*, 2000) e entrega de genes corretivos ou neuroprotetores (Bennett *et al.*, 1996; Akimoto *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2000), além de outras como estimulação elétrica da retina externa e administração de vitamina A (Berson, 1993; Milam *et al.*, 1998). Apesar dessas tentativas, ainda não há relatos de um efeito protetor permanente.

A heterogeneidade das formas hereditárias e das mutações associadas à RP e o efeito transitório dos processos adotados atualmente representam obstáculos ao tratamento dessa doença. Neste sentido, o emprego de terapias celulares para o tratamento de retinopatias degenerativas como a RP surge como uma nova perspectiva.

### **1.6 Terapias celulares em retina**

As terapias celulares consistem na utilização de células para fins terapêuticos. O foco principal desse tipo de terapia é o desenvolvimento e expansão de células ou tecidos, visando transplantes para a restauração da função fisiológica do tecido degenerado. Os tipos de células empregados podem variar de acordo com o objetivo final da terapia, podendo ser usados tipos maduros ou células-tronco e progenitoras (Hall *et al.*, 2006).

Em retina já há estudos relacionados ao uso de terapias celulares para o tratamento de degenerações envolvendo tanto as células maduras, quanto células-tronco e progenitoras. Dentre os principais tipos celulares sugeridos para terapias

em retina incluem-se: células de epitélio pigmentado, fotorreceptores maduros, progenitores de retina ou de fotorreceptores, progenitores neurais, células de medula óssea ou cordão umbilical, células de Schwann e, mais recentemente, células-tronco embrionárias (Litchfield *et al.*, 1997; Gaillard e Sauvé, 2007; Lund, 2008).

As células-tronco são de particular interesse devido à sua plasticidade e capacidade de auto-renovação, podendo ser uma fonte ilimitada de tipos celulares especializados (Hall *et al.*, 2006; Enzmann *et al.*, 2009). O potencial de diferenciação das células-tronco em células de retina, revelado a partir de estudos *in vivo* e *in vitro*, traz perspectivas animadoras. Não apenas progenitores retinianos (Chacko *et al.*, 2000; Akagi *et al.*, 2003; Coles *et al.*, 2004), mas também células-tronco neurais (Nishida *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000; Gamm *et al.*, 2007), células mesenquimais de medula óssea (Tomita *et al.*, 2002; Kicic *et al.*, 2003; Otani *et al.*, 2004) e células-tronco embrionárias (Hara *et al.*, 2004; Haruta *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2004; 2006; Lamba *et al.*, 2006; 2009; Osakada *et al.*, 2008) parecem ter o potencial de se integrar à retina e gerar alguma melhora na função visual.

As tentativas iniciais de terapia celular para retina utilizaram células-tronco adultas. Estudos em ratos com degeneração retiniana mostraram que células-tronco da retina, quando injetadas no espaço sub-retiniano, têm a capacidade de sobreviver, se integrar e expressar marcadores neurais, inclusive de fotorreceptores (Chacko *et al.*, 2000; Akagi *et al.*, 2003). Em 2006, MacLaren e colaboradores demonstraram que o estágio de comprometimento dos progenitores de retina é fundamental para o sucesso da terapia e o melhor resultado é obtido quando as células estão comprometidas molecularmente, mas ainda não estão morfológicamente diferenciadas (MacLaren *et al.*, 2006). Alguns trabalhos também

utilizaram células-tronco neurais derivadas do hipocampo em injeções no olho. Essas células são igualmente capazes de se integrar à retina e expressam marcadores neuronais e gliais, mas não de fotorreceptores (Nishida *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000). No entanto, a capacidade de migração e integração de progenitores é restrita ao local da lesão. Curiosamente, retinas normais se mostram menos permissivas e tanto células progenitoras de retina quanto de hipocampo não conseguem se integrar quando injetadas em animais saudáveis (Chacko *et al.*, 2000; Kurimoto *et al.*, 2001).

Outra fonte de células-tronco bastante estudada é a medula óssea. Já foi demonstrado que injeções intravítreas de células mesenquimais da medula óssea permitem a incorporação dessas células em ratos com retina lesada, principalmente em regiões próximas à lesão. Essas células expressam marcadores neurais da retina, incluindo rodopsina (Tomita *et al.*, 2002). Foi visto ainda um efeito das células mesenquimais sobre a vasculatura da retina. A melhora vascular resultou na recuperação da espessura da ONL e melhora no sinal de eletroretinograma em modelos animais de degeneração de fotorreceptores (Otani *et al.*, 2004).

Apesar dos resultados obtidos com células-tronco adultas serem animadores, vale ressaltar que os dados apresentados nesses estudos são de efeitos apenas locais e pouco robustos. Também deve ser levado em conta que essas células apresentam fontes limitadas, que muitas vezes envolvem discussões éticas quanto ao seu uso, como no caso de células provenientes de embriões, de forma que seu emprego para terapias em humanos ainda é controverso. Além disso, apesar dos trabalhos mostrarem recuperação morfológica e funcional de retinas lesadas ou degeneradas, ainda não há indícios de que as células-tronco adultas sejam capazes de, efetivamente, se diferenciar em fotorreceptores. Dessa forma, as células-tronco

embrionárias (CTEs) surgem como uma fonte potencial de fotorreceptores. Até hoje, porém, ainda faltam métodos eficientes e reprodutíveis para induzir a diferenciação de células-tronco embrionárias em células progenitoras ou diferenciadas, capazes de se integrar adequadamente aos circuitos neurais da retina (Enzmann *et al.*, 2009).

Diversos grupos têm estudado os efeitos de injeções intra-oculares de CTEs. O transplante de células de epitélio pigmentado derivado de células-tronco embrionárias em ratos com distrofia retiniana resulta no estabelecimento de uma ONL, que é inexistente em animais não injetados, além de melhora em um teste comportamental de função visual (Haruta *et al.*, 2004). Também foi demonstrado que uma pequena parcela de células-tronco embrionárias pré-diferenciadas com ácido retinóico é capaz de se incorporar na retina e se diferenciar em células que expressam marcadores neuronais, além de aumentar a sobrevivência de fotorreceptores quando injetadas em camundongos *rd1*, um modelo animal de retinose pigmentar. Assim como mostrado para células-tronco adultas, em animais normais as células injetadas permaneceram no vítreo, não se integrando à retina (Meyer *et al.*, 2004; 2006). Estudos mais recentes têm procurado direcionar a diferenciação de células-tronco embrionárias antes do transplante em modelos animais de degeneração de retina. A injeção de progenitores retinianos derivados de CTEs parece ser mais eficiente tanto em relação à integração quanto à diferenciação das células (Osakada *et al.*, 2008; Lamba *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados promissores, muitas questões ainda precisam ser resolvidas até que as células-tronco embrionárias possam ser usadas como ferramenta terapêutica. Há relatos de formação de teratomas em animais injetados

com essas células (Arnhold *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, resultados não publicados), o que parece ser o maior obstáculo à sua utilização.

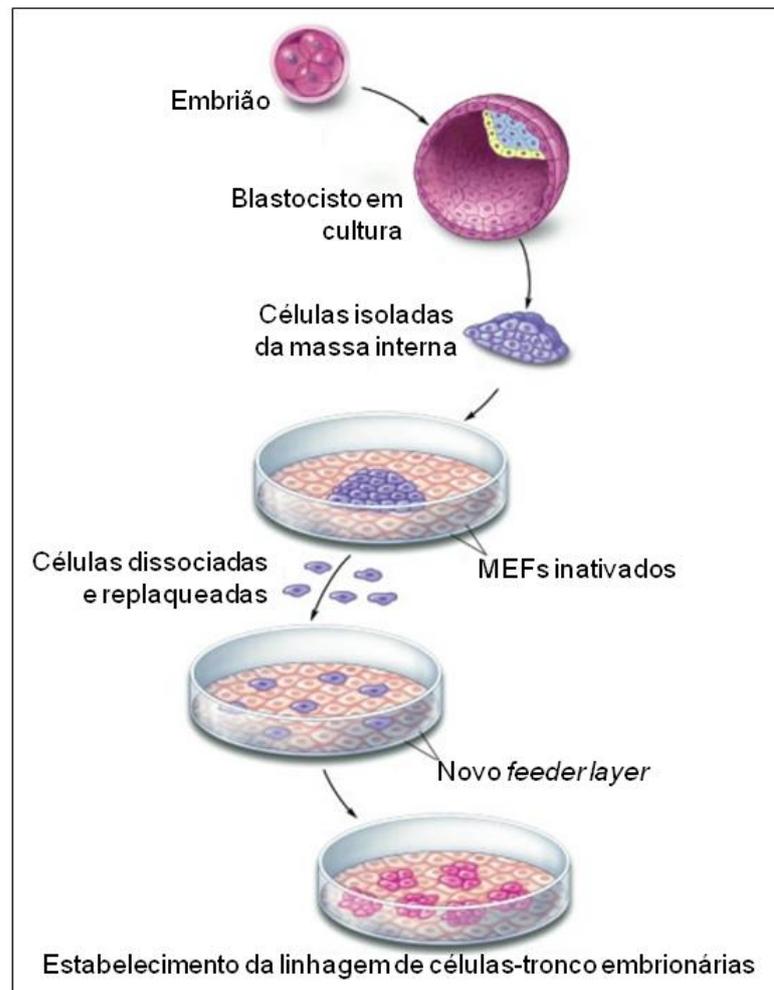
### **1.7 Células-tronco embrionárias**

As primeiras células embrionárias pluripotentes foram derivadas de teratocarcinomas de camundongos. Essas células podiam ser expandidas quando cultivadas em presença de LIF (fator inibidor de leucemia) e sobre uma camada de fibroblastos embrionários murinos (MEFs), além de serem capazes de formar agregados celulares que mimetizam o desenvolvimento embrionário normal, bem como se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (Martin e Evans, 1975).

O desenvolvimento de estudos mais aprofundados com essas células (Martin, 1980) permitiu, em 1981, o estabelecimento das primeiras linhagens de células-tronco embrionárias derivadas de embriões de camundongo (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto e, quando mantidas em condições ideais, crescem indefinidamente e se mantêm pluripotentes, ou seja, podem dar origem a todos os tipos celulares de um organismo adulto (Conley *et al.*, 2005). Assim, essas células apresentam duas propriedades fundamentais: possuem capacidade ilimitada de auto-renovação e são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares *in vitro* ou *in vivo*. Essas características geram uma grande expectativa em relação a terapias celulares baseadas em células-tronco embrionárias, já que possuem um potencial superior de diferenciação em diferentes tipos celulares, quando comparadas a células-tronco adultas (Pucéat e Ballis, 2007).

Assim como as células de teratocarcinoma, as células-tronco embrionárias foram derivadas em presença de LIF sobre uma camada de MEFs e são mantidas rotineiramente dessa forma (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981) (Figura 5). Esse é um aspecto importante da cultura de células-tronco, pois os MEFs liberam fatores importantes, que garantem um ambiente favorável para a manutenção do estado pluripotente (Smith e Hooper, 1983; Buhr *et al.*, 2007).



**Figura 5: Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias.** Para gerar uma linhagem de células-tronco embrionárias, as células da massa interna de um blastocisto são isoladas e plaqueadas sobre uma camada de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) inativados mitoticamente. Essas células da massa interna se replicam e formam agregados celulares, que podem ser expandidos, se passados para um novo feeder de MEFs. Se essas células crescem em condições adequadas de cultura, podem ser mantidas em estado pluripotente, com capacidade indefinida de replicação, como uma linhagem celular (adaptado do *site* <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixC.asp>).

Tendo em vista a grande plasticidade das células-tronco embrionárias, muitos grupos têm estabelecido protocolos para induzir sua diferenciação. Um dos meios mais comuns e utilizados para isso é a formação de corpos embriões (EBs). Os EBs são agregados esféricos de células-tronco, formados quando essas células crescem em suspensão, na ausência de LIF e de MEFs (Kurosawa, 2007). Esses agregados são capazes de se diferenciar espontaneamente em células das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), recapitulando muitos aspectos da diferenciação celular durante a embriogênese (Martin e Evans, 1975; Martin, 1980). Por esta razão, a formação de EBs tem sido amplamente utilizada como modelo *in vitro* para estudos de biologia do desenvolvimento e para diferenciação de células-tronco embrionárias tanto de camundongo quanto humanas (Desbaillets *et al.*, 2000; Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000).

As células-tronco embrionárias, quando mantidas em condições específicas, são capazes de se diferenciar em células do sistema nervoso central, como neurônios e astrócitos, e se integrar nos tecidos transplantados (Kawasaki *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2004). Porém, para que a integração dessas células se dê de forma eficiente, é preciso que haja uma pré-diferenciação em cultura, para que as células geradas sejam compatíveis com o tecido neural (Ben-Hur *et al.*, 2004; Bibel *et al.*, 2004; Banin *et al.*, 2006). Em relação à retina, a maioria dos trabalhos consegue induzir apenas um comprometimento com um fenótipo de progenitor, mas já foi demonstrado que as células-tronco embrionárias são capazes de adquirir fenótipos de células específicas da retina, incluindo fotorreceptores (Zhao *et al.*, 2002; Lamba *et al.*, 2006; 2009; Osakada *et al.*, 2008).

Diversos grupos vêm tentando obter um protocolo seguro e eficaz de diferenciação em fotorreceptores. As estratégias adotadas geralmente envolvem a co-cultura com células de retina (Zhao *et al.*, 2002; Sugie *et al.*, 2005) ou a adição de fatores de crescimento e/ou moléculas inibidoras de vias de sinalização específicas (Ikeda *et al.*, 2005; Lamba *et al.*, 2006; Osakada *et al.*, 2008). Apesar disso, o potencial das células-tronco embrionárias ainda não é muito explorado no tratamento de retinopatias degenerativas, provavelmente pela falta de uma estratégia capaz de promover eficientemente sua diferenciação robusta e específica em fotorreceptores.

Nesse contexto, a possibilidade de combinar terapias celulares com transferência gênica é particularmente interessante, tendo em vista a identificação de fatores de transcrição associados ao processo de diferenciação de fotorreceptores. Além disso, os estudos relacionados ao papel de fatores extrínsecos na determinação celular de progenitores (Yang, 2004) ressaltam a importância do microambiente retiniano nos processos de diferenciação de fotorreceptores.

Assim, a transferência de genes que codificam fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de fotorreceptores poderá aumentar a capacidade de diferenciação de células-tronco embrionárias, de forma similar ao que acontece na diferenciação normal, assim como a utilização de meio condicionado por retina pode oferecer a combinação de fatores necessária para a diferenciação de células-tronco embrionárias em fotorreceptores.

## 2. Objetivos

Tendo em vista o potencial das terapias celulares no tratamento de retinopatias e a ausência de protocolos eficientes para a diferenciação e produção de fotorreceptores, o objetivo geral desta dissertação foi o de estabelecer procedimentos destinados a testar efeitos de fatores intrínsecos e extrínsecos sobre a diferenciação de fotorreceptores a partir de células-tronco embrionária murinas.

Nesta fase, procuramos estabelecer modelos para examinar os efeitos da transdução de fatores de transcrição associados à diferenciação *in vivo* de fotorreceptores, bem como de meios condicionados contendo moléculas produzidas pelo tecido retiniano, sobre a expressão de marcadores de fotorreceptores em células-tronco embrionárias murinas.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Produzir plasmídeos de expressão em células eucarióticas contendo genes chave para a diferenciação em fotorreceptores;
- Superexpressar os genes *Otx2*, *Crx* e *Nrl* em células-tronco embrionárias murinas, visando, no futuro, examinar a expressão de outros marcadores fenotípicos e diferenciação em fotorreceptores;
- Analisar o efeito de meio condicionado por tecido retiniano sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias comprometidas com o fenótipo neural.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Construção dos plasmídeos de expressão contendo genes de diferenciação de fotorreceptores

Os plasmídeos base contendo os genes *Otx2* (pME18S-otx2) e *Crx* (pBSKS-crx) de camundongo foram gentilmente cedidos pelo Dr. Takahisa Furukawa (Osaka Bioscience Institute, Japão - Furukawa *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1999), e o plasmídeo base contendo o gene *Nrl* (pCDNA4C-wtNRL) humano foi gentilmente cedido pelo Dr. Anand Swaroop (Departments of Ophthalmology and Visual Sciences, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA - Swaroop *et al.*, 1992). A construção dos plasmídeos de expressão em eucariotos contendo genes de diferenciação em fotorreceptores foi feita a partir do plasmídeo viral UF11 (Zolotukhin *et al.*, 2002), proveniente de um adenovírus associado (AAV), que possui um sítio de clonagem para inserção de genes e confere resistência à neomicina. Este plasmídeo, assim como a construção UF11-GFP (utilizado neste trabalho como controle nos experimentos de transdução gênica), foram trazidos para nosso laboratório pela Dr<sup>a</sup> Hilda Petrs Silva através de uma colaboração com o laboratório do Dr. William Hauswirth (Universidade da Flórida, Gainesville, FL, USA). Esse plasmídeo, apesar de ser de origem viral, pode também ser usado para transfecção direta.

Para construir os plasmídeos contendo *Otx2*, *Crx* e *Nrl*, inicialmente esses genes foram amplificados por PCR, utilizando a enzima *pfu Turbo Hot Start* (Stratagene). Os clones foram flanqueados pela sequência de clivagem da enzima de restrição *NotI* (Promega). A tabela 1 apresenta a sequência dos *primers* usados. Em seguida, foi feita a ligação do produto de PCR com um plasmídeo ponte TOPO,

seguindo o protocolo e reagentes do kit (TOPO TA Cloning kit – Invitrogen) e então bactérias *E. coli* da cepa DH5 $\alpha$  foram transformadas por choque térmico: 70 $\mu$ l de bactéria foram incubados com 4 $\mu$ l de DNA, proveniente da reação do kit TOPO, por 30 minutos em gelo. Em seguida, as bactérias foram mantidas por 1 minuto e meio a 42°C, e mais 2 minutos em gelo. Após a reação, as bactérias foram incubadas por 1 hora a 37°C, em meio LB (1% NaCl, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura) sem antibiótico e foram depois plaqueadas em LB-agar (1% NaCl, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1,5% agar) contendo 100 $\mu$ g/ml de kanamicina (Invitrogen), onde cresceram por 14 horas a 37°C, para gerar colônias isoladas. A seguir, foi feita uma mini-prep com as colônias selecionadas pelo antibiótico: as colônias cresceram em suspensão por 14 horas a 37°C, sob agitação, em 5ml de meio LB líquido acrescido de 100 $\mu$ g/ml de kanamicina, para obtenção de quantidade suficiente de plasmídeo. Os plasmídeos expressos foram purificados seguindo o protocolo e reagentes do kit de purificação (PureLink Quick Plasmid mini-prep kit – Invitrogen). Os plasmídeos contendo os insertos, amplificados e purificados foram então digeridos com *NotI* (Promega), na concentração de 1U/ $\mu$ g de DNA, por 1 hora a 37°C. Os fragmentos gerados foram purificados a partir de um gel de agarose, com um kit de purificação (Illustra GFX PCR DNA & Band Purification kit - GE).

Os clones, agora com terminação coesiva por *NotI*, foram ligados no plasmídeo UF11, previamente digerido com *NotI*, desfosforilado por 30 minutos com 0,1U/10 $\mu$ g de DNA de CIAP (calf intestine alkaline phosphatase – Promega) a 37°C, inativado por 10 minutos a 75°C e purificado com um kit (DNA Clean and Concentrator kit – Zymo Research). A reação de ligação foi feita *overnight* a 14°C, com 1 $\mu$ l da enzima T4 DNA ligase (20000U/ml – Promega), em um volume final de reação de 20 $\mu$ l. Do produto de reação, 4 $\mu$ l foram utilizados para transformar

bactérias *SURE cells* (Stratagene), competentes para choque-térmico, da mesma forma descrita anteriormente. Após a reação, as bactérias foram incubadas por 1 hora a 37°C, em meio LB sem antibiótico, e em seguida foram plaqueadas em placas de LB-agar contendo 50µg/ml de ampicilina (Invitrogen), onde cresceram por 14 horas a 37°C para gerar colônias isoladas. As colônias selecionadas foram submetidas a uma mini-prep, para purificação e análise dos plasmídeos. Os plasmídeos foram analisados quanto à presença do clone por seqüenciamento do DNA, feito na unidade genômica do IBCCF<sup>0</sup>, e a orientação dos insertos foi confirmada por digestão com a enzima de restrição *SmaI* (Promega) na concentração de 1U/µg de DNA, a temperatura ambiente por 1 hora.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
Otx2 – Fw	5'-AAGCGGCCGCCACCATGATGTCTTATCTTAAG-3'
Otx2 – Rev	5'-GCGGCCGCTCACAAAACCTGGAATTT-3'
Crx – Fw	5'-AAGCGGCCGCCACCATGATGGCATATATGAACC-3'
Crx – Rev	5'-GCGGCCGCCTACAAGATCTGAAACTT-3'
Nrl – Fw	5'-GACGAGGCGGCCGCATGGCCCTGCCCCCAGCC-3'
Nrl - Rev	5'-GAGGAGGCGGCCGCCACCACAAGGTGCTCTGAAC-3'

**Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para amplificar os genes de fotorreceptores.**

### **3.2 Produção e purificação dos plasmídeos de expressão contendo genes de diferenciação de fotorreceptores**

Após sua construção, foi preciso produzir uma grande quantidade de plasmídeos purificados, compatível com as transfecções. Para isso foi feito, com cada uma das construções, uma maxi-prep: Colônias contendo as construções de interesse cresceram em suspensão em 5ml de meio LB com ampicilina, sob agitação, por 3 horas a 37°C. Após esse período, a cultura líquida foi passada para 1

litro de meio TB (1,2% triptona, 2,4% extrato de levedura e 0,4% glicerol) acrescido de 10% de tampão KHPO e 0,1% de ampicilina (100mg/ml) e incubada por 37°C por mais 14 horas. Para precipitar as bactérias, a cultura líquida foi centrifugada por 10 minutos, a 4000rpm, em Sorvall (rotor GSA). Para cada 250ml de meio centrifugado, foi acrescentado ao *pellet* 20ml de solução de ressuspensão (50mM tris-HCl, 10mM EDTA, 20µg/ml RNase, pH8,0). Com auxílio de pipetador, o *pellet* foi dissociado e em seguida foram adicionados 20ml de solução de lise recém preparada (0,2N NaOH, 1% SDS). A mistura foi agitada vigorosamente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 20ml de solução de neutralização (3M acetato de potássio, 28,7% ácido acético). A mistura foi agitada e incubada em gelo por 10 minutos e então centrifugada por mais 10 minutos, a 8000rpm, em Sorvall (rotor SS-34). O sobrenadante foi coletado e a ele foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol. A mistura foi incubada *overnight* a -20°C e então centrifugada por 20 minutos a 10000rpm, em Sorvall (rotor SS-34). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 80% gelado e deixado na bancada para secar.

Após a produção dos plasmídeos em grande quantidade, sua purificação foi feita com um gradiente de cloreto de cério: o *pellet* resultante da purificação foi solubilizado cuidadosamente em 10ml de TE (100mM tris-HCl, 10mM EDTA, pH8,0), com auxílio de pipetador. Em seguida, foi adicionado 1g de CsCl para cada ml de solução. A solução foi então transferida para tubos de ultracentrífuga (*Quick-Seal* – Beckman) e 100µl de brometo de etídeo (740µg/ml - Invitrogen) foram adicionados sobre a solução. Os tubos foram selados e centrifugados por 16 horas, a 45000rpm a 16°C, em ultracentrífuga Beckman (rotor 70.1 Ti). Após a centrifugação, a banda mais baixa no tubo, corada com brometo de etídeo, foi removida com uma seringa e

agulha 18G. O DNA foi lavado 3 vezes com butanol saturado em H<sub>2</sub>O para a retirada do brometo. Para lavar o butanol, foram adicionados 2,5x do volume original de DNA de H<sub>2</sub>O e 2x do volume total, de etanol. A solução foi incubada *overnight* a -20°C e centrifugada a 15000 rpm em Sorvall (rotor SS-34). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado novamente com etanol 80%, deixado secar em temperatura ambiente e ressuspenso em 1-2 ml de H<sub>2</sub>O.

A dosagem dos plasmídeos resultantes da purificação foi feita através da medida de absorção de luz ultravioleta, por espectrofotometria: 5µl de DNA foi adicionado a 995µl de H<sub>2</sub>O e a densidade óptica da mistura foi lida no comprimento de onda de 260nm. A concentração do DNA, em µg/ml de amostra, corresponde a 10 vezes o valor da leitura óptica. Para conferir a pureza das amostras, foi feita, ainda, uma segunda medida no comprimento de onda de 280nm. A taxa de pureza foi determinada pela relação entre as medidas de 260nm e de 280nm. Uma relação com valor próximo a 2 é ideal e significa que os plasmídeos estão com um bom grau de pureza e podem ser usados para a transfecção.

### **3.3 Cultura de células HEK293**

As células HEK293 foram cultivadas em garrafas de cultura (Corning) para expansão, ou sobre placas de 12 poços (Corning), para os experimentos de transfecção. Essas células eram mantidas em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de glutamina (Sigma) e 100U/ml de penicilina + 100µg/ml estreptomicina (Sigma), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e foram passadas por tratamento enzimático com tripsina (Gibco).

### 3.4 Transfecção de células HEK293 com lipofectamina

Para a transfecção das células HEK293 foi utilizado o reagente lipofectamina (Invitrogen). As células foram mantidas em cultura em placas de 12 poços até atingirem uma confluência de aproximadamente 90%. Para cada um dos plasmídeos (UF11-GFP, UF11-Otx2, UF11-Crx e UF11-Nrl), foram adicionados 10µg de DNA em 600µl de meio DMEM, sem soro e sem antibiótico. Separadamente, foram adicionados 25µl de lipofectamina em mais 600µl de meio sem soro e sem antibiótico, que reagiram por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, misturou-se cuidadosamente o meio contendo a lipofectamina ao meio contendo o DNA plasmidial e essa mistura reagiu por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, as células foram incubadas com o meio contendo DNA e lipofectamina por 4 horas, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com meio com soro e mantidas por 24 horas, para que os plasmídeos fossem expressos. No dia seguinte as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e posteriormente foram processadas por imunocitoquímica.

### 3.5 Cultura de células-tronco embrionárias murinas

As células-tronco embrionárias murinas da linhagem USP1 (Sukoyan *et al.*, 2002), cedidas pelo Dr. Stevens Rehen, professor do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ e chefe do Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular, foram cultivadas sobre um *feeder layer* de fibroblastos embrionários murinos (MEFs), em meio-mES, composto de DMEM/F12 (Gibco), suplementado com LIF, 15% de *knockout serum replacement* (KSR - Gibco), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco), 1% de glutamina (Sigma), 50µg/ml de sulfato de gentamicina (Schering-Plough) e 100µM de β-mercaptoetanol (Sigma). As células foram mantidas

a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>; o meio foi trocado diariamente e, ao atingir a confluência ideal, ou seja, quando a cultura apresentava colônias homogêneas e brilhantes, a aproximadamente uma colônia de distância uma da outra, as células eram passadas para um novo *feeder* de MEFs, com o uso de TrypLE™ (Gibco), uma enzima recombinante análoga à tripsina.

### **3.6 Preparação do *feeder layer***

Os MEFs utilizados neste projeto foram produzidos no laboratório do Dr. Stevens Rehen e gentilmente cedidos ao nosso grupo, regularmente, durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Os MEFs eram descongelados e mantidos em placas tratadas com gelatina (2% - Sigma), para melhor adesão das células, em meio-MEF, composto de DMEM/F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de glutamina, 50µg/mL sulfato de gentamicina e 100µM de β-mercaptoetanol, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingir uma confluência entre 80% e 90%, ideal para manutenção das células-tronco murinas em estado pluripotente, os MEFs eram inativados com 10ng/mL de mitomicina C (Sigma) por 3 horas, para bloquear a sua proliferação. Após esse tempo, as células eram lavadas três vezes com PBS/glicose e mantidas em meio-MEF por 24 horas, até que as células-tronco embrionárias fossem plaqueadas sobre elas.

### **3.7 Formação de corpos embrióides e pré-diferenciação neural**

As células-tronco embrionárias cultivadas sobre MEFs inativados foram mantidas até formar colônias com bordas brilhantes, grandes o suficiente para ocupar a placa, mas mantendo um espaço de aproximadamente uma colônia entre

elas. A passagem foi feita enzimaticamente com TrypLE™ (Gibco) e as células foram plaqueadas em placas tratadas com gelatina 2%, sem MEFs. Após 24 horas, as células aderidas sobre a gelatina foram novamente tratadas com TrypLE™, centrifugadas e ressuspensas em Meio-EB, composto de DMEM/F12, suplementado com 15% FBS, 1% de glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 50µg/ml de sulfato de gentamicina e 100µM de β-mercaptoetanol; em seguida as células foram transferidas para placas de Petri não aderentes e mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para formação dos corpos embriões (EBs).

Após dois dias de formação dos EBs, o meio foi trocado e 2mM de ácido retinóico (RA - Sigma) foram adicionados à cultura, para a pré-diferenciação neural. No quarto dia de formação de EB foi feita uma nova troca de meio, com adição de RA. Os EBs foram usados nos experimentos após seis dias em cultura (2 dias em meio-EB, mais 4 dias em meio-EB+RA).

### **3.8 Transfecção com Nucleofector**

Células-tronco indiferenciadas foram submetidas ao protocolo de formação de corpos embriões, através da manutenção em placas não aderentes, como descrito acima. Após dois dias de cultura, os EBs foram dissociados, lavados uma vez com PBS, centrifugados e dois milhões de células foram ressuspensas em 100µl de solução de nucleofecção (Amaza) acrescida de 10µg de plasmídeos. O UF11-GFP, quando sozinho, foi usado como controle. Os genes de diferenciação em fotorreceptores foram co-transfectados com o plasmídeo UF11-GFP (3µg de UF11-GFP + 7µg UF11-Otx2 ou UF11-Crx ou UF11-Nrl). A solução foi então aplicada em cubeta específica e eletroporada com o programa A-023 do Nucleofector (Amaza). Após a eletroporação, as células foram recuperadas e mantidas em placas não

aderentes por 24 horas, para expressão dos plasmídeos. Nessas condições, as células voltam a formar agregados. Após esse tempo, as culturas foram mantidas por mais 3 dias em presença do antibiótico neomicina, para que as células transfectadas fossem selecionadas positivamente.

### **3.9 Processamento histológico dos corpos embrióides**

Após os 6 dias de procedimentos, os corpos embrióides resultantes dos experimentos de transfecção foram fixados com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavados com salina tamponada com fosfato (PBS) e criopreservados através de um gradiente de sacarose com concentrações de 10%, 20% e 30%. Para fazer os cortes histológicos, os EBs foram deixados em um tubo de 15ml, na bancada, para decantarem e formarem um *pellet*. O excesso de sacarose foi retirado dos tubos, os EBs foram recolhidos com uma ponteira cortada e colocados em uma forma plástica. O restante da sacarose foi cuidadosamente retirado com ajuda de papel filtro, os EBs foram colocados em meio de inclusão OCT (Tissue-Tek) e foram então congelados em nitrogênio líquido. Os blocos de OCT contendo os EBs foram destacados da forma plástica, cortados em criostato a uma espessura de 5 $\mu$ m e recolhidos em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (200 $\mu$ g/ml – Sigma), para depois serem processados por imunohistoquímica.

### **3.10 Preparação de meio condicionado de retina**

Ratos da linhagem Lister Hooded foram sacrificados por decaptação no dia de seu nascimento (P0). Essa idade foi escolhida pois coincide com a onda de formação de fotorreceptores do tipo bastonetes nesses animais. Os olhos foram retirados e as retinas foram dissecadas e cortadas em explantes de

aproximadamente  $1\text{mm}^2$ , com o auxílio de pinças e bisturi. Os explantes foram incubados por 4 dias a  $37^\circ\text{C}$  em DMEM/F12, suplementado com  $50\mu\text{g/ml}$  de gentamicina e  $100\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, sem soro. Após os 4 dias de incubação, o meio foi recolhido, filtrado em membrana de  $0,22\mu\text{m}$  e congelado até o momento do experimento. Para controle, os explantes recolhidos ao fim do condicionamento do meio foram analisados histologicamente e apresentavam características morfológicas normais, sem indícios de morte celular acentuada.

### **3.11 Indução neural e tratamento com meio condicionado de retina**

Corpos embrióides pré-diferenciados com ácido retinóico, como descrito anteriormente, foram plaqueados em placas de 96 poços (corning) pré-tratadas com  $5\mu\text{g/ml}$  de laminina (Invitrogen) e  $1\mu\text{g/ml}$  de fibronectina (Invitrogen). Os EBs foram incubados em meio de indução neural, composto de DMEM/F12, suplementado com N2 (Gibco),  $20\text{ng/ml}$  de FGF-2 (R&D biosystem),  $50\mu\text{g/mL}$  de gentamicina e  $100\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol por 1 dia. Nessas condições, as células migram para fora dos EBs, aderem à placa e prosseguem nas etapas de diferenciação, expressando marcadores neurais como nestina e Tuj1 ( $\beta$ -III-tubulina). Após um dia de migração, os EBs tiveram seu meio trocado para meio de indução neural ou meio condicionado de retina (50% em DMEM/F12), suplementado com N2 (Gibco),  $20\text{ng/ml}$  de FGF-2 (R&D biosystem),  $50\mu\text{g/mL}$  de gentamicina e  $100\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, até completarem 5 dias em cultura. O meio foi trocado a cada dois dias.

Para os experimentos da curva de concentração do meio condicionado, o protocolo usado foi semelhante ao descrito acima, porém os EBs foram mantidos em cultura por 3 ou 5 dias, em presença de meio de indução neural ou meio condicionado de retina nas concentrações de 5%, 10%, 25%, 50% ou 75%.

### 3.12 Imunocitoquímica

As amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 15 minutos e depois foram lavadas e mantidas em salina tamponada com fosfato (PBS). Para o início da imunocitoquímica, as amostras foram incubadas com Triton X-100 (Sigma) 0,5% em PBS, pH 7.4, por 15 minutos, a fim de permeabilizar as células e facilitar a entrada do anticorpo, depois foram lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos. As amostras foram então incubadas com albumina sérica bovina (BSA - Sigma) a 1% em PBS, por 1 hora, para bloquear a ligação do anticorpo em sítios inespecíficos. Após esse tempo, o excesso de BSA foi retirado e as amostras foram incubadas com o anticorpo primário diluído em BSA 1%, *overnight* a 4°C. Os anticorpos primários usados foram: anti-GFP 1:400 (Invitrogen – A11122); anti-OTX2 1:100 (Abcam - AF1979); anti-CRX 1:100 (Abnova – H0001406-MO2); anti-NRL 1:50 (Santa Cruz – SC10971); anti-nestina 1:100 (Chemicon – MAB353); anti- $\beta$ -III-tubulina 1:200 (Sigma – T2200); anti-rodopsina 1:100 (Neomarkers – ms1233-p1) e anti-Ki67 1:100 (Abcam – AB16667). No dia seguinte, as amostras foram submetidas a três lavagens sucessivas em PBS por 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories) ou DyLight 488 (Jackson Immuno Research), por 1 hora à temperatura ambiente. Para o anticorpo secundário biotilado, a revelação da imunocitoquímica foi feita com streptavidina (Molecular Probes), para visualização em microscopia de fluorescência ou confocal. Assim, após a incubação com o anticorpo secundário, as amostras foram lavadas duas vezes de 5 minutos em PBS e incubadas com streptavidina por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram lavadas por duas vezes de 5 minutos, em PBS, e incubadas com DAPI ou Sytox Green para visualização do

núcleo. Finalmente, as amostras foram lavadas em PBS e montadas com N-propilgalato diluído em glicerol.

### **3.13 Coloração com vermelho neutro**

As placas contendo os EBs expostos ao meio de indução neural ou ao meio condicionado de retina foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 30 minutos. Em seguida foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com PBS e novamente lavadas com uma solução 5%v/v de tampão acetato de sódio 0,1M, pH3,3. Após essa lavagem, as placas foram incubadas com uma anilina básica (vermelho neutro – Sigma) para coloração das células. As placas foram então lavadas em tampão acetato para retirar o excesso de corante e secas ao ar.

### **3.14 Contagem das células que migraram a partir dos corpos embrióides tratados com meio condicionado de retina**

Os EBs foram plaqueados, um a um, em placas de 96 poços e tratados com meio controle ou meio condicionado de retina, como descrito acima. Após o término dos experimentos, os EBs foram fixados, corados com vermelho neutro e fotografados em microscópio óptico em um aumento de 50 vezes, para que as células migrantes fossem quantificadas. A quantificação foi feita através da contagem das células presentes em uma área definida de 0,630mm<sup>2</sup>, posicionada a uma distância de um diâmetro de EB, contada a partir da borda do EB que estava sendo quantificado.

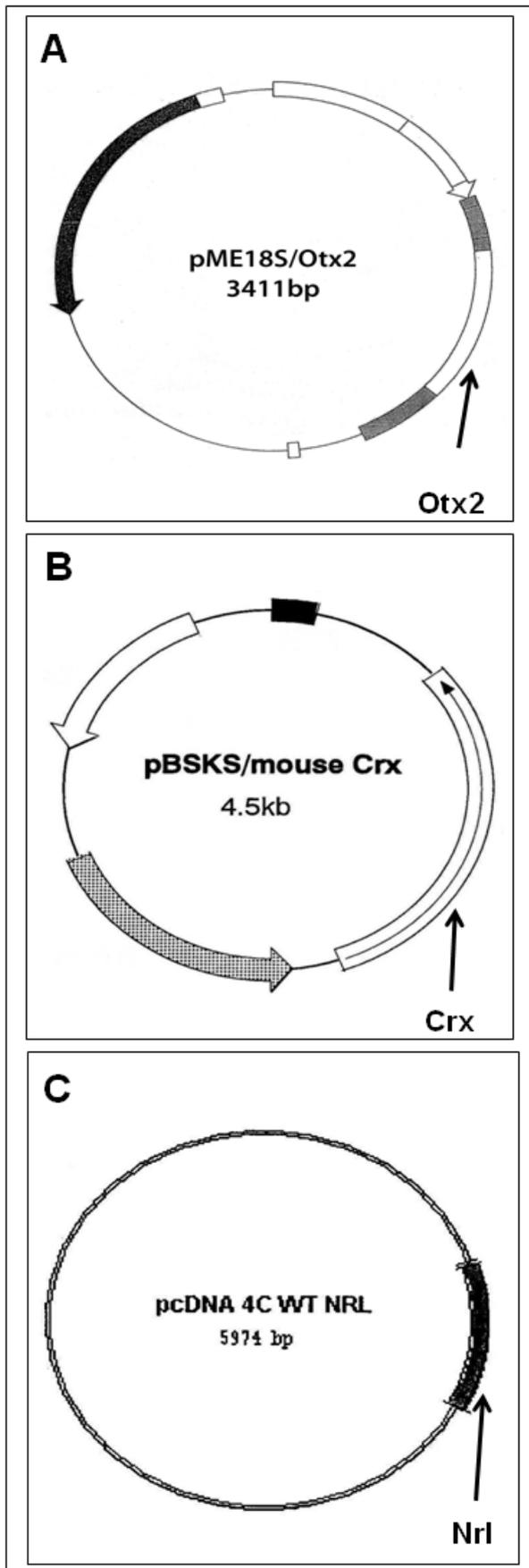
### **3.15 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas no programa *GraphPad Prism*. Aplicamos o teste t para comparação entre os grupos. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

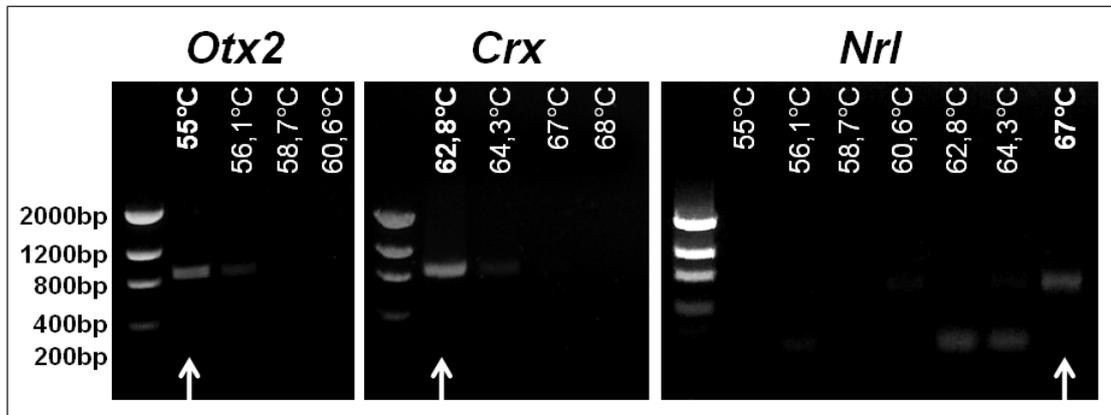
## 4. Resultados

### 4.1 Construção dos plasmídeos de expressão em eucariotos contendo genes de diferenciação em fotorreceptores

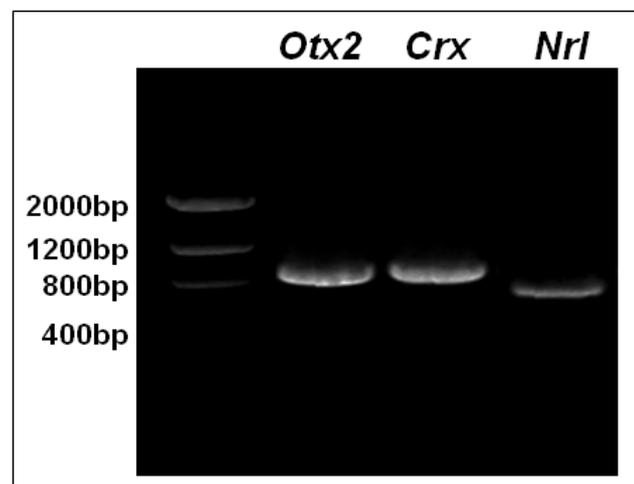
Para construir os plasmídeos de expressão em eucariotos contendo genes de diferenciação em fotorreceptores, inicialmente amplificamos por PCR os genes que estavam em plasmídeos base (Figura 6). Utilizamos *primers* específicos, que continham a seqüência de clivagem para a enzima de restrição *NotI*. Essa seqüência também está presente no sítio de clonagem do plasmídeo viral e foi usada para inserir os genes de interesse nesses plasmídeos. Inicialmente foi feito um PCR teste, com diferentes temperaturas de anelamento, para os três pares de *primers* utilizados, de *Otx2*, *Crx* e *Nrl* (Figura 7). A partir dessas reações, observamos que para o gene *Otx2*, de 893bp, a temperatura de anelamento ideal dos *primers* foi de 55°C; para o *Crx*, de 899bp, a temperatura ideal foi 62,8°C; e para o *Nrl*, de 714bp, a temperatura que produziu o produto de PCR com banda única e mais forte foi 67°C. A partir dessa análise fizemos, então, um PCR de maior volume (100µl), utilizando a polimerase *pfu Turbo Hot Start*, para garantir alta fidelidade de replicação e evitar possíveis trocas de bases, com conseqüentes mutações nos genes (Figura 8).



**Figura 6: Mapas dos plasmídeos originais contendo os genes Otx2, Crx e Nrl.** A- plasmídeo base com a sequência gênica de Otx2; B- plasmídeo base com a sequência gênica de Crx; C- plasmídeo base com a sequência gênica de Nrl.



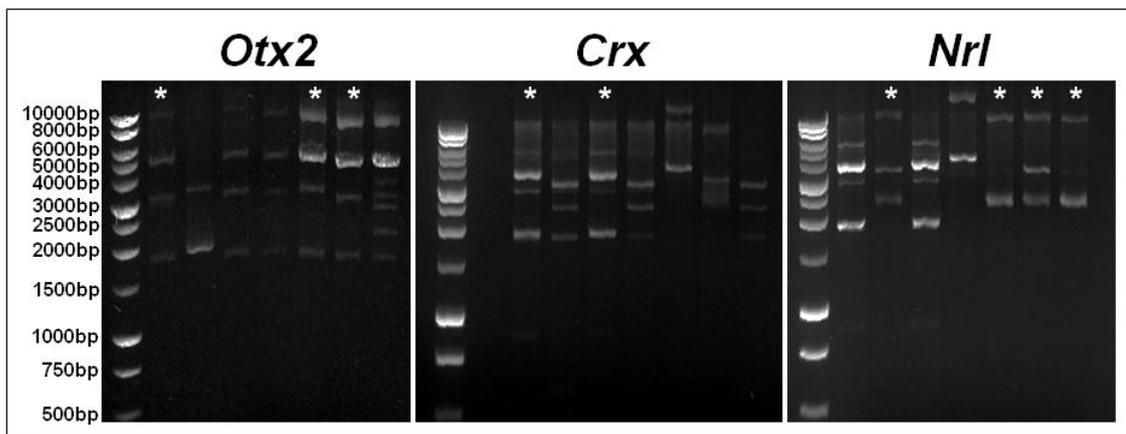
**Figura 7: Padronização dos PCRs para os genes *Otx2*, *Crx* e *Nrl*.** Os quadros apresentam géis de agarose 1% corridos com produtos de PCR feitos com diferentes temperaturas de anelamento para os genes indicados acima. As setas indicam as raias que apresentaram as melhores condições de reação. Os números à esquerda indicam os pesos moleculares do padrão de peso molecular.



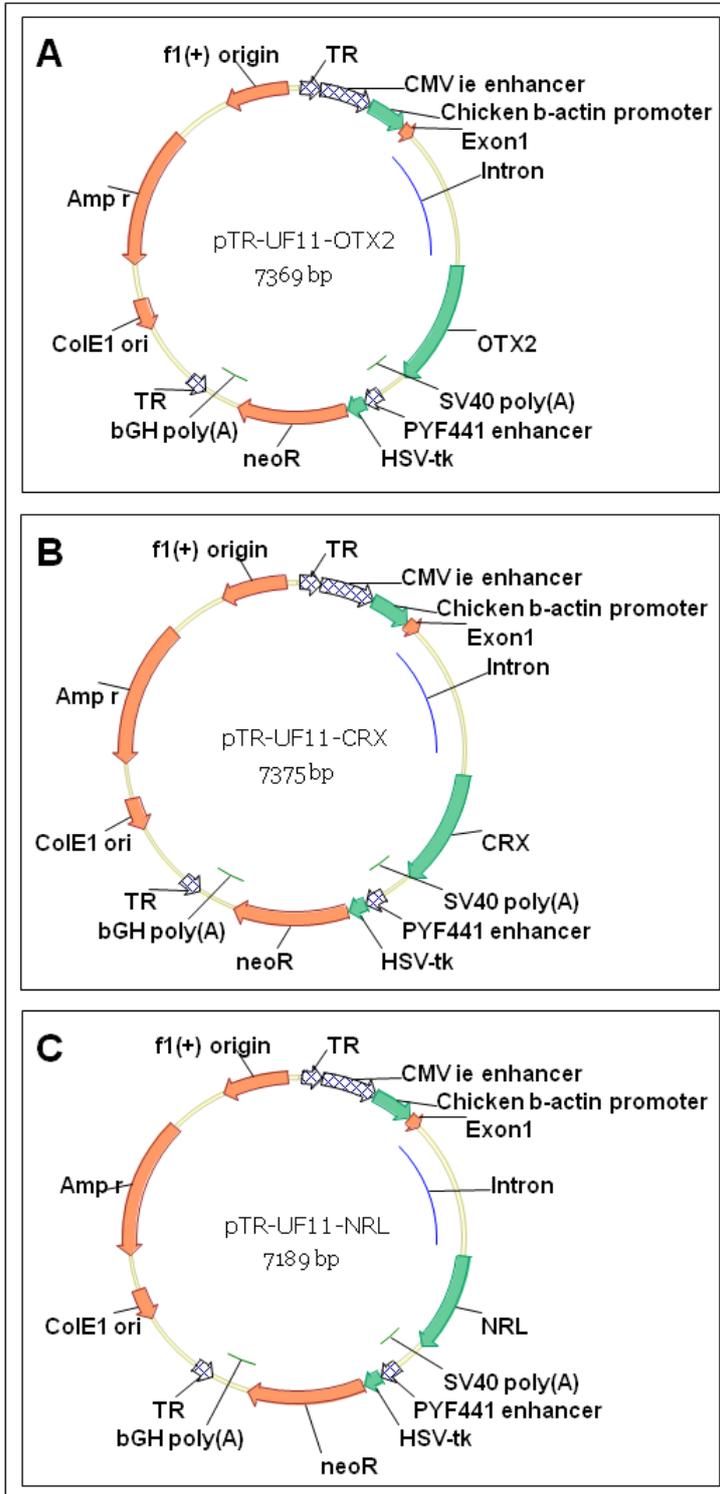
**Figura 8: Amplificação dos genes de diferenciação em fotorreceptor por PCR.** Após a padronização da reação, os genes foram amplificados em grande quantidade com uma polimerase de alta fidelidade. Os números à esquerda indicam os pesos moleculares do padrão de peso molecular.

Os produtos de PCR foram ligados no plasmídeo base TOPO, amplificados por mini-prep e testados quanto à presença dos genes por PCR e clivagens com enzimas de restrição. Os plasmídeos TOPO contendo *Otx2*, *Crx* ou *Nrl* e os plasmídeos virais UF11 foram, então, clivados com a enzima de restrição *NotI*. Em seguida, os plasmídeos UF11 foram desfosforilados e ligados aos genes. Novamente os plasmídeos foram testados por PCR e clivagem com enzimas de restrição, além de seqüenciamento de DNA, para confirmar a presença e posição de inserção dos genes. Na Figura 9 podemos observar a clivagem, com a enzima de restrição *SmaI*, dos plasmídeos provenientes de diferentes colônias de bactérias (diferentes raias do gel) transformadas com os produtos da ligação do UF11 com os genes de fotorreceptores. A clivagem com essa enzima foi importante para identificar a posição em que os genes foram inseridos no plasmídeo, pois, dependendo da direção do inserto, fragmentos de tamanhos diferentes apareceriam no gel. Para o *Otx2* inserido na posição correta, os tamanhos de bandas esperados eram 3000bp, 2000bp e 1000bp, dependendo da combinação de sítios clivados, além do plasmídeo não clivado; para o *Crx*, as bandas que indicavam a posição correta do gene eram 3000bp, 1800bp e 850bp, além do plasmídeo não clivado; e para o *Nrl*, as bandas esperadas eram 2800bp, 2500bp e 400bp, além do plasmídeo inteiro. A escolha dos plasmídeos com o inserto na posição correta é fundamental, já que para o gene ser expresso corretamente, sua janela aberta de leitura deve estar em sequência com os promotores do plasmídeo; caso contrário, o gene não é expresso. Os plasmídeos escolhidos para análise por seqüenciamento de DNA, por apresentarem fragmentos com tamanhos correspondentes aos esperados para a posição correta do gene, são os mesmos indicados com um asterisco na Figura 9. O sequenciamento das construções foi feita na unidade genômica do IBCCF<sup>o</sup> e as

análises foram feitas no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para cada um dos plasmídeos as análises indicaram a presença da sequência correspondente aos genes clonados. Com a confirmação da presença e direção correta dos insertos, os plasmídeos UF11-Otx2, UF11-Crx e UF11-Nrl (Figura 10) foram, então, amplificados e purificados, para serem utilizados nos experimentos de transdução gênica.



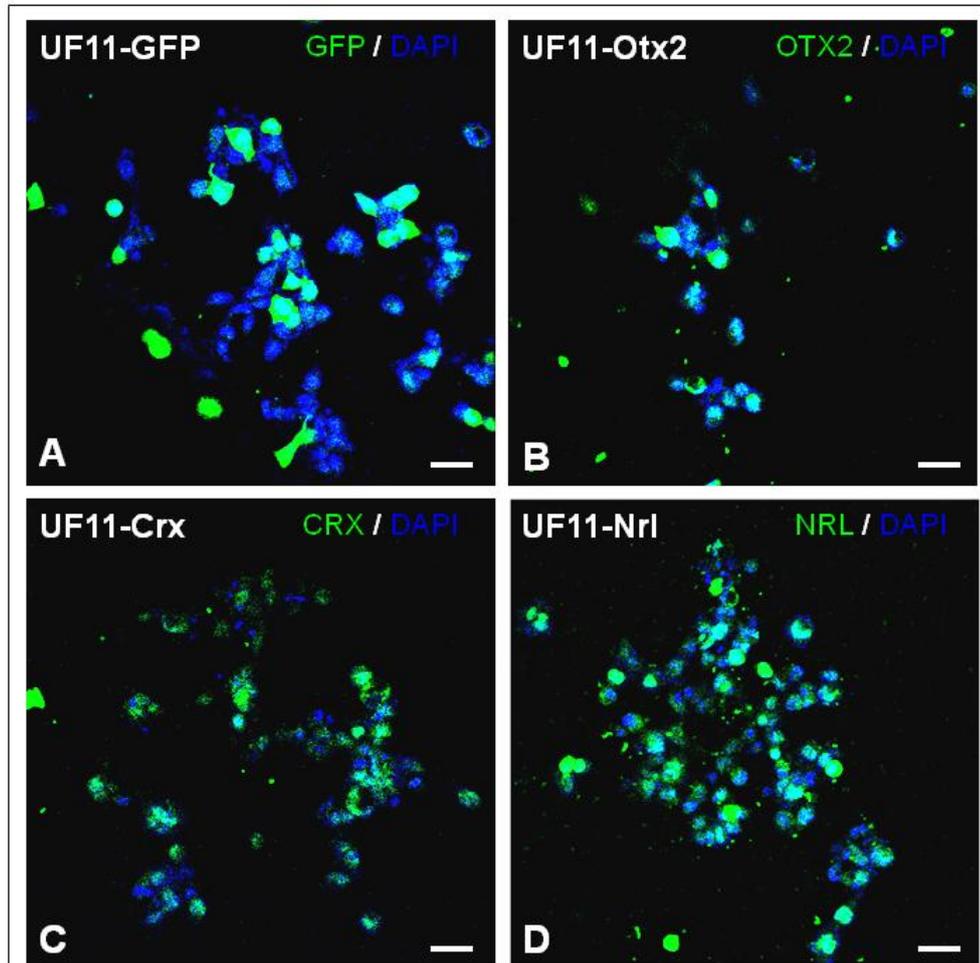
**Figura 9: Análise dos plasmídeos UF11 ligados aos genes de fotorreceptores por clivagem com *SmaI*.** Os quadros apresentam géis de agarose com os plasmídeos ligados aos genes *Otx2* (esquerda), *Crx* (centro) ou *Nrl* (direita), digeridos com a enzima *SmaI*, para confirmação da direção de inserção dos genes. Cada raia representa uma colônia de bactérias diferente, utilizada para a extração dos plasmídeos. Os asteriscos indicam as raia com fragmentos de restrição nos tamanhos esperados para a inserção do gene na posição correta.



**Figura 10: Mapas dos plasmídeos de expressão em eucariotos contendo os genes de diferenciação em fotorreceptores.**

A- plasmídeo UF11-Otx2;  
 B- plasmídeo UF11-Crx;  
 C- plasmídeo UF11-Nrl.

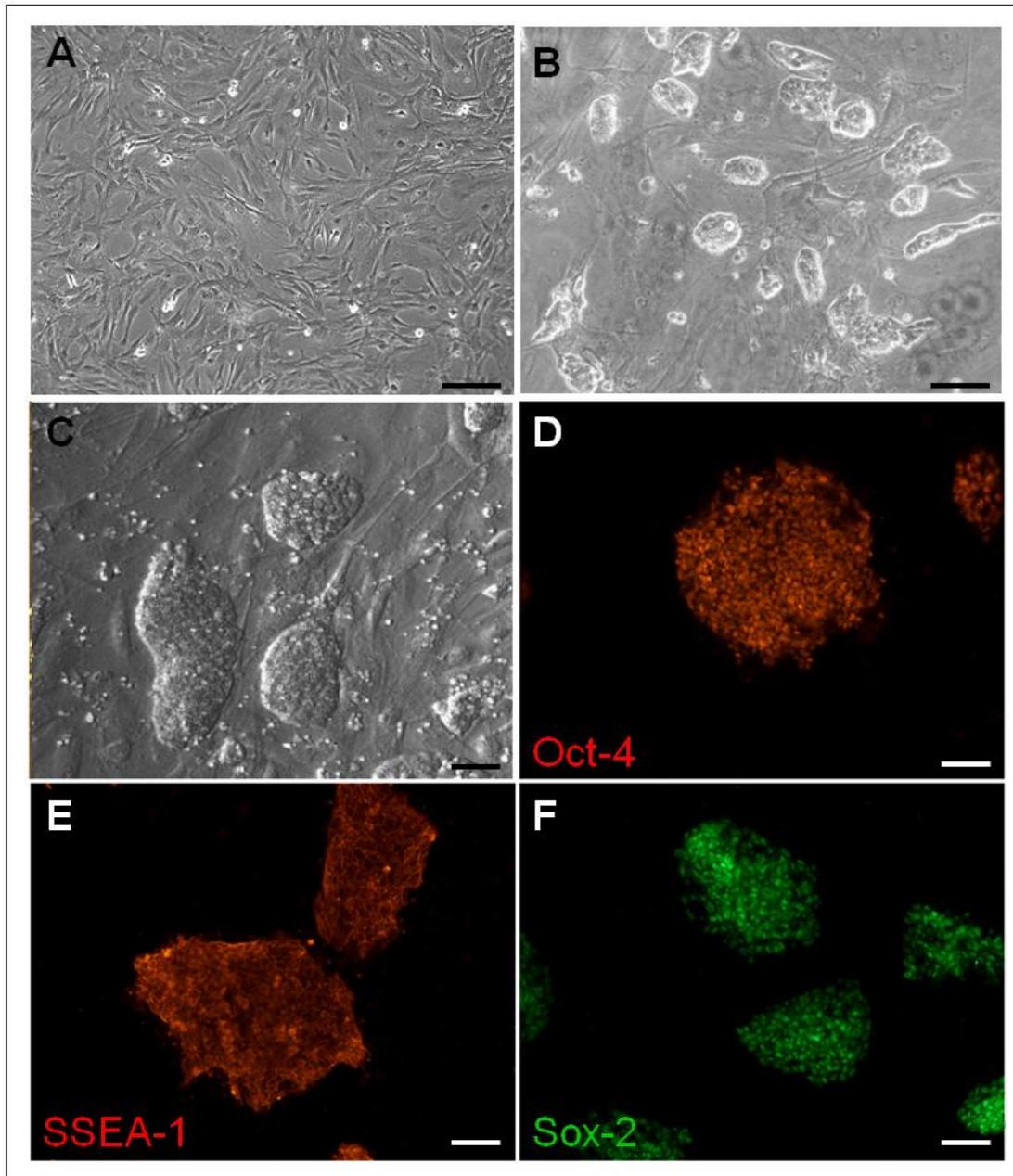
Com os plasmídeos prontos, amplificados e purificados, fizemos um teste de transfecção em células eucarióticas, para analisar a expressão dos genes inseridos no plasmídeo UF11 e confirmar, definitivamente, se os plasmídeos eram funcionais. Para isso, transfectamos células HEK293 com o plasmídeo controle UF11-GFP (Figura 11A) e com os plasmídeos UF11-Otx2 (Figura 11B), UF11-Crx (Figura 11C) e UF11-Nrl (Figura 11D), construídos em nosso laboratório. A imunocitoquímica para essas proteínas mostrou que, para cada construção, as células transfectadas são capazes de expressar os genes correspondentes. Sendo assim, podemos afirmar que conseguimos, com sucesso, construir os três plasmídeos de expressão em eucariotos contendo os genes de diferenciação em fotorreceptores propostos neste trabalho.



**Figura 11: Transfecções em células HEK293 com os plasmídeos contendo os genes de diferenciação em fotorreceptores.** Os plasmídeos contruídos neste trabalho são funcionais, como observado pela expressão dos genes em células HEK293. A- imunocitoquímica para GFP em células transfectadas com o UF11-GFP; B- imunocitoquímica para OTX2 em células transfectadas com o UF11-Otx2; C- imunocitoquímica para CRX em células transfectadas com o UF11-Crx; D- imunocitoquímica para NRL em células transfectadas com o UF11-Nrl. Barras de calibração = 20 $\mu$ m.

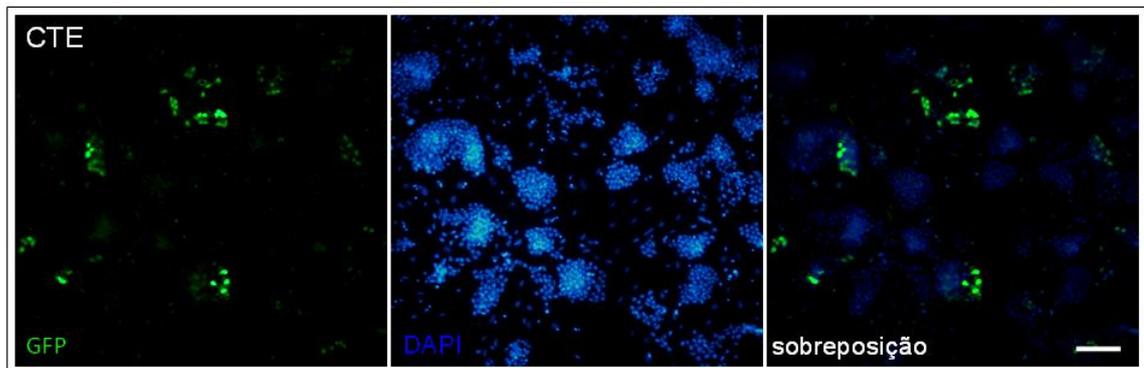
## **4.2 Cultura de células-tronco embrionárias murinas e transfecção com os genes de diferenciação em fotorreceptor**

As células-tronco embrionárias murinas da linhagem USP1 (Sukoyan *et al.*, 2002), utilizadas neste trabalho, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Stevens Rehen, do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ. Para que pudéssemos trabalhar com essas células, precisamos, inicialmente, estabelecer seu cultivo em nosso laboratório e garantir que estavam sendo mantidas em estado pluripotente (Figura 12). As células-tronco eram mantidas sobre uma camada de MEFs (Figura 12A) e, nas condições de cultura adotadas, apresentavam morfologia semelhante às descritas na literatura para células-tronco murinas pluripotentes (Matsuda *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2009), com formação de colônias arredondadas, homogêneas e com bordas brilhantes (Figura 12B e C). Além disso, dados de imunocitoquímica mostraram que essas células expressavam marcadores de pluripotência, como os fatores de transcrição OCT-4 (Figura 12D) e Sox-2 (Figura 12F) e a molécula de superfície SSEA-1 (Figura 12E).



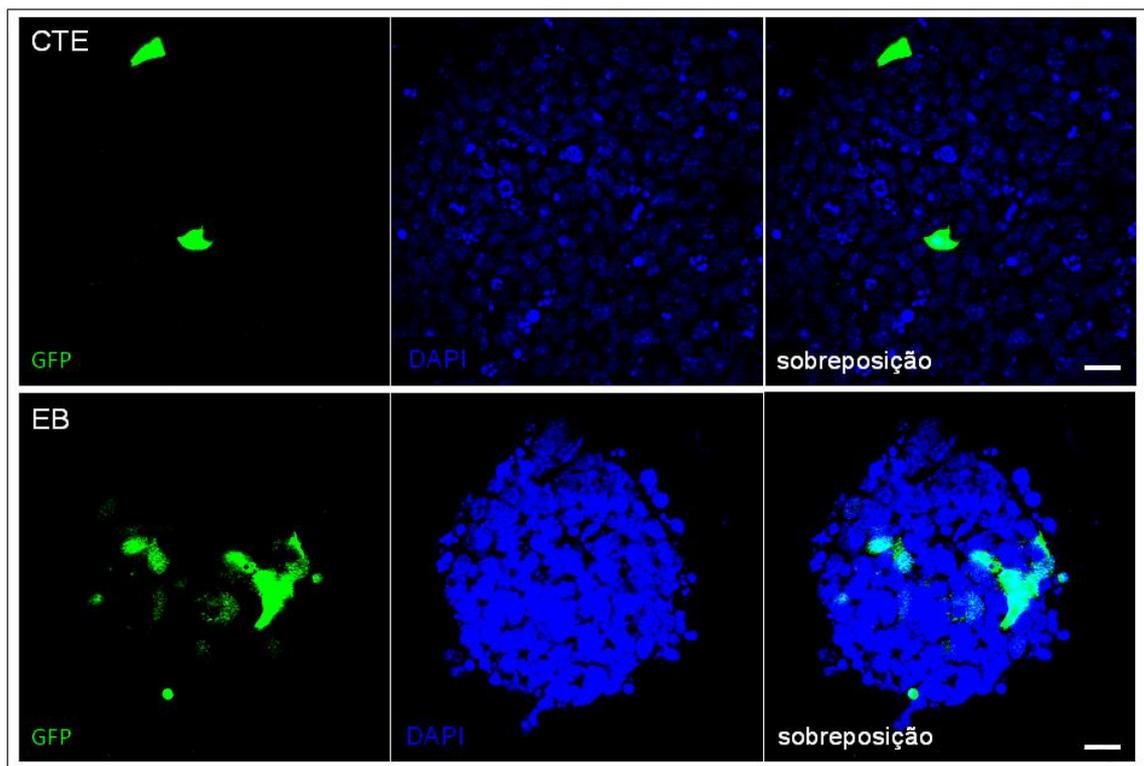
**Figura 12: Manutenção da cultura de células-tronco embrionárias murinas em estado pluripotente.** A- fotomicrografia de contraste de fase de uma cultura de MEFs na confluência em que era inativada para ser usada como *feeder layer*, na manutenção das CTEs; B- fotomicrografia de contraste de fase de uma cultura de células-tronco embrionárias murinas pluripotentes, com colônias homogêneas e bordas brilhantes; C- Fotomicrografia de colônias de CTEs em maior aumento; D- imunocitoquímica em CTEs para OCT-4; E- imunocitoquímica em CTEs para SSEA-1; F- imunocitoquímica em CTEs para Sox-2, todos marcadores de pluripotência. Barras de calibração - A e B = 100 $\mu$ m; C, D, E e F = 20 $\mu$ m.

Com a garantia de que estávamos trabalhando com uma célula pluripotente, iniciamos as transfecções com os plasmídeos contruídos neste trabalho. Inicialmente fizemos testes com eletroporação simples, utilizando diversas condições e parâmetros de transfecção, mas não obtivemos sucesso. Dessa forma, decidimos testar o nucleofector, uma nova tecnologia que vem sendo amplamente utilizada na literatura como ferramenta para transdução gênica em células-tronco embrionárias (Lakshmipathy *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2004; Dieterlen *et al.*, 2009). Para isso utilizamos um kit, que fornece uma “solução de transfecção”, e o programa de eletroporação indicado para CTEs. Com esse protocolo conseguimos transfectar as células-tronco, porém uma quantidade pequena de células eram transfectadas. A Figura 13 apresenta um exemplo de cultura de células-tronco pluripotentes, 24 horas após a transfecção com o plasmídeo UF11-GFP.



**Figura 13: Transfecção de células-tronco embrionárias murinas pluripotentes com o plasmídeo UF11-GFP.** Nas transfecções feitas em CTEs dissociadas diretamente de colônias pluripotentes poucas células eram transduzidas. Barra de calibração = 50 $\mu$ m.

Com os resultados pouco satisfatórios nas transfecções feitas a partir de células genuinamente pluripotentes, decidimos avaliar as transfecções feitas com células em estágio inicial de diferenciação, através da formação de corpos embrióides. Para isso, as células foram mantidas por dois dias em placas não aderentes e então foram dissociadas e transfectadas com o plasmídeo UF11-GFP. Uma análise visual genérica, comparando este protocolo com o anterior, indicou que o novo protocolo apresentava maior incidência de células transfectadas do que o observado para as células-tronco pluripotentes (Figura 14), e foi, então, adotado para os testes iniciais de transdução com os genes de fotorreceptores.



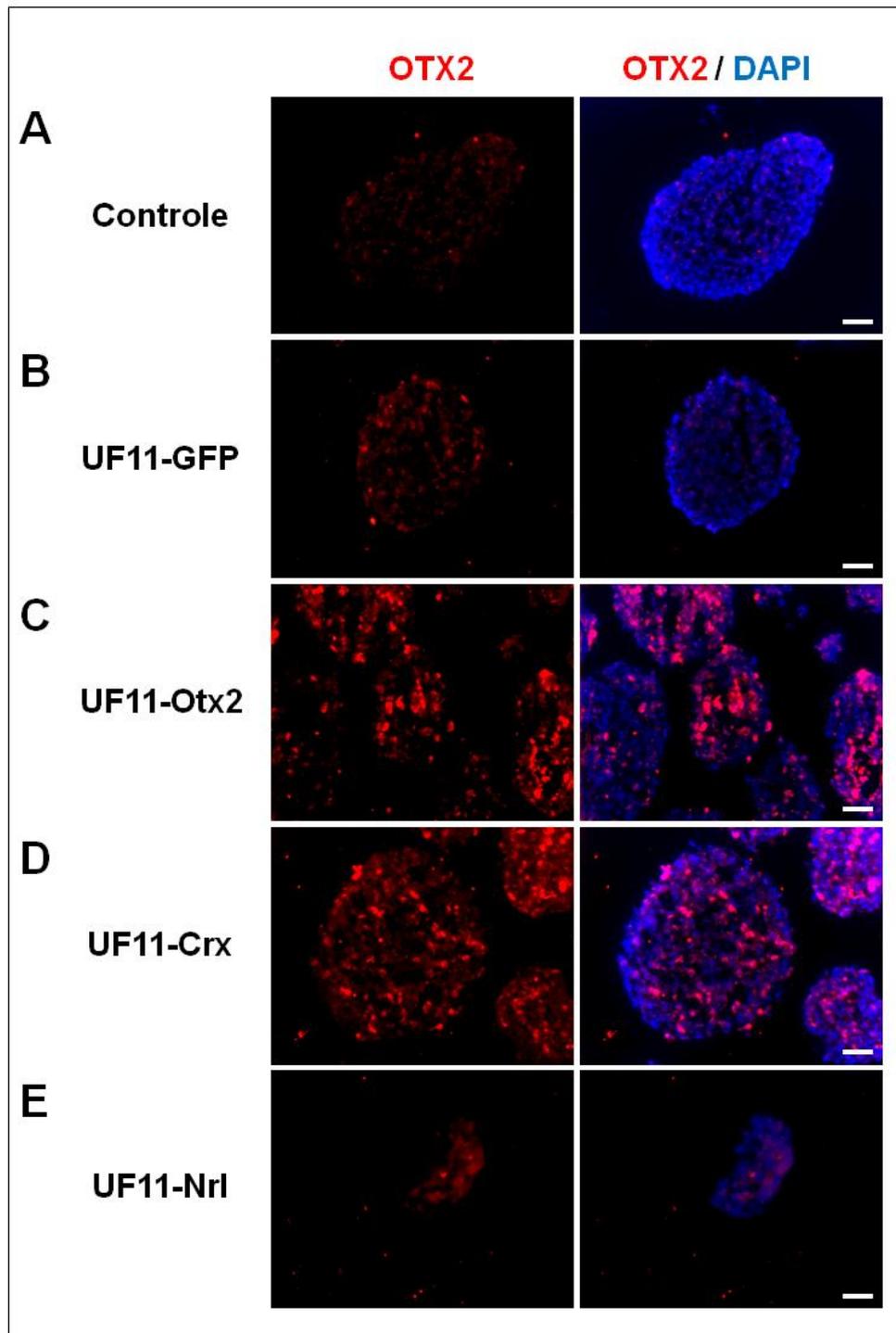
**Figura 14: Comparação entre as transfecções feitas em colônias ou corpos embrióides derivados de células-tronco embrionárias murinas.** Imagens confocais de uma colônia (painel superior) e um EB (painel inferior) após 24 horas de transfecção com o plasmídeo UF11-GFP. Barras de calibração = 20 $\mu$ m.

Com o protocolo finalmente definido, iniciamos as transfecções das células-tronco com os genes de fotorreceptores. Os EBs com 2 dias de formação foram dissociados, transfectados com cada um dos três genes de fotorreceptores, em combinação com GFP, e as células foram novamente colocadas em placas não aderentes. Após 24 horas, adicionamos neomicina à cultura, para selecionar as células que expressavam os plasmídeos e mantivemos os EBs por mais 3 dias em cultura. O plasmídeo UF11-GFP, quando usado isoladamente, foi o controle da transfecção. Os EBs controle, que correspondem às células que passaram por todos os procedimentos descritos acima, com exceção da transfecção e do tratamento com neomicina, não expressam GFP. No entanto, foi possível observar a expressão de GFP em todos os grupos de EBs submetidos à transfecção, indicando que a transdução gênica ocorreu com sucesso nas células.

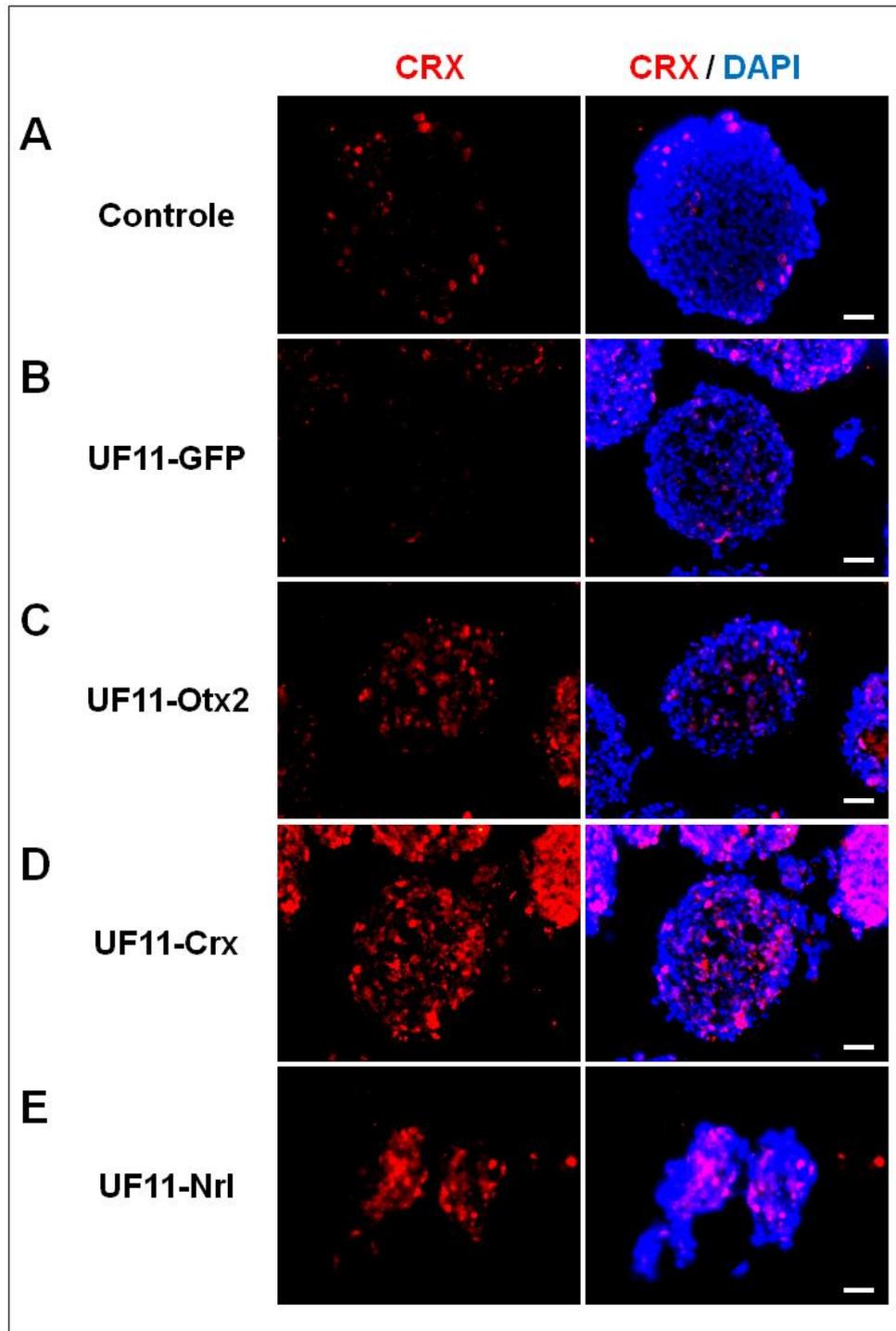
Ao analisarmos a expressão de OTX2 nas diferentes condições de transfecção, observamos um nível basal de expressão nos EBs controle e transfectados apenas com GFP (Figura 15A e B). Já nos transfectados com *Otx2*, como esperado, observamos um aumento na expressão dessa proteína (Figuras 15C e 18). Um aumento importante também foi observado nos corpos embrióides que superexpressavam *Crx* (Figuras 15D e 18) e, de forma menos intensa, nos transfectados com *Nrl* (Figuras 15E e 18).

Da mesma forma que acontece para OTX2, a expressão de CRX e de NRL é aumentada não só nas condições de superexpressão de *Crx* (Figuras 16D e 18) e *Nrl* (Figuras 17E e 18), respectivamente, mas também quando superexpressamos os outros dois genes de diferenciação em fotorreceptores (Figuras 16C e E; 17C e D e Figura 18). Esses genes são expressos apenas de forma basal nos EBs não transfectados ou transfectados com GFP (Figuras 16A e B; 17A e B). A Figura 18

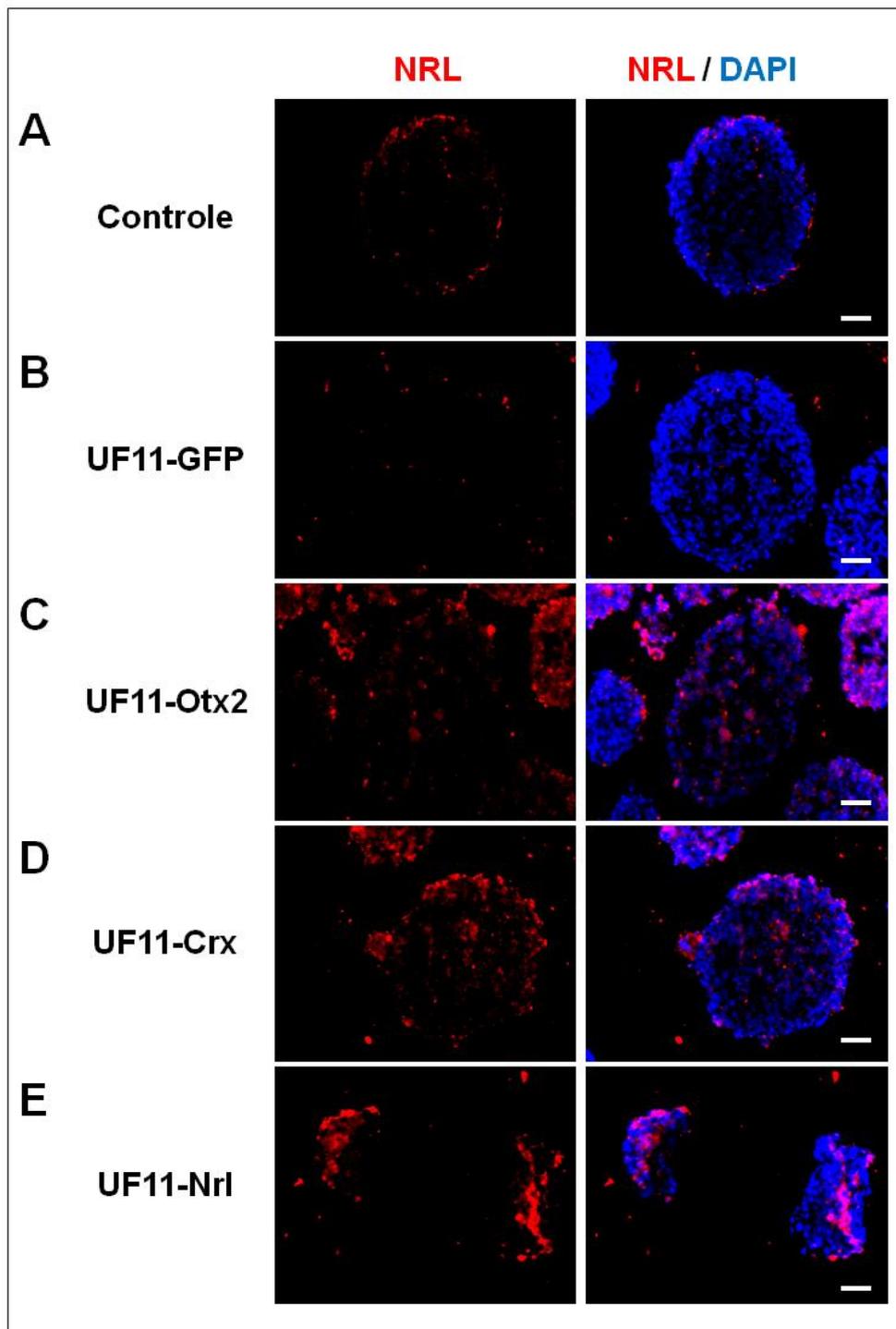
apresenta fotomicrografias feitas com zoom em células fortemente marcadas para OTX2, CRX ou NRL nas condições de superexpressão de cada um desses genes, e a tabela 2 resume, através de uma escala de “+”, estabelecida pela comparação visual entre os grupos, a quantidade de marcação encontrada nas diferentes condições experimentais.



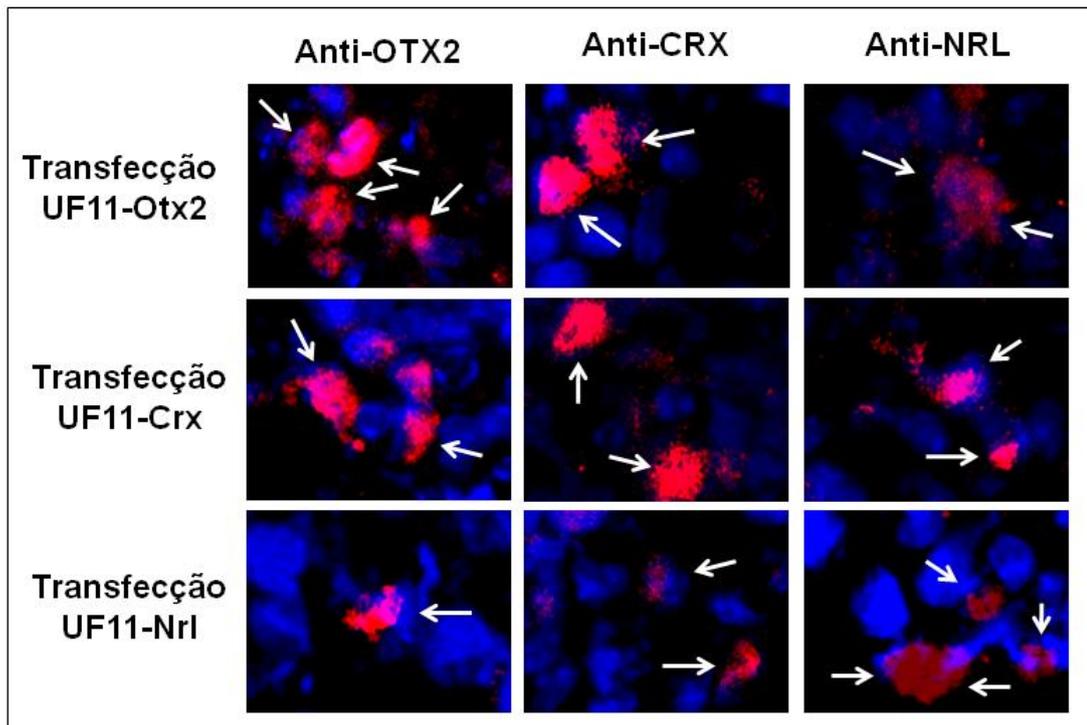
**Figura 15: Expressão de OTX2 em corpos embrióides submetidos à transfecção com genes de diferenciação em fotorreceptores.** OTX2 é expresso de maneira basal nas condições controle e tem sua expressão aumentada quando são transfectados com *Otx2*, *Crx* e *Nrl*. A- células não transfectadas; B- células transfectadas com UF11-GFP; C- células transfectadas com UF11-Otx2; D- células transfectadas com UF11-Crx; E- células transfectadas com UF11-Nrl. As fotomicrografias foram feitas usando o mesmo tempo de exposição em todas as condições. Imagens representativas de 3 experimentos diferentes. Barras de calibração = 20µm.



**Figura 16: Expressão de CRX em corpos embriões transfectados com genes de fotorreceptores.** CRX tem sua expressão aumentada nos EBs que foram transfectados com Crx, como esperado, e também nos transfectados com Otx2 e Nrl, e é expresso de maneira basal nos controles. A- células não transfectadas; B- células transfectadas com UF11-GFP; C- células transfectadas com UF11-Otx2; D- células transfectadas com UF11-Crx; E- células transfectadas com UF11-Nrl. As fotomicrografias foram feitas usando o mesmo tempo de exposição em todas as condições. Imagens representativas de 3 experimentos diferentes. Barras de calibração = 20 $\mu$ m.



**Figura 17: Expressão de NRL em corpos embriões transfectados com genes de diferenciação em fotorreceptores.** NRL é expresso de maneira basal nos EBs não transfectados e transfectados com GFP e tem sua expressão aumentada quando são transfectados com o próprio Nrl, assim como quando são transfectados com Otx2 e Crx. A- células não transfectadas; B- células transfectadas com UF11-GFP; C- células transfectadas com UF11-Otx2; D- células transfectadas com UF11-Crx; E- células transfectadas com UF11-Nrl. As fotomicrografias foram feitas usando o mesmo tempo de exposição em todas as condições. Imagens representativas de 3 experimentos diferentes. Barras de calibração = 20µm.



**Figura 18: Expressão dos fatores de transcrição OTX2, CRX e NRL em células-tronco transfectadas.** As fotomicrografias indicam que a superexpressão de cada um dos 3 genes tem efeito sobre a expressão dos outros dois. As setas apontam as células fortemente marcadas para os fatores indicados acima.

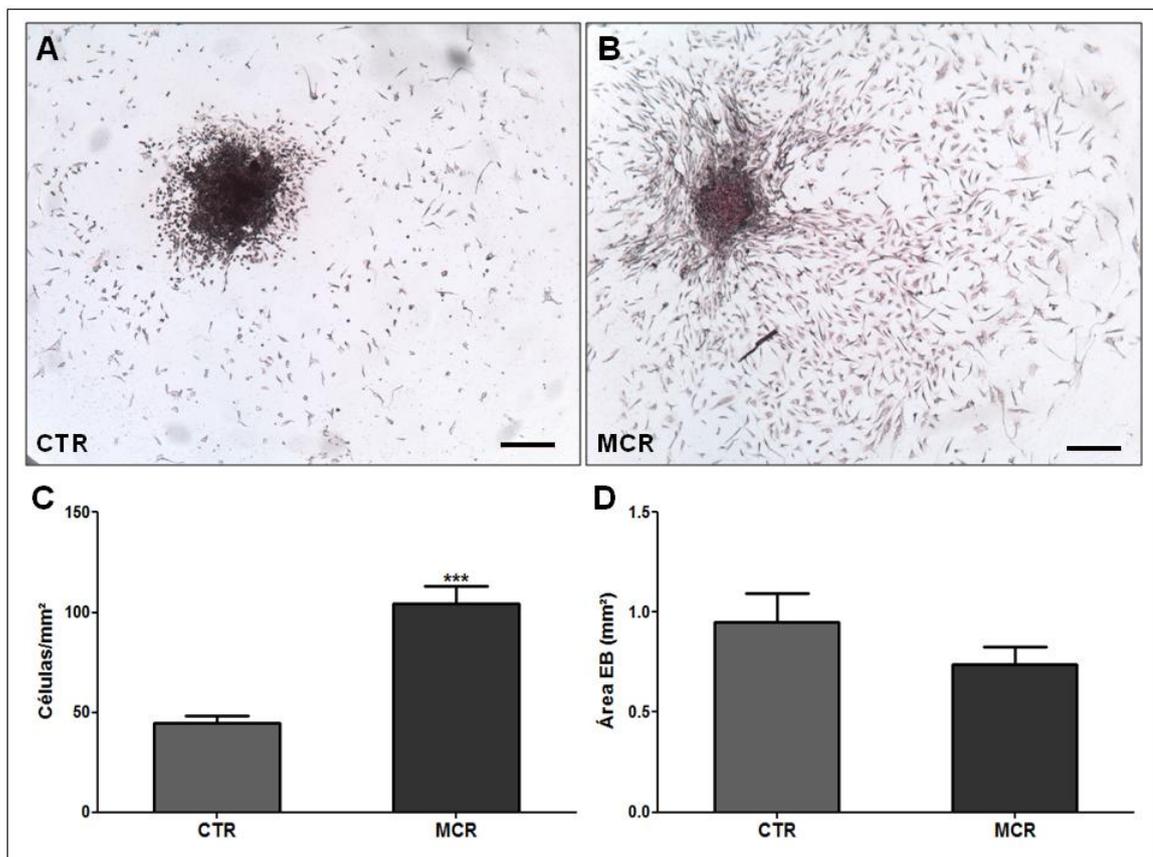
Imunomarcação Plasmídeos	OTX2	CRX	NRL
Controle – não transfectado	+	+	+
Transfecção UF11-GFP	+	+	+
Transfecção UF11-Otx2	+++	+++	+++
Transfecção UF11-Crx	+++	+++	+++
Transfecção UF11-Nrl	++	+++	+++

**Tabela 2: Comparação da expressão dos fatores de transcrição de fotorreceptores entre os grupos transfectados com os diferentes genes.** As colunas indicam as marcações feitas e as linhas correspondem às condições experimentais indicadas. Os sinais “+” representam a quantidade de marcação encontrada em cada grupo.

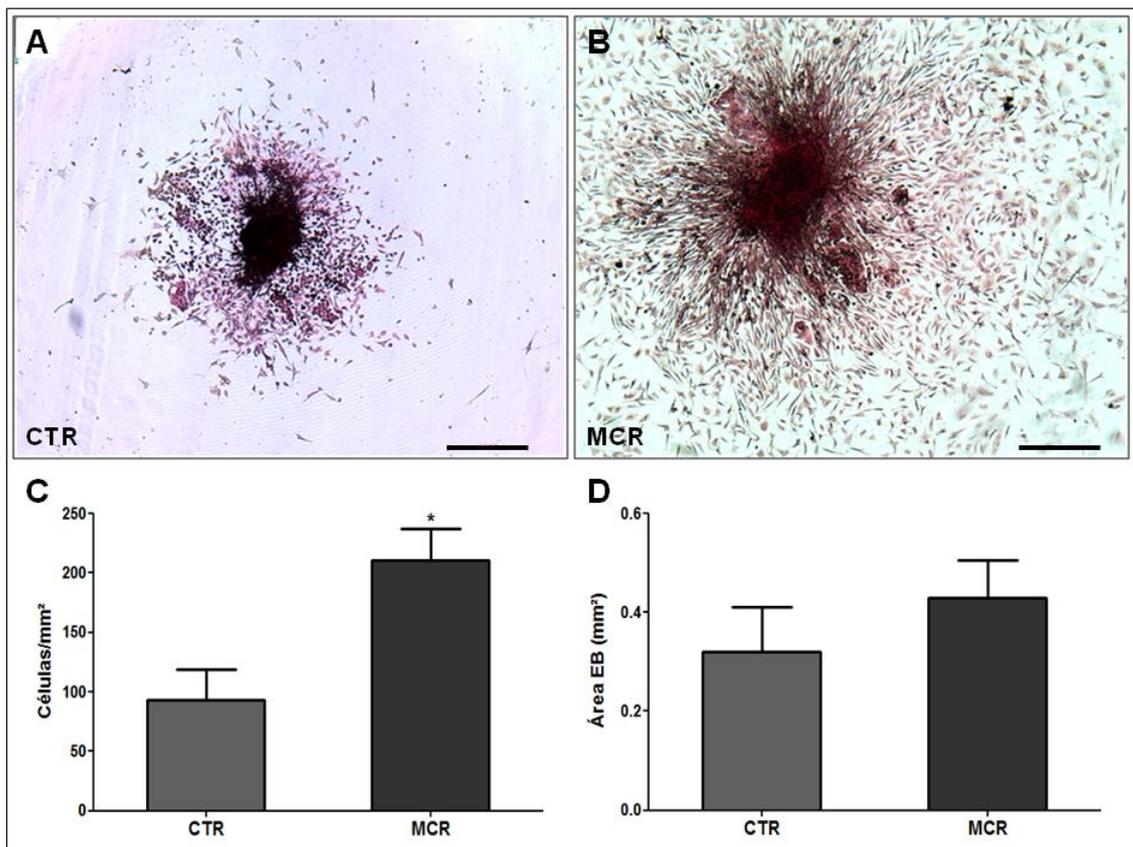
### **4.3 Efeito do meio condicionado de retina sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias murinas**

Sabendo que a retina secreta fatores solúveis importantes para a diferenciação e que a sinalização por esses fatores pode ser decisiva na determinação celular dos progenitores retinianos, decidimos analisar o efeito do meio condicionado de retina (MCR) sobre a migração e diferenciação de células-tronco embrionárias murinas. Para isso, induzimos a pré-diferenciação neural dessas células, através da formação de corpos embrióides e tratamento com ácido retinóico (Bibel *et al.*, 2004), plaqueamos os EBs sobre um substrato de laminina e fibronectina e os tratamos com meio de indução neural, utilizado como controle, ou meio condicionado de retina de ratos. Nessas condições, os EBs aderem e suas células migram para a placa de cultura, à medida que avançam em suas etapas de diferenciação. As células aderidas à placa são os progenitores neurais, que são identificadas pela expressão de alguns marcadores específicos, como nestina e Tuj1. Inicialmente, observamos que no tratamento com MCR mais células migravam para fora dos EBs após 5 dias de migração. Além disso, essas células apresentavam morfologia distinta, sendo mais alongadas que as células tratadas com meio controle, e dispersas de forma organizada na placa, sugerindo que estavam em processo de migração (Figuras 19A e B; 20A e B). A quantificação da migração foi feita através da contagem do número de células presentes em uma área fixa, a um diâmetro de distância da borda do EB quantificado. Os resultados de dois experimentos diferentes estão apresentados, e ambos indicam que pelo menos o dobro de células migra dos corpos embrióides tratados com meio condicionado, em relação aos tratados com o meio controle (Figuras 19C e 20C). Esse resultado poderia ser explicado por uma diferença no tamanho dos EBs plaqueados, já que

estes não são completamente homogêneos. Porém, quando analisamos as áreas dos EBs cujas células migrantes foram quantificadas, observamos uma variação inconsistente, sem diferenças significativas entre os grupos (Figuras 19D e 20D), sugerindo que essa não é a razão pela qual mais células migram quando do tratamento com meio condicionado de retina.



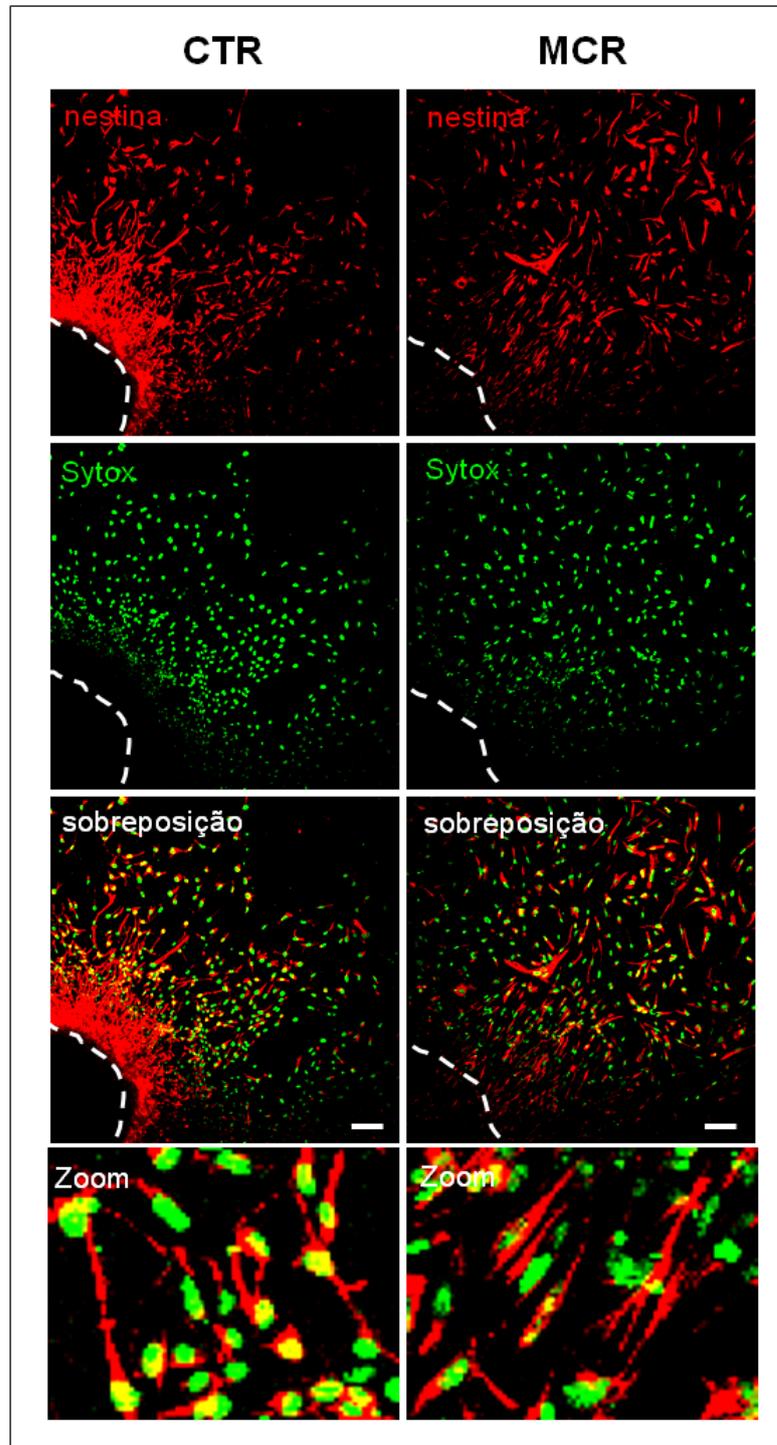
**Figura 19: Tratamento de células-tronco embrionárias com meio condicionado de retina.** A- foto representativa da migração dos EBs tratados com meio de indução neural (controle – CTR) ou B- meio condicionado de retina (MCR); C- quantificação do número de células que migraram a partir de EBs tratados ou não com MCR; D- Áreas dos EBs que migraram nas diferentes condições. Barras de calibração = 500μm. \*\*\*P<0,001. N=10.



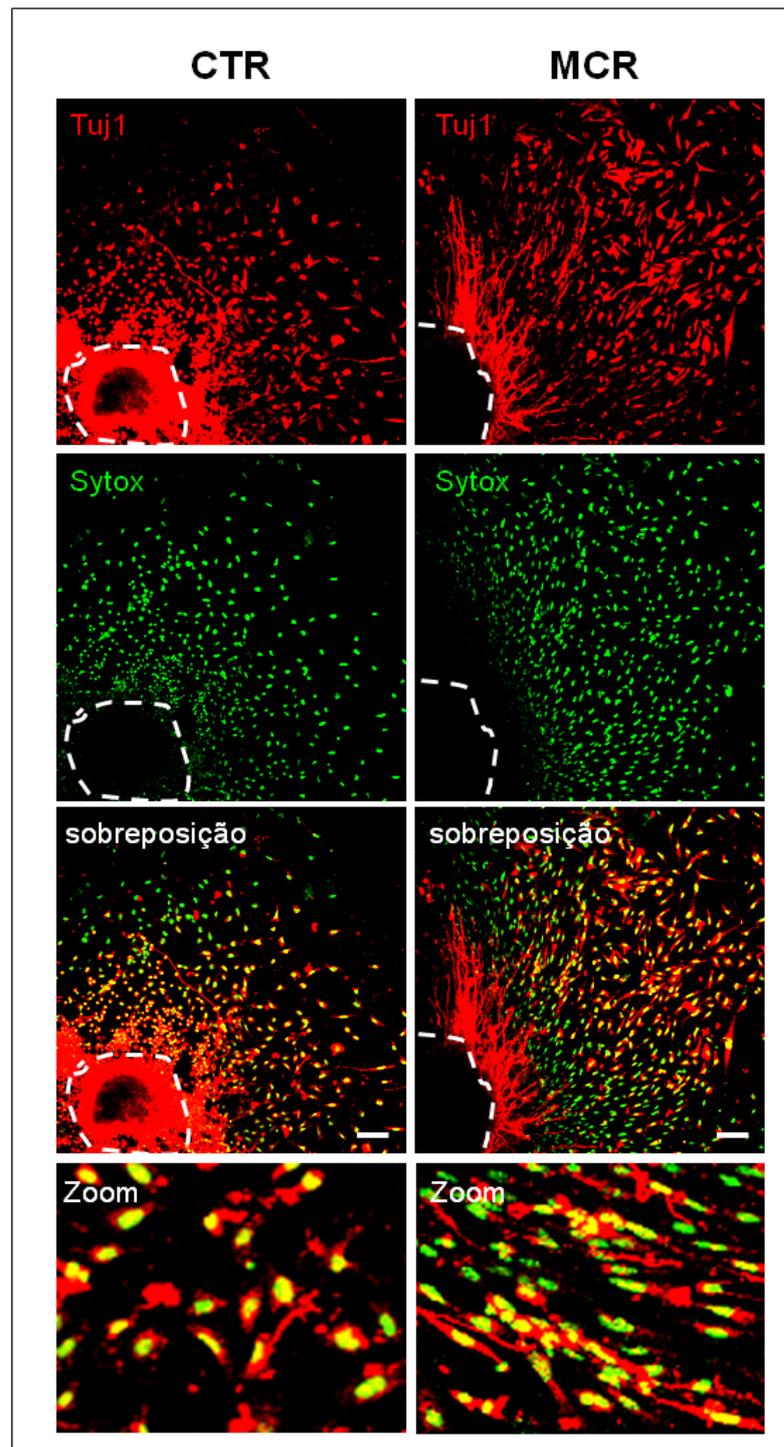
**Figura 20: Tratamento de células-tronco embrionárias com meio condicionado de retina.** A- foto representativa da migração dos EBs tratados com meio de indução neural (controle – CTR) ou B- meio condicionado de retina (MCR); C- quantificação do número de células que migraram a partir de EBs tratados ou não com MCR; D- Áreas dos EBs que migraram nas diferentes condições. Barras de calibração = 500µm. \*P<0,05; N=3.

Análises imunocitoquímicas mostraram que as células migrantes, tanto no controle quanto no tratamento com meio condicionado, expressam nestina (Figura 21), que é um marcador de progenitores neurais, e Tuj1 ( $\beta$ -III-tubulina – Figura 22), que é expresso em neurônios jovens. Com essas imagens podemos observar, mais uma vez, a diferença morfológica entre as células que migram na presença do meio controle ou do meio condicionado de retina. As células tratadas com meio condicionado são claramente mais alongadas e parecem seguir um padrão de organização, consistente com células em processo de migração, diferente das

células tratadas com meio controle, que apresentam morfologia mais arredondada, sem algum tipo de direcionamento.



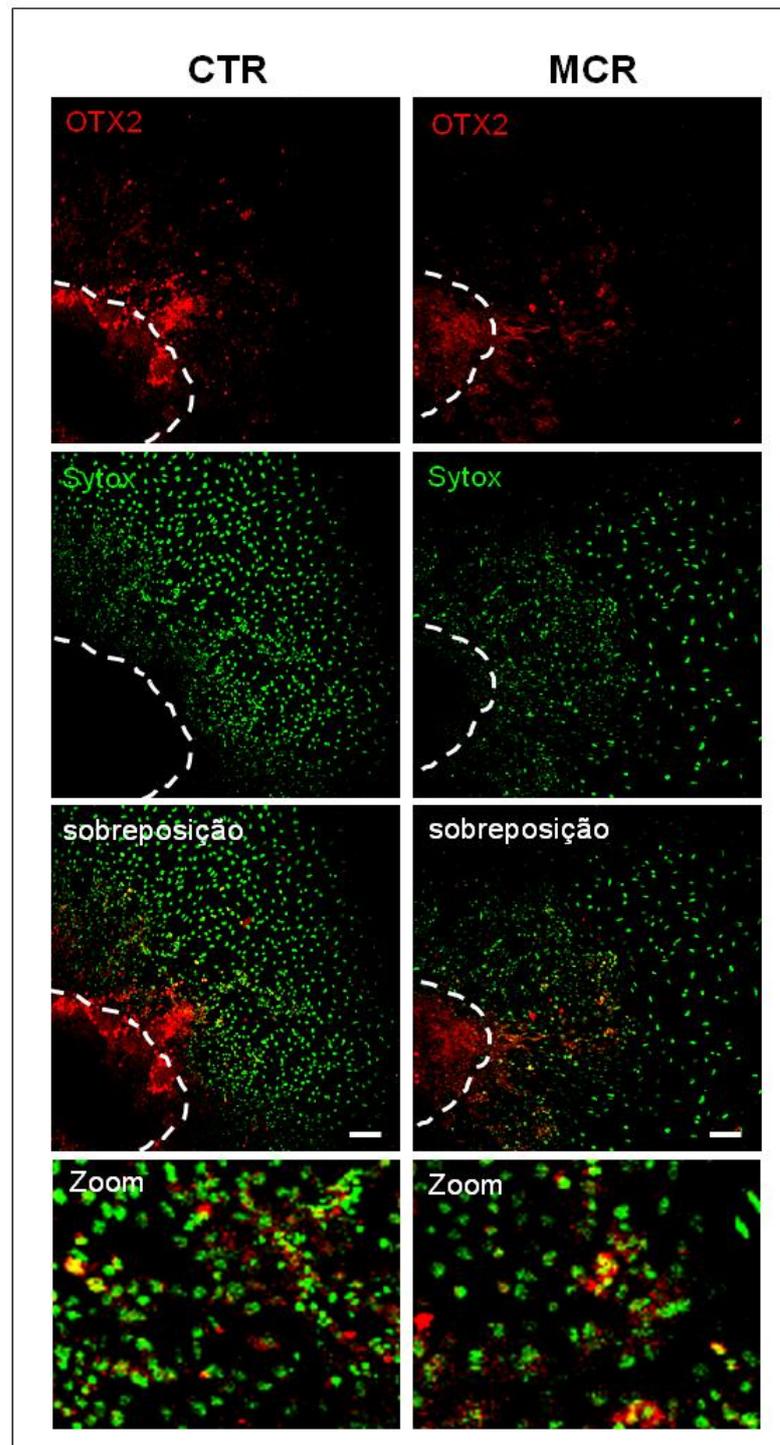
**Figura 21: Expressão de nestina nos corpos embrióides tratados ou não com meio condicionado de retina.** As células que migram a partir de EBs tratados com meio controle (esquerda) ou com meio condicionado de retina (direita) expressam nestina. Os núcleos foram marcados com Sytox Green. A linha tracejada indica a borda externa do EB. No painel inferior observamos imagens em maior aumento, evidenciando as células marcadas. Barras de calibração = 100 $\mu$ m.



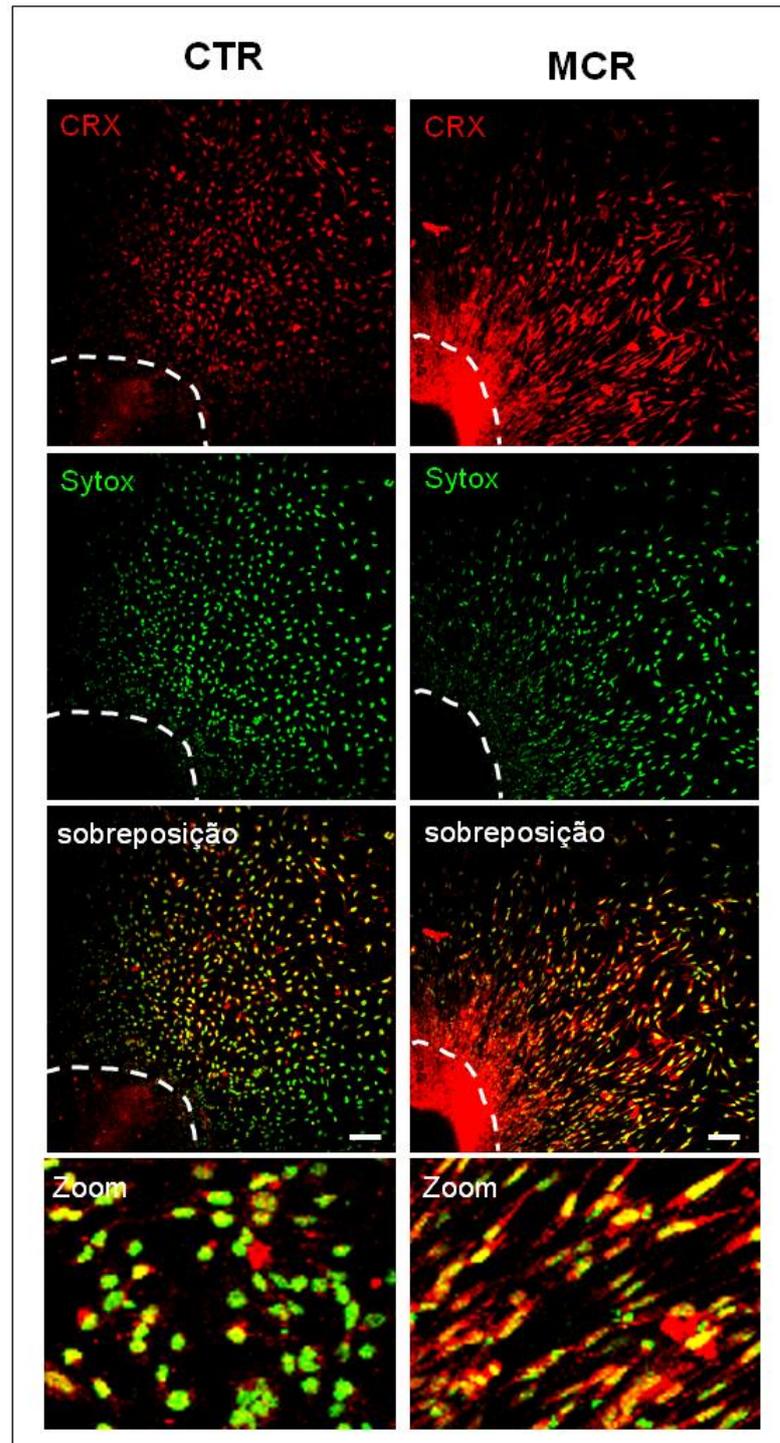
**Figura 22: Corpos embrióides tratados ou não com meio condicionado de retina expressam Tuj1.** As células que migram a partir de EBs tratados com meio controle (esquerda) ou com meio condicionado de retina (direita) são positivamente marcadas para Tuj1. Os núcleos foram marcados com Sytox Green. Note que as células tratadas com MCR apresentam morfologia fusiforme, sendo mais alongadas que no controle, como visto de maneira mais clara no painel inferior, em maior aumento, sugerindo que estão em processo de migração. A linha tracejada indica a borda externa do EB. Barras de calibração = 100µm.

Além desses dois marcadores neurais, também analisamos a expressão de OTX2, que surge em estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso e, particularmente, do olho. Algumas células migrantes marcam para essa molécula, mas a maior expressão é observada nas células concentradas nos agregados que não migraram. Não observamos diferenças na marcação de OTX2 entre os grupos tratados com meio controle ou MCR (Figura 23). Ao contrário, quando analisamos a marcação para CRX, que é expresso majoritariamente na retina, mais especificamente nos fotorreceptores, observamos uma marcação muito mais intensa no grupo tratado com meio condicionado, apesar de muitas células também marcarem para esse fator na condição controle (Figura 24). O mesmo padrão foi observado ao marcarmos as células com NRL. Nesse caso, a marcação foi mais discreta em relação ao CRX, mas, ainda assim, mais células expressaram NRL no grupo tratado com meio condicionado de retina (Figura 25). De maneira surpreendente, ao marcarmos as células com um anticorpo contra rodopsina, uma molécula extremamente específica, observamos marcação evidente e bastante semelhante entre os grupos, apesar de o grupo tratado com MCR ter marcação um pouco mais acentuada (Figura 26).

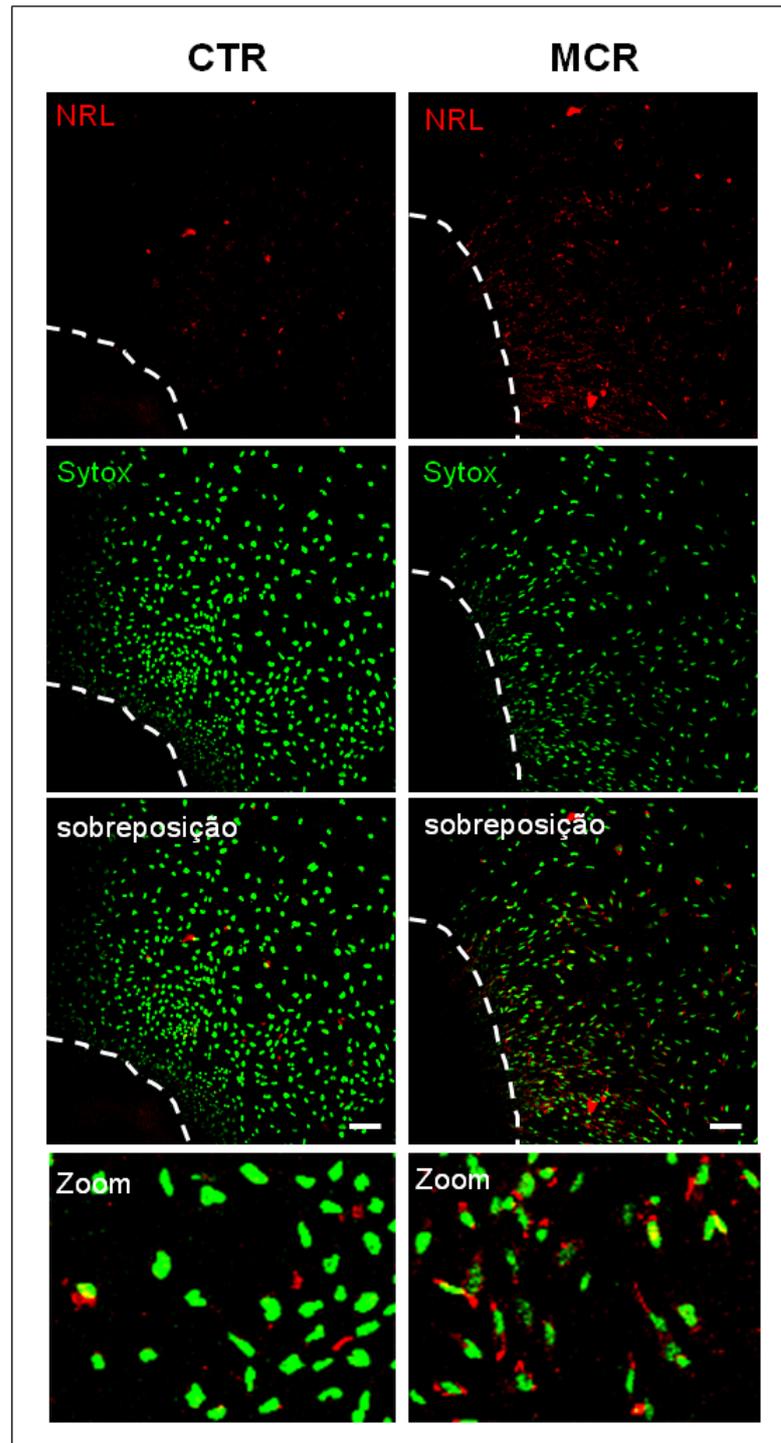
É interessante notar que a expressão desses marcadores parece mais forte nas células que estão mais próximas aos EBs tratados com meio condicionado de retina. Isso pode indicar que essas células, que ainda não migraram uma distância longa e provavelmente estão em uma etapa mais precoce da diferenciação, tem uma capacidade maior de responder aos estímulos e direcionar sua diferenciação na linha de fotorreceptores. Por outro lado, como essas imagens são confocais, uma análise mais específica e abrangente, através de reconstruções tridimensionais, será necessária para melhor analisar a distribuição das marcações.



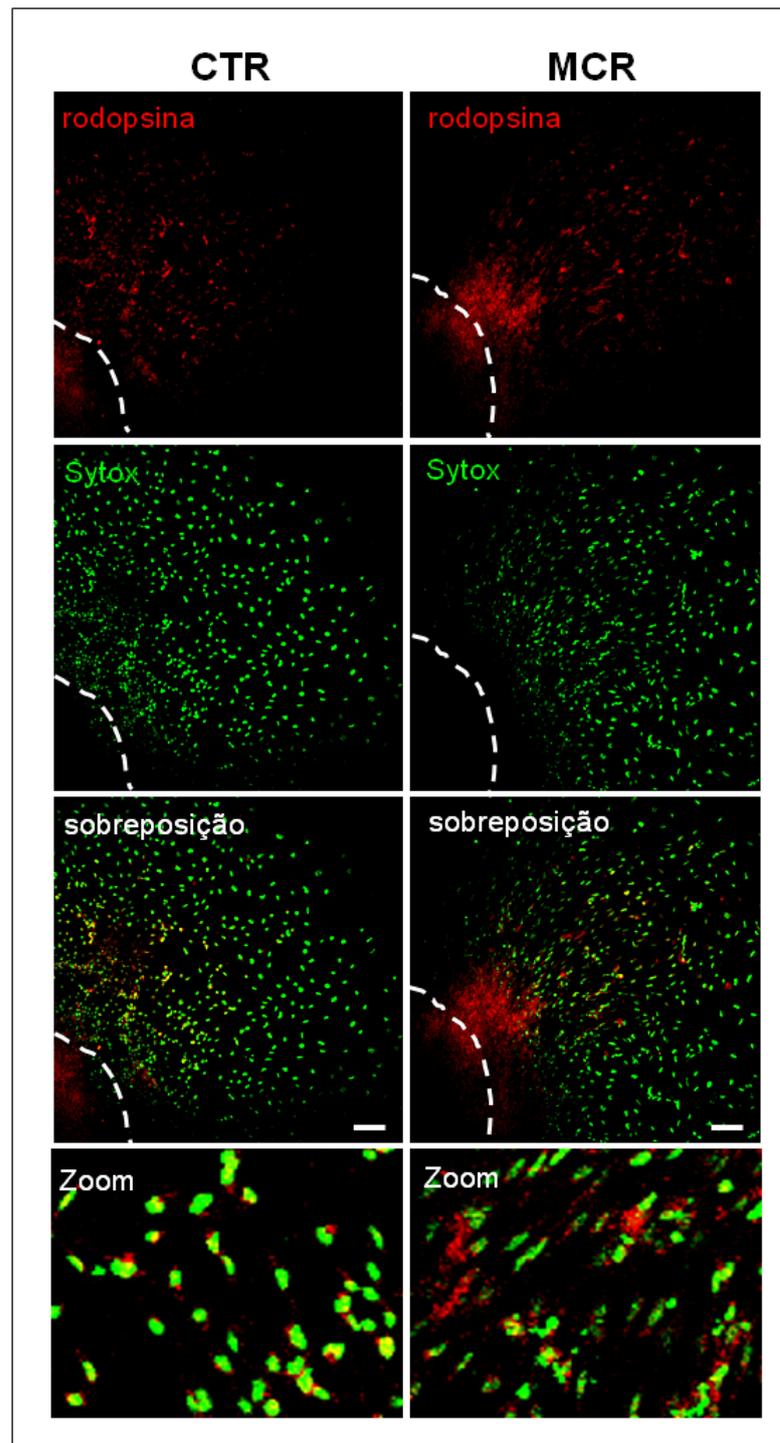
**Figura 23: OTX2 é expresso de maneira semelhante nos corpos embriões tratados ou não com meio condicionado de retina.** A maioria das células que expressam OTX2 está concentrada nos agregados celulares, tanto nos EBs tratados com meio controle (esquerda) quanto nos tratados com meio condicionado de retina (direita). Os núcleos foram marcados com Sytox Green. A linha tracejada indica a borda externa do EB. O painel inferior apresenta imagens em maior aumento. Barras de calibração = 100 $\mu$ m.



**Figura 24: A expressão de CRX é maior nos corpos embriões tratados com meio condicionado de retina.** A intensidade de marcação para CRX é muito mais evidente quando os EBs migram em presença de meio condicionado de retina (direita). Os núcleos foram marcados com Sytox Green. A linha tracejada indica a borda externa do EB. Note, nas fotos em maior aumento, que praticamente todas as células tratadas com MCR são positivas para CRX, diferente do controle. Barras de calibração = 100 $\mu$ m.



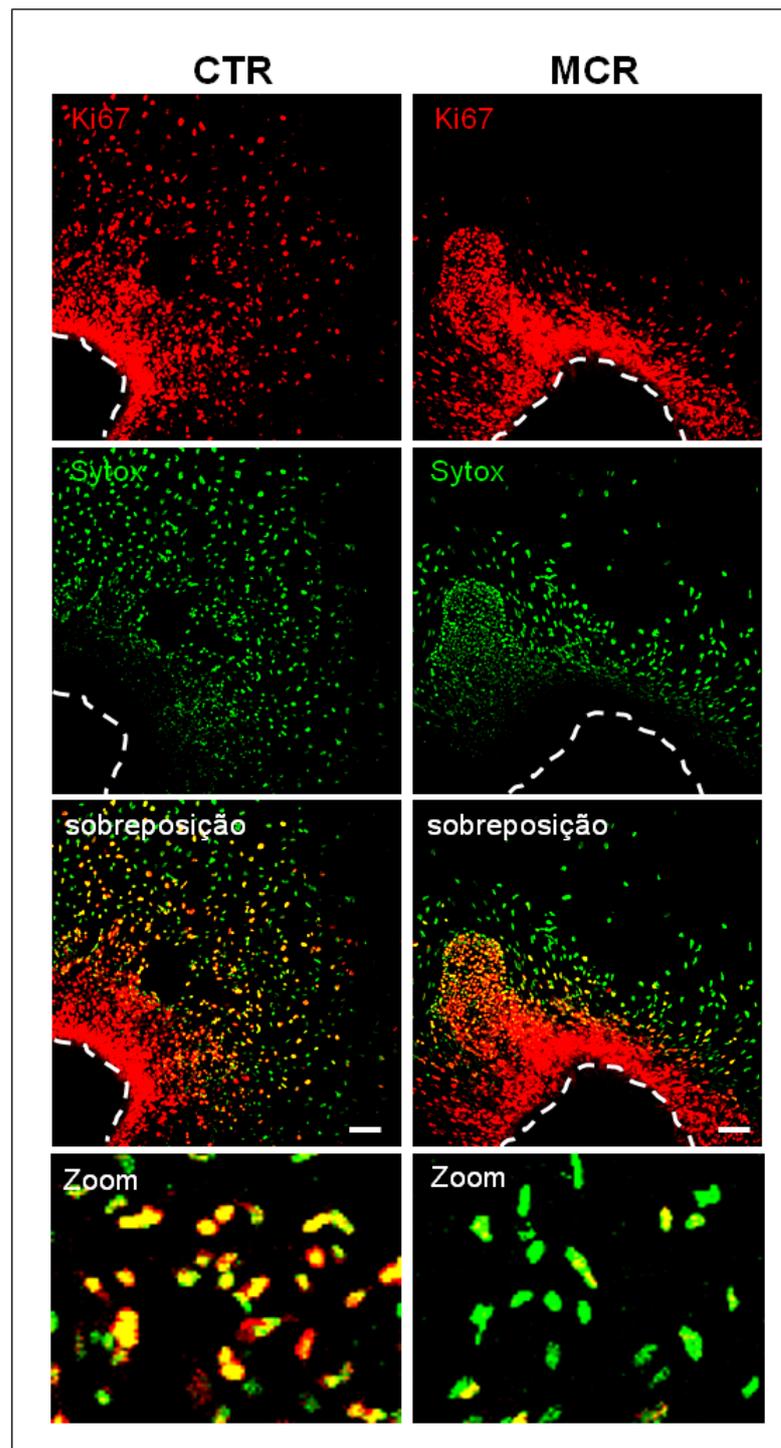
**Figura 25: O fator de transcrição NRL é expresso em mais células quando os corpos embriões são tratados com meio condicionado de retina.** Um número maior de células expressando NRL é observado nos EBs tratados com meio condicionado de retina (direita), quando comparado aos EBs tratados com meio controle (esquerda). Isso é mais evidente quando observamos as fotos em maior aumento (painel inferior). Os núcleos foram marcados com Sytox Green. A linha tracejada indica a borda externa do EB. Barras de calibração = 100 $\mu$ m.



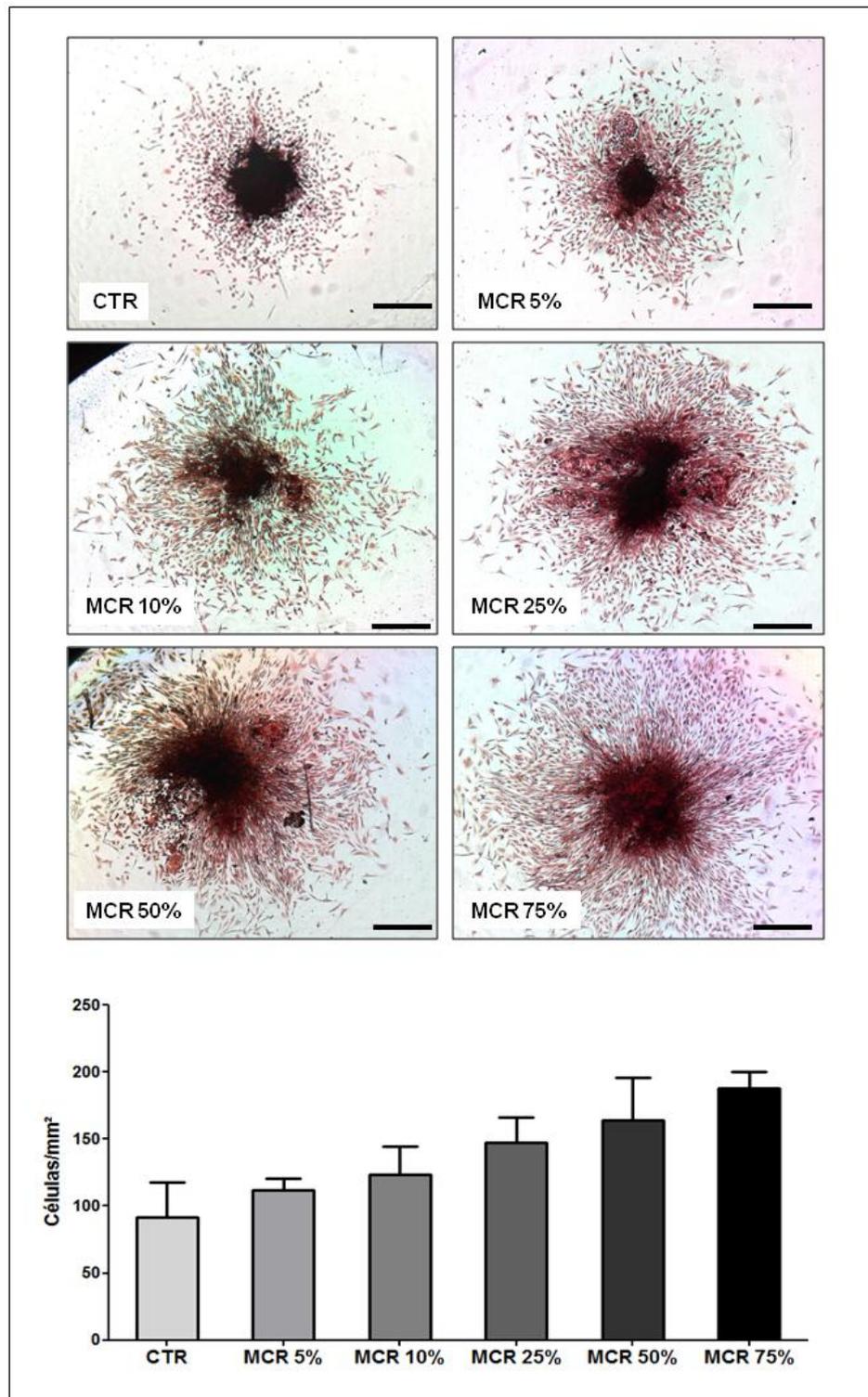
**Figura 26: A expressão de rodopsina é bastante parecida nas células tratadas ou não com meio condicionado de retina.** As células que migram a partir de EBs tratados com meio controle (esquerda) ou com meio condicionado de retina (direita) expressam rodopsina de maneira semelhante, apesar da marcação nas células tratadas com MCR parecer ligeiramente mais intensa, como observado no painel inferior, em maior aumento. Os núcleos foram marcados com Sytox Green. A linha tracejada indica a borda externa do EB. Barras de calibração = 100µm.

Ao analisarmos a expressão de Ki67, um marcador de proliferação, observamos um padrão bastante interessante. No grupo controle, mais células apresentam marcação para essa molécula; essa marcação é bem distribuída ao longo da placa e mesmo algumas células mais distantes do centro do EB estão positivamente marcadas (Figura 27). Já nas células tratadas com meio condicionado de retina, além do número menor de células marcadas, somente as células mais próximas ao EB são marcadas (Figura 27), indicando que o meio condicionado pode estar, de alguma forma, acelerando o processo de diferenciação dessas células.

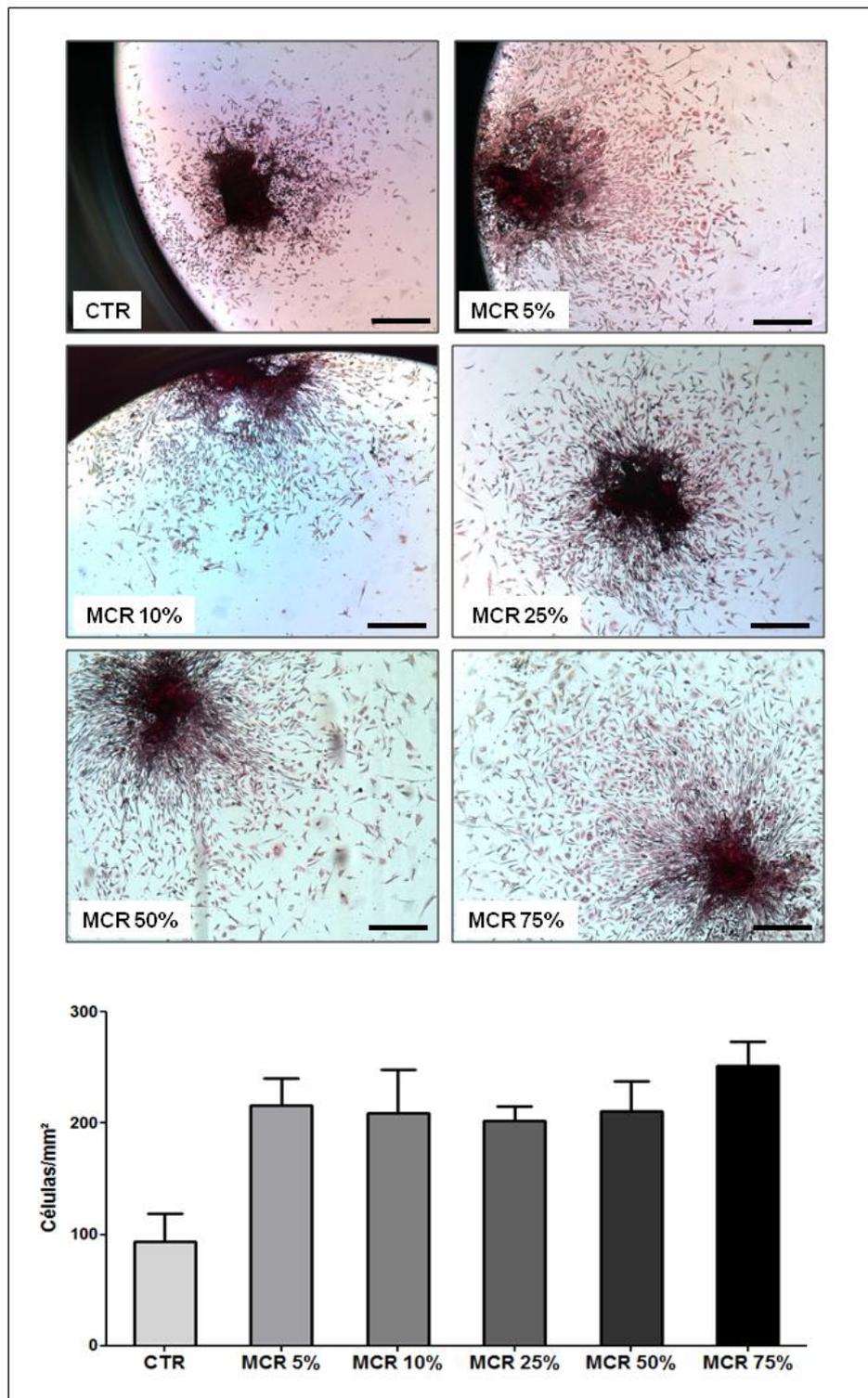
Tendo em vista esse efeito importante do meio condicionado de retina, que foi usado nos experimentos descritos acima a uma concentração de 50% durante 5 dias de migração, decidimos avaliar a resposta das células-tronco a diferentes concentrações do MCR e em diferentes períodos de tempo. Para isso, tratamos os corpos embrióides com meio controle ou meio condicionado de retina nas concentrações de 5%, 10%, 25%, 50% e 75%, durante 3 ou 5 dias. Os dados, ainda bastante preliminares, sugerem um efeito dependente de concentração durante a fase inicial, com 3 dias de migração (Figura 28); por outro lado, para um período de tempo mais longo, 5 dias, não foi observado efeito da diferença nas concentrações do MCR (Figura 29).



**Figura 27: O marcador de proliferação Ki67 é mais expresso nas células tratadas com meio controle.** Menos células expressam Ki67 nos EBs tratados com meio condicionado de retina (direita), além de somente as células mais próximas ao centro do EB serem marcadas nesse grupo. A linha tracejada indica a borda externa do EB. Repare nas fotos em maior aumento que a maioria das células tratadas com MCR perde sua marcação para Ki67, indicando que estão saindo do ciclo celular. Barras de calibração = 100 $\mu$ m.



**Figura 28: Efeito da concentração do meio condicionado de retina sobre a migração de células-tronco embrionárias.** As fotos apresentam a migração de 3 dias dos EBs tratados com meio de indução neural (controle – CTR) ou meio condicionado de retina (MCR) nas concentrações de 5%, 10%, 25%, 50% ou 75%, como indicado; no painel inferior, a quantificação do número de células que migraram a partir de EBs mantidos nas diferentes condições. Barras de calibração = 500μm.



**Figura 29:** Em 5 dias de migração, as diferentes concentrações do meio condicionado de retina apresentam efeito similar. As fotos apresentam a migração de 5 dias dos EBs tratados com meio de indução neural (controle – CTR) ou meio condicionado de retina (MCR) nas concentrações de 5%, 10%, 25%, 50% ou 75%, como indicado; no painel inferior, a quantificação do número de células que migraram a partir de EBs mantidos nas diferentes condições. Barras de calibração = 500 $\mu$ m.

## 5. Discussão

Atualmente, é grande a expectativa de desenvolvimento de terapias celulares utilizando células-tronco embrionárias. Apesar disso, os estudos com essas células são relativamente recentes - 28 anos para as células de camundongo e apenas 11 anos desde a descrição das primeiras linhagens de células-tronco embrionárias humanas (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998) – fazendo com que seu emprego para terapias em humanos seja controverso, já que muitas questões em relação à sua biologia e fisiologia ainda precisam ser elucidadas. Além do seu potencial terapêutico, a possibilidade de produzir eventualmente qualquer tipo celular de um organismo faz com que as células-tronco embrionárias sejam ótimas candidatas para testes de fármacos em larga escala, e excelentes modelos para estudos de desenvolvimento e diferenciação.

Ainda há poucos trabalhos na literatura que buscam a diferenciação de células-tronco embrionárias em fotorreceptores, e não há, até o momento, nenhuma evidência de formação de fotorreceptores funcionais a partir dessas células. No entanto, as perspectivas trazidas por alguns estudos nesse campo são animadoras. Por exemplo, um estudo inicial mostrou que progenitores neurais derivados de células-tronco embrionárias são capazes de expressar marcadores de retina, inclusive de fotorreceptores, como CRX, NRL e arrestina, quando colocados em co-cultura com células de retina (Zhao *et al.*, 2002). Mais tarde, outro grupo sugeriu uma combinação de fatores que seriam importantes para a geração de progenitores de fotorreceptores (Ikeda *et al.*, 2005). Nesse trabalho os autores usaram uma combinação de Dkk1 e Lefty A (inibidores da via de Wnt/ $\beta$ -catenina e nodal, respectivamente) para dar origem a progenitores de retina, que eram capazes de expressar rodopsina quando em co-cultura com células de retina embrionária. Além

disso, os autores superexpressaram *Crx* nesses progenitores e também observaram maior expressão de rodopsina 10 dias após a transdução gênica (Ikeda *et al.*, 2005).

Em nosso trabalho, observamos que a superexpressão de três fatores de transcrição importantes para a diferenciação na linhagem de fotorreceptores (*Otx2*, *Crx* e *Nrl*) são capazes de, mutuamente, regular suas expressões nas células-tronco embrionárias. É importante destacar que o plasmídeo utilizado nos nossos experimentos é de expressão transiente nas CTEs, tendo um pico de expressão em cerca de 24 horas após a transfecção, diminuindo depois ao longo do tempo, como observado pela expressão de GFP. Apesar disso, a expressão dos genes de fotorreceptores se mantém alta mesmo após 4 dias em cultura. De maneira interessante, a expressão de cada um dos genes resulta num aumento da expressão dos outros dois, sugerindo que a complexa maquinaria de regulação desses genes foi ativada nas células transfectadas, reforçando a idéia de que as células-tronco embrionárias têm o potencial de diferenciação em fotorreceptores. Essa observação era esperada no caso da superexpressão de *Otx2*, já que este é um gene homeobox, responsável pela indução de expressão de *Crx* e que pode também ativar seus alvos, incluindo *Nrl* (Nishida *et al.*, 2003; Peng e Chen, 2005). Também era esperado um aumento na expressão de NRL nas células transfectadas com *Crx*, já que é um alvo conhecido desse gene (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997). Por outro lado, foi surpreendente a ação de CRX e NRL na indução de *Otx2*, pois os relatos da literatura indicam que CRX inibe a expressão de *Otx2*, como observado durante o desenvolvimento, quando um aumento na expressão de *Crx* está relacionado a uma diminuição da expressão de *Otx2* (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 2003). Além disso, Hennig e colaboradores demonstraram que em camundongos *knockout* para *Crx* há um aumento na

expressão de *Otx2* (Hennig *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, o grupo mostrou que cada um desses três fatores de transcrição é capaz de se ligar em sua própria e na região promotora dos outros dois genes utilizados neste trabalho, além de outros genes específicos de fotorreceptores (Hennig *et al.*, 2008). Dessa forma, é possível que haja regulação positiva entre suas expressões, como observamos aqui, e o aumento em *Otx2* observado nos animais deficientes para *Crx* seja um mecanismo de compensação, mais do que a ausência de um efeito inibitório desse gene. Além disso, não há como prever os mecanismos que regulam a expressão desses fatores em células-tronco embrionárias, já que nenhum trabalho até hoje analisou os efeitos da superexpressão desses genes nessas células. Talvez essa resposta de indução mútua corresponda simplesmente a uma característica peculiar das CTEs, por expressarem uma gama de moléculas diferentes das encontradas nos progenitores retinianos que dão origem aos fotorreceptores durante o desenvolvimento normal.

Apesar do aumento obtido na expressão dos três genes de fotorreceptores, no tempo em que mantivemos as células em cultura (4 dias após a transdução gênica) não observamos qualquer diferença ou aumento na expressão de rodopsina e outros marcadores de fotorreceptores maduros. Talvez um tempo maior seja necessário para que a célula inicie a expressão de moléculas mais tardias, como ocorre durante o desenvolvimento, e somente a superexpressão de genes regulatórios não seja suficiente para acelerar esse processo. Seria interessante observar as células transfectadas durante períodos mais longos, além de combinar a expressão dos fatores, seguindo o programa temporal que ocorre no desenvolvimento normal. Também é fundamental que as células transfectadas encontrem um ambiente propício para sua completa diferenciação. Nesse sentido,

fazer injeções intraoculares e observar a capacidade de migração, integração e diferenciação das células no tecido retiniano será um passo importante.

Em um trabalho com células-tronco embrionárias humanas, Lamba e colaboradores, novamente usando uma combinação de fatores (noggin, Dkk1 e IGF-1), conseguiram desenvolver um protocolo capaz de aumentar a expressão de genes marcadores de progenitores de retina em cultura, incluindo de fotorreceptores, como CRX, rodopsina, opsina S e recoverina; e essas células foram capazes de se integrar em retinas de camundongos com degeneração de fotorreceptores (Lamba *et al.*, 2006). O grupo não apresentou dados quanto ao estado proliferativo das células, um fator importante a ser considerado quando pensamos em terapias celulares. Mais recentemente, em 2008, Osakada e colaboradores conseguiram estabelecer um protocolo mais eficiente de geração de células que expressavam marcadores de fotorreceptores, através de indução com Dkk1 e LeftyA, seguido de seleção da população Rx<sup>+</sup> por *cell sorting* e posterior tratamento com um inibidor da  $\gamma$ -secretase (Osakada *et al.*, 2008).

Na tentativa de buscar um ambiente mais favorável e diferente desses grupos, que usaram fatores externos para modular vias de sinalização, nós tentamos induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias murinas na linha de fotorreceptores através do uso de meio condicionado de retina, esperando que os fatores solúveis secretados pelo próprio tecido pudessem compor um ambiente favorável à diferenciação das células. Para isso nos baseamos em alguns protocolos de diferenciação dopaminérgica que envolvem o uso de meio condicionado de uma linhagem celular derivada de medula óssea (PA6), com resultados bastante satisfatórios (Takagi *et al.*, 2005; Parmar e Li, 2007; Hayashi *et al.*, 2008). O protocolo de migração escolhido para este trabalho é comumente usado, com

algumas alterações, para extrair progenitores neurais, que correspondem às células que saem dos corpos embrióides e migram em direção à placa, e são geralmente submetidos a outras etapas de diferenciação (Lee *et al.*, 2000; Bibel *et al.*, 2004; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2007).

Nossos dados indicam que o tratamento com meio condicionado de retina aumenta em aproximadamente 2,5 vezes a migração dos precursores neurais, uma etapa fundamental no processo de diferenciação normal, além de acelerar a diferenciação das células na linha de um fenótipo compatível com o de fotorreceptores, como demonstrado pelo aumento na expressão de CRX e NRL, e diminuição na marcação para Ki67. Esse é um resultado importante, que indica que este protocolo é potencialmente interessante para estudos futuros de terapias celulares, pois um dos grandes desafios atuais neste campo é o controle da proliferação das células transplantadas, que podem gerar teratomas ou outros tumores quando sua proliferação é descontrolada (Arnhold *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, resultados não publicados).

A baixa expressão de OTX2 observada nos experimentos, mesmo no tratamento com meio condicionado de retina, onde observamos aumento de CRX e NRL, pode indicar que as células estão em uma etapa mais avançada da diferenciação, como ocorre no desenvolvimento normal (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 2003). Esse dado também é consistente com o observado por Lamba e colaboradores, que não observam aumento na expressão de *Otx2* durante seu protocolo de diferenciação (Lamba *et al.*, 2006).

Não observamos, nesses experimentos, uma diferença importante na marcação para rodopsina, o que pode estar relacionado, novamente, com o tempo necessário para que as células comecem a expressar essa proteína, já que a cultura

foi mantida em presença de MCR por apenas 4 dias, no máximo. Além do efeito sobre a diferenciação e diminuição da proliferação, nosso protocolo com meio condicionado, como mencionado anteriormente, induz uma maior migração das células a partir dos corpos embrióides, o que significa dizer que o MCR aumenta a quantidade de progenitores neurais que saem dos EBs, já que a maioria das células aderidas à placa marca positivamente para nestina e Tuj-1. Esse efeito é extremamente interessante, pois as células geradas com esse protocolo podem ser usadas em etapas posteriores de diferenciação, indicando que este pode ser um bom método para indução também de outros tipos neuronais. Porém, neste trabalho não avaliamos a expressão de outros marcadores específicos.

A combinação de terapias gênica e celular ainda é pouco explorada, principalmente em relação à retina. Um trabalho bastante recente desenvolveu uma estratégia interessante utilizando células embrionárias moduladas para superexpressar o fator neurotrófico derivado de glia (GDNF). A idéia do trabalho não era fazer reposição celular mas sim preservar as células ainda presentes na retina, em um modelo de degeneração. As células liberando GDNF foram efetivas e prolongaram a sobrevivência dos fotorreceptores (Gregory-Evans *et al.*, 2009). Porém, o grupo encontrou regiões hiperplásicas, que poderiam corresponder a um crescimento excessivo das células transplantadas, reforçando a idéia de que é necessário um controle extremamente cuidadoso em relação ao estado proliferativo dessas células. Nesse contexto, a combinação dos modelos experimentais apresentados nesta dissertação, ou seja, a integração entre modulação gênica e sinalização por fatores extrínsecos, pode ser uma ferramenta extremamente interessante para estudos mais completos de diferenciação.

Os modelos propostos neste trabalho visam estabelecer um protocolo eficiente e seguro de diferenciação em fotorreceptores a partir de células-tronco embrionárias, para futuros testes de terapia celular para retinopatias como a retinose pigmentar, além de poder contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela determinação do fenótipo fotorreceptor.

Com os protocolos desenvolvidos por nosso grupo, a possibilidade de, no futuro, combinar a modulação gênica com a sinalização pelos fatores presentes no microambiente retiniano traz grandes perspectivas em relação à diferenciação de células-tronco embrionárias em fotorreceptores funcionais ou, pelo menos, em células capazes de se integrarem aos circuitos neurais da retina e serem responsivas à luz.

## 6. Conclusões

Com os resultados aqui apresentados, podemos concluir que:

- Construimos e produzimos, com sucesso, os 3 diferentes plasmídeos de expressão em eucariotos contendo os genes de diferenciação em fotorreceptores propostos;

- Conseguimos estabelecer um protocolo para a transdução gênica em células tronco-embrionárias murinas;

- A transfecção com o plasmídeo UF11-Otx2 é capaz de aumentar a expressão do próprio OTX2, além de CRX e NRL;

- A transfecção com o plasmídeo UF11-Crx é capaz de aumentar a expressão do próprio CRX, além de OTX2 e NRL

- A transfecção com o plasmídeo UF11-Nrl é capaz de aumentar a expressão do próprio NRL, além de CRX e, de maneira mais discreta, OTX2;

- O tratamento com meio condicionado de retina induz a migração de progenitores neurais derivados de células-tronco embrionárias murinas;

- O meio condicionado de retina é capaz de acelerar o processo de diferenciação das CTEs na linha de fotorreceptores, aumentando a expressão de CRX e NRL, além de diminuir a proliferação de progenitores neurais derivados de células-tronco embrionárias murinas, acessada pela marcação para Ki67.

## 7. Referências Bibliográficas

- ACAMPORA, D., MAZAN, S., LALLEMAND, Y., AVANTAGGIATO, V., MAURY, M., SIMEONE, A., BRÛLET, P. (1995). **Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation.** *Development* 121(10):3279-90
- ADLER, R. (1993). **Determination of cellular types in the retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34(5):1677-82.
- ADLER, R., RAYMOND, P.A. (2008). **Have we achieved a unified model of photoreceptor cell fate specification in vertebrates?** *Brain Res.* 1192:134-50
- AHMAD, I., REDMOND, L.J., BARNSTABLE, C.J. (1990). **Developmental and tissue-specific expression of the rod photoreceptor cGMP-gated ion channel gene.** *Biochem Biophys Res Commun.* 173(1):463-70.
- AKAGI, T., HARUTA, M., AKITA, J., NISHIDA, A., HONDA, Y., TAKAHASHI, M. (2003). **Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods.** *Neurosci Lett.* 341(3):213-6.
- AKAGI, T., MANDAI, M., OOTO, S., HIRAMI, Y., OSAKADA, F., KAGEYAMA, R., YOSHIMURA, N., TAKAHASHI, M. (2004). ***Otx2* homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(12):4570-5.
- AKIMOTO, M., CHENG, H., ZHU, D., BRZEZINSKI, J.A., KHANNA, R., FILIPPOVA, E., OH, E.C., JING, Y., LINARES, J.L., BROOKS, M., ZAREPARSI, S., MEARS, A.J., HERO, A., GLASER, T., SWAROOP, A. (2006). **Targeting of GFP to newborn rods by *Nrl* promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(10):3890-5.
- AKIMOTO, M., MIYATAKE, S., KOGISHI, J., HANGAI, M., OKAZAKI, K., TAKAHASHI, J.C., SAIKI, M., IWAKI, M., HONDA, Y. (1999). **Adenovirally expressed basic fibroblast growth factor rescues photoreceptor cells in RCS rats.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(2):273-9.
- ALEXIADES, M.R., CEPKO, C.L. (1996). **Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of rat retina.** *Dev. Dyn.* 205: 293-307.
- ALI, R.R., SARRA, G.M., STEPHENS, C., ALWIS, M.D., BAINBRIDGE, J.W., MUNRO, P.M., FAUSER, S., REICHEL, M.B., KINNON, C., HUNT, D.M., BHATTACHARYA, S.S., THRASHER, A.J. (2000). **Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy.** *Nat Genet.* 25(3):306-10.
- ANG, S.L., JIN, O., RHINN, M., DAIGLE, N., STEVENSON, L., ROSSANT, J. (1996). **A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain.** *Development* 122(1):243-52.

- ARNHOLD, S., KLEIN, H., SEMKOVA, I., ADDICKS, K., SCHRAERMAYER, U. (2004). **Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(12):4251-5.
- BANIN, E., OBOLENSKY, A., IDELSON, M., HEMO, I., REINHARDTZ, E., PIKARSKY, E., BEN-HUR, T., REUBINOFF, B. (2006). **Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells.** Stem Cells. 24(2):246-57.
- BAYLOR, D. (1996). **How photons start vision.** Proc Natl Acad Sci USA. 93: 560-565.
- BELLIVEAU, M.J., CEPKO, C.L. (1999). **Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina.** Development 126: 555-566
- BEN-HUR, T., IDELSON, M., KHANER, H., PERA, M., REINHARTZ, E., ITZIK, A., REUBINOFF, B.E. (2004). **Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats.** Stem Cells. 22(7):1246-55.
- BENNETT, J., TANABE, T., SUN, D., ZENG, Y., KJELDBYE, H., GOURAS, P., MAGUIRE, A.M. (1996). **Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy.** Nat Med. 2(6):649-54.
- BERSON, E.L. (1993). **Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 34(5):1659-76.
- BERSON, E.L. (1996). **Retinitis pigmentosa: Unfolding its mystery.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4526-4528.
- BESSANT, D.A., PAYNE, A.M., MITTON, K.P., WANG, Q.L., SWAIN, P.K., PLANT, C., BIRD, A.C., ZACK, D.J., SWAROOP, A., BHATTACHARYA, S.S. (1999). **A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** Nat Genet. 21(4):355-6.
- BIBEL, M., RICHTER, J., SCHRENK, K., TUCKER, K.L., STAIGER, V., KORTE, M., GOETZ, M., BARDE, Y.A. (2004). **Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage.** Nat Neurosci.;7(9):1003-9.
- BOBOLA, N., BRIATA, P., ILENGO, C., ROSATTO, N., CRAFT, C., CORTE, G., RAVAZZOLO, R. (1999). **OTX2 homeodomain protein binds a DNA element necessary for interphotoreceptor retinoid binding protein gene expression.** Mech Dev.82(1-2):165-9.
- BUHR N, CARAPITO C, SCHAEFFER C, HOVASSE A, VAN DORSSELAER A, VIVILLE S. (2007). **Proteome analysis of the culture environment supporting undifferentiated mouse embryonic stem and germ cell growth.** Electrophoresis 28:1615–23.
- CEPKO, C. (1993). **Lineage versus environment in the embryonic retina.** Trends Neurosci. 16(3): 96-7.
- CEPKO, C.L., AUSTIN,C.P., YANG,X., ALEXIADES, M., EZZEDDINE, D. (1996). **Cell fate determination in the vertebrate retina.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 589-595

- CHACKO, D.M., ROGERS, J.A., TURNER, J.E., AHMAD, I. (2000). **Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat.** *Biochem Biophys Res Commun.* 268(3):842-6.
- CHEN, S., WANG, Q.L., NIE, Z., SUN, H., LENNON, G., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., ZACK, D.J. (1997). **Crx, a novel otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes.** *Neuron* 19: 1017–1030.
- CHENG, H., ALEMAN, T.S., CIDECIYAN, A.V., KHANNA, R., JACOBSON, S.G., SWAROOP, A. (2006). **In vivo function of the orphan nuclear receptor NR2E3 in establishing photoreceptor identity during mammalian retinal development.** *Hum Mol Genet.* 15(17):2588-602.
- COLES, B.L., ANGÉNIEUX, B., INOUE, T., DEL RIO-TSONIS, K., SPENCE, J.R., MCINNES, R.R., ARSENIJEVIC, Y., VAN DER KOOY, D. (2004). **Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(44):15772-7.
- CONLEY, B.J., DENHAM, M., GULLUYAN, L., OLSSON, F., COLE, T.J., MOLLARD, R. (2005). **Mouse embryonic stem cell derivation, and mouse and human embryonic stem cell culture and differentiation as embryoid bodies.** *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 23: Unit 23.2.
- DANIELE, L.L., LILLO, C., LYUBARSKY, A.L., NIKONOV, S.S., PHILP, N., MEARS, A.J., SWAROOP, A., WILLIAMS, D.S., PUGH, E.N.JR. (2005). **Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(6):2156-67.
- DEN HOLLANDER, A.I., ROEPMAN, R., KOENEKOOP, R.K., CREMERS, F.P. (2008). **Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms.** *Prog Retin Eye Res.* 27(4):391-419.
- DESBAILLETS, I., ZIEGLER, U., GROSCURTH, P., GASSMANN, M. (2000). **Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis.** *Exp Physiol.* 85(6):645-51.
- DIETERLEN, M.T., WEGNER, F., SCHWARZ, S.C., MILOSEVIC, J., SCHNEIDER, B., BUSCH, M., RÖMUSS, U., BRANDT, A., STORCH, A., SCHWARZ, J. (2009). **Non-viral gene transfer by nucleofection allows stable gene expression in human neural progenitor cells.** *J Neurosci Methods.* 178(1):15-23.
- DONOVAN, S.L., DYER, M.A. (2005). **Regulation of proliferation during central nervous system development.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 16(3): 407-21.
- DRYJA, T.P. (1992). **Doyle Lecture. Rhodopsin and autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Eye* 6(1):1-10.
- EBREY, T., KOUTALOS, Y. (2001). **Vertebrate Photoreceptors.** *Prog Retin Eye Res.* 20(1):49-94.
- ENZMANN, V., YOLCU, E., KAPLAN, H.J., ILDSTAD, S.T. (2009). **Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration.** *Arch Ophthalmol.* 127(4):563-71.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. (1981). **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature* 292(5819): 154-6.

- FARRAR, G.J., KENNA, P.F., HUMPHRIES, P. (2002). **On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention.** EMBO J. 21(5):857-64.
- FEKETE, D.M., PEREZ-MIGUELSANZ, J., RYDER, E.F., CEPKO, C.L. (1994). **Clonal analysis in the chicken retina reveals tangential dispersion of clonally related cells.** Dev Biol. 166(2):666-82.
- FREUND, C.L., GREGORY-EVANS, C.Y., FURUKAWA, T., PAPAIOANNOU, M., LOOSER, J., PLODER, L., BELLINGHAM, J., NG, D., HERBRICK, J.A., DUNCAN, A., SCHERER, S.W., TSUI, L.C., LOUTRADIS-ANAGNOSTOU, A., JACOBSON, S.G., CEPKO, C.L., BHATTACHARYA, S.S., MCINNES, R.R. (1997). **Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor.** Cell 91(4):543-53.
- FU, Y., YAU, K.W. (2007). **Phototransduction in mouse rods and cones.** Pflugers Arch. 454:805–819.
- FURUKAWA, T., MORROW, E.M., CEPKO, C.L. (1997). **Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation.** Cell 91: 531–541.
- FURUKAWA, T., MORROW, E.M., LI, T., DAVIS, F.C., CEPKO, C.L. (1999). **Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice.** Nat Genet. 23(4):466-70.
- GAILLARD, F., SAUVÉ, Y. (2007). **Cell-based therapy for retina degeneration: the promise of a cure.** Vision Res. 47(22):2815-24.
- GAMM, D.M., WANG, S., LU, B., GIRMAN, S., HOLMES, T., BISCHOFF, N., SHEARER, R.L., SAUVÉ, Y., CAPOWSKI, E., SVENDSEN, C.N., LUND, R.D. (2007). **Protection of visual functions by human neural progenitors in a rat model of retinal disease.** PLoS ONE. 2(3):e338.
- GREGORY-EVANS, K., CHANG, F., HODGES, M.D., GREGORY-EVANS, C.Y. (2009). **Ex vivo gene therapy using intravitreal injection of GDNF-secreting mouse embryonic stem cells in a rat model of retinal degeneration.** Mol Vis. 15:962-73.
- HALL, C.M., KICIC, A., LAI, C.M., RAKOCZY, P.E. (2006). **Using stem cells to repair the degenerate retina. Stem cells in the context of retinal degenerations.** Adv Exp Med Biol. 572:381-8.
- HAMEL, C.P. (2007). **Cone rod dystrophies.** Orphanet J Rare Dis. 2:7.
- HARA, A., NIWA, M., KUNISADA, T., YOSHIMURA, N., KATAYAMA, M., KOZAWA, O., MORI, H. (2004). **Embryonic stem cells are capable of generating a neuronal network in the adult mouse retina.** Brain Res. 999(2):216-21.
- HARUTA, M., SASAI, Y., KAWASAKI, H., AMEMIYA, K., OOTO, S., KITADA, M., SUEMORI, H., NAKATSUJI, N., IDE, C., HONDA, Y., TAKAHASHI, M. (2004). **In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(3):1020-5.

- HAYASHI, H., MORIZANE, A., KOYANAGI, M., ONO, Y., SASAI, Y., HASHIMOTO, N., TAKAHASHI, J. (2008). **Meningeal cells induce dopaminergic neurons from embryonic stem cells.** *Eur J Neurosci.* 27(2):261-8.
- HENNIG, A.K., PENG, G.H., CHEN, S. (2008). **Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network.** *Brain Res.* 1192:114-33.
- HICKS, D., BARNSTABLE, C.J. (1987). **Different rhodopsin monoclonal antibodies reveal different binding patterns on developing and adult rat retina.** *J Histochem Cytochem.* 35(11):1317-28.
- HOLT, C.E., BERTSCH, T.W., ELLIS, H.M., HARRIS, W.A. (1988). **Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date.** *Neuron* 1(1):15-26.
- IKEDA, H., OSAKADA, F., WATANABE, K., MIZUSEKI, K., HARAGUCHI, T., MIYOSHI, H., KAMIYA, D., HONDA, Y., SASAI, N., YOSHIMURA, N., TAKAHASHI, M., SASAI, Y. (2005). **Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(32):11331-6.
- ITSKOVITZ-ELDOR, J., SCHULDINER, M., KARSENTI, D., EDEN, A., YANUKA, O., AMIT, M., SOREQ, H., BENVENISTY, N. (2000). **Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers.** *Mol Med.* 6(2):88-95.
- JENSEN, A.M., WALLACE, V.A. (1997). **Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina.** *Development* 124: 363-371.
- JEON, C.J., STRETTOI, E., MASLAND, R.H. (1998). **The major cell populations of the mouse retina.** *J Neurosci.* 18(21):8936-46
- JOMARY, C., JONES, S.E. (2008). **Induction of functional photoreceptor phenotype by exogenous Crx expression in mouse retinal stem cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49(1):429-37.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. (2003). **Princípios da Neurociência, cap. 26 (Processamento visual da retina), 4º Ed.** Manole Ltda
- KAWASAKI, H., SUEMORI, H., MIZUSEKI, K., WATANABE, K., URANO, F., ICHINOSE, H., HARUTA, M., TAKAHASHI, M., YOSHIKAWA, K., NISHIKAWA, S., NAKATSUJI, N., SASAI, Y. (2002). **Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(3):1580-5.
- KEFALOV, V., FU, Y., MARSH-ARMSTRONG, N., YAU, K.W. (2003). **Role of visual pigment properties in rod and cone phototransduction.** *Nature* 425(6957):526-31.
- KICIC, A., SHEN, W.Y., WILSON, A.S., CONSTABLE, I.J., ROBERTSON, T., RAKOCZY, P.E. (2003). **Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye.** *J Neurosci.* 23(21):7742-9.
- KOIKE, C., NISHIDA, A., UENO, S., SAITO, H., SANUKI, R., SATO, S., FURUKAWA, A., AIZAWA, S., MATSUO, I., SUZUKI, N., KONDO, M., FURUKAWA, T. (2007).

**Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development.** *Mol Cell Biol.* 27(23): 8318-29.

- KURIMOTO, Y., SHIBUKI, H., KANEKO, Y., ICHIKAWA, M., KUROKAWA, T., TAKAHASHI, M., YOSHIMURA, N. (2001). **Transplantation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells into retina injured by transient ischemia.** *Neurosci Lett.* 306(1-2):57-60.
- KUROSAWA, H. (2007). **Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells.** *J Biosci Bioeng.* 103(5):389-98.
- LA SPADA, A.R., FU, Y.H., SOPHER, B.L., LIBBY, R.T., WANG, X., LI, L.Y., EINUM, D.D., HUANG, J., POSSIN, D.E., SMITH, A.C., MARTINEZ, R.A., KOSZDIN, K.L., TREUTING, P.M., WARE, C.B., HURLEY, J.B., PTÁČEK, L.J., CHEN, S. (2001). **Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7.** *Neuron* 31(6):913-27.
- LAKSHMIPATHY, U., PELACHO, B., SUDO, K., LINEHAN, J.L., COUCOUVANIS, E., KAUFMAN, D.S., VERFAILLIE, C.M. (2004). **Efficient transfection of embryonic and adult stem cells.** *Stem Cells.* 22(4):531-43.
- LAMBA, D.A., GUST, J., REH, T.A. (2009). **Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice.** *Cell Stem Cell.* 4(1):73-9.
- LAMBA, D.A., KARL, M.O., WARE, C.B., REH, T.A. (2006). **Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(34):12769-74.
- LAVAIL, M.M., YASUMURA, D., MATTHES, M.T., LAU-VILLACORTA, C., UNOKI, K., SUNG, C.H., STEINBERG, R.H. (1998). **Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(3):592-602.
- LEE, S.H., LUMELSKY, N., STUDER, L., AUERBACH, J.M., MCKAY, R.D. (2000). **Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol.* 18(6):675-9.
- LEVINE, E.M., CLOSE, J., FERRO, M., OSTROVSKY, A., REH, T.A. (2000). **p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina.** *Dev Biol.* 219(2):299-314.
- LINDEN, R. (2000). **The anti-death league: associative control of apoptosis in developing retinal tissue.** *Brain Res. Rev.* 32:146-158.
- LINDEN, R., REHEN, S.K., CHIARINI, L. B. (1999). **Apoptosis in Developing Retinal Tissue.** *Progress in Retinal and Eye Research.* 18(2): 133-165.
- LITCHFIELD, T.M., WHITELEY, S.J.O., LUND, R.D. (1997). **Transplantation of retinal pigment epithelial, photoreceptor and other cells as treatment for retinal degeneration.** *Exp Eye Res.* 64:655-666.
- LITTLE, C.W., CASTILLO, B., DILORETO, D.A., COX, C., WYATT, J., DEL CERRO, C., DEL CERRO, M. (1996). **Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium**

- rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37(1):204-11.
- LIU, Q., JI, X., BREITMAN, M.L., HITCHCOCK, P.F., SWAROOP, A. (1996). **Expression of the bZIP transcription factor gene *Nrl* in the developing nervous system.** *Oncogene.* 12(1):207-11.
- LIVESEY, F.J., FURUKAWA, T., STEFFEN, M.A., CHURCH, G.M., CEPKO, C.L. (2000). **Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene *Crx*.** *Curr Biol.* 10(6):301-10.
- LORENZ, P., HARNACK, U., MORGENSTERN, R. (2004). **Efficient gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection.** *Biotechnol Lett.* 26(20):1589-92.
- LUND, R. (2008). **Cell-based therapies to limit photoreceptor degeneration.** *Arch Soc Esp Oftalmol.* 83:457-464.
- MACLAREN, R.E., PEARSON, R.A., MACNEIL, A., DOUGLAS, R.H., SALT, T.E., AKIMOTO, M., SWAROOP, A., SOWDEN, J.C., ALI, R.R. (2006). **Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors.** *Nature.* 444(7116):203-7.
- MARQUARDT, T., GRUSS, P. (2002). **Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all.** *Trends Neurosci.* v. 25: p. 32-37.
- MARTIN, G. R. & EVANS, M. J. (1975). **Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro.** *Proc Natl Acad Sci USA* 72(4): 1441-5.
- MARTIN, G. R. (1980). **Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis.** *Science* 209(4458): 768-76.
- MARTIN, G.R. (1981). **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634–7638.
- MARTÍNEZ-MORALES, J.R., DOLEZ, V., RODRIGO, I., ZACCARINI, R., LECONTE, L., BOVOLENTA, P., SAULE, S. (2003). **OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation.** *J Biol Chem.* 278(24):21721-31.
- MATSUDA, T., NAKAMURA, T., NAKAO, K., ARAI, T., KATSUKI, M., HEIKE, T., YOKOTA, T. (1999). **STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells.** *EMBO J.* 18(15):4261-9.
- MATSUO, I., KURATANI, S., KIMURA, C., TAKEDA, N., AIZAWA, S. (1995). **Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head.** *Genes Dev.* 9(21):2646-58.
- MEARS, A.J., KONDO, M., SWAIN, P.K., TAKADA, Y., BUSH, R.A., SAUNDERS, T.L., SIEVING, P.A., SWAROOP, A. (2001). ***Nrl* is required for rod photoreceptor development.** *Nat Genet.* 29(4):447-52.
- MEYER, J.S., KATZ, M.L., MARUNIAK, J.A., KIRK, M.D. (2004). **Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro and after transplantation into eyes of mutant mice with rapid retinal degeneration.** *Brain Res.* 1014(1-2):131-44.

- MEYER, J.S., KATZ, M.L., MARUNIAK, J.A., KIRK, M.D. (2006). **Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors.** *Stem Cells*. 24(2):274-83.
- MILAM, A.H., LI, Z.Y., FARISS, R.N. (1998). **Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa.** *Prog Retin Eye Res*. 17(2):175-205.
- MITTON, K.P., SWAIN, P.K., CHEN, S., XU, S., ZACK, D.J., SWAROOP, A. (2000). **The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation.** *J Biol Chem*. 275(38):29794-9.
- MORROW, E.M., FURUKAWA, T., RAVIOLA, E., CEPKO, C.L. (2005). **Synaptogenesis and outer segment formation are perturbed in the neural retina of Crx mutant mice.** *BMC Neurosci*. 6:5.
- MORROW, E.M.; FURUKAWA, T., CEPKO, C.L. (1998). **Vertebrate photoreceptor cell development and disease.** *Trends Cell Biol*. v. 8: p. 353-358.
- MOSHIRI, A., CLOSE, J. REH, T.A. (2004). **Retinal stem cells and regeneration.** *Int. J. Dev. Biol*. 48: 1003-1014.
- NIR, I., COHEN, D., PAPERMASTER, D.S. (1984). **Immunocytochemical localization of opsin in the cell membrane of developing rat retinal photoreceptors.** *J Cell Biol*. 98(5):1788-95.
- NISHIDA, A., FURUKAWA, A., KOIKE, C., TANO, Y., AIZAWA, S., MATSUO, I., FURUKAWA, T. (2003). **Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development.** *Nat Neurosci*. 6(12):1255-63.
- NISHIDA, A., TAKAHASHI, M., TANIHARA, H., NAKANO, I., TAKAHASHI, J.B., MIZOGUCHI, A., IDE, C., HONDA, Y. (2000). **Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41(13):4268-74.
- NISHIGUCHI, K.M., FRIEDMAN, J.S., SANDBERG, M.A., SWAROOP, A., BERSON, E.L., DRYJA, T.P. (2004). **Recessive NRL mutations in patients with clumped pigmentary retinal degeneration and relative preservation of blue cone function.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(51):17819-24.
- OGILVIE, J.M., SPECK, J.D., LETT, J.M. (2000). **Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture.** *Exp Neurol*. 161(2):676-85.
- OH, E.C., CHENG, H., HAO, H., JIA, L., KHAN, N.W., SWAROOP, A. (2008). **Rod differentiation factor NRL activates the expression of nuclear receptor NR2E3 to suppress the development of cone photoreceptors.** *Brain Res*. 21;1236:16-29.
- OH, E.C., KHAN, N., NOVELLI, E., KHANNA, H., STRETTOI, E., SWAROOP, A. (2007). **Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(5):1679-84.

- OKADA, T., ERNST, O.P., PALCZEWSKI, K., HOFMANN, K.P. (2001). **Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies.** Trends Biochem Sci. 26(5):318-24.
- OSAKADA, F., IKEDA, H., MANDAI, M., WATAYA, T., WATANABE, K., YOSHIMURA, N., AKAIKE, A., SASAI, Y., TAKAHASHI, M. (2008). **Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells.** Nat Biotechnol. 26(2):215-24.
- OTANI, A., DORRELL, M.I., KINDER, K., MORENO, S.K., NUSINOWITZ, S., BANIN, E., HECKENLIVELY, J., FRIEDLANDER, M. (2004). **Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells.** J Clin Invest. 114(6):765-74.
- PARMAR, M., LI, M. (2007). **Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation.** BMC Dev Biol. 7:86.
- PENG, G.H., AHMAD, O., AHMAD, F., LIU, J., CHEN, S. (2005). **Photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes.** Hum Mol Genet. 14(6):747-64.
- PENG, G.H., CHEN, S. (2005). **Chromatin immunoprecipitation identifies photoreceptor transcription factor targets in mouse models of retinal degeneration: new findings and challenges.** Vis Neurosci. 22(5):575-86.
- PENG, G.H., CHEN, S. (2007). **Crx activates opsin transcription by recruiting HAT-containing co-activators and promoting histone acetylation.** Hum Mol Genet. 16(20):2433-52.
- PERRY, V.H., HENDERSON, Z., LINDEN, R. (1983). **Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rats.** J. Comp. Neurol. 219: 356-368.
- PHELAN, J.K., BOK, D. (2000). **A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes.** Mol Vis. 6:116-24.
- POGGI, L., ZOLESSI, F.R., HARRIS, W.A. (2005). **Time-lapse analysis of retinal differentiation.** Curr. Opin. Cell Biol. 17(6): 676-81.
- PUCÉAT, M., BALLIS, A. (2007). **Embryonic stem cells: from bench to bedside.** Clin Pharmacol Ther. 82(3):337-9.
- QIN, J., GUO, X., CUI, G.H., ZHOU, Y.C., ZHOU, D.R., TANG, A.F., YU, Z.D., GUI, Y.T., CAI, Z.M. (2009). **Cluster characterization of mouse embryonic stem cell-derived pluripotent embryoid bodies in four distinct developmental stages.** Biologicals. In Press.
- RAGGE, N.K., BROWN, A.G., POLOSCHKE, C.M., LORENZ, B., HENDERSON, R.A., CLARKE, M.P., RUSSELL-EGGITT, I., FIELDER, A., GERRELLI, D., MARTINEZ-BARBERA, J.P., RUDDLE, P., HURST, J., COLLIN, J.R., SALT, A., COOPER, S.T., THOMPSON, P.J., SISODIYA, S.M., WILLIAMSON, K.A., FITZPATRICK, D.R., VAN HEYNINGEN, V., HANSON, I.M. (2005). **Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations.** Am J Hum Genet. 76(6):1008-22.

- RIVOLTA, C., BERSON, E.L., DRYJA, T.P. (2001). **Dominant Leber congenital amaurosis, cone-rod degeneration, and retinitis pigmentosa caused by mutant versions of the transcription factor CRX.** Hum Mutat. 18(6):488-98.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, J.A., LU, J.Q., VELASCO, I., RIVERA, S., ZOGHBI, S.S., LIOW, J.S., MUSACHIO, J.L., CHIN, F.T., TOYAMA, H., SEIDEL, J., GREEN, M.V., THANOS, P.K., ICHISE, M., PIKE, V.W., INNIS, R.B., MCKAY, R.D. (2007). **Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease.** Stem Cells. 25(4):918-28.
- SCHULZ, T.C., PALMARINI, G.M., NOGGLE, S.A., WEILER, D.A., MITALIPOVA, M.M., CONDIE, B.G. (2003). **Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells.** BMC Neurosci. 4:27.
- SICINSKI, P., DONAHER, J.L., PARKER, S.B., LI, T., FAZELI, A., GARDNER, H., HASLAM, S.Z., BRONSON, R.T., ELLEDGE, S.J., WEINBERG, R.A. (1995). **Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast.** Cell 82(4):621-30.
- SILVERMAN, M.S., HUGHES, S.E., VALENTINO, T.L., LIU, Y. (1992). **Photoreceptor transplantation: anatomic, electrophysiologic, and behavioral evidence for the functional reconstruction of retinas lacking photoreceptors.** Exp Neurol. 115(1):87-94.
- SIMEONE, A., ACAMPORA, D., MALLAMACI, A., STORNAIUOLO, A., D'APICE, M.R., NIGRO, V., BONCINELLI, E. (1993). **A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo.** EMBO J. 12(7):2735-47.
- SMERDON, D. (2000). **Anatomy of the eye and orbit.** Curr Anaest Crit Care. 11, 286-292
- SMITH, T.A., HOOPER, M.L. (1983). **Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures.** Exp Cell Res 145:458-62.
- SOHOCKI, M.M., SULLIVAN, L.S., MINTZ-HITTNER, H.A., BIRCH, D., HECKENLIVELY, J.R., FREUND, C.L., MCINNES, R.R., DAIGER, S.P. (1998). **A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene.** Am J Hum Genet. 63(5):1307-15.
- STEPANIK, P.L., LERIOUS, V., MCGINNIS, J.F. (1993). **Developmental appearance, species and tissue specificity of mouse 23-kDa, a retinal calcium-binding protein (recoverin).** Exp Eye Res. 57(2):189-97.
- SUGIE, Y., YOSHIKAWA, M., OUJI, Y., SAITO, K., MORIYA, K., ISHIZAKA, S., MATSUURA, T., MARUOKA, S., NAWA, Y., HARA, Y. (2005). **Photoreceptor cells from mouse ES cells by co-culture with chick embryonic retina.** Biochem Biophys Res Commun. 332(1):241-7.
- SUKOYAN, M.A., KERKIS, A.Y., MELLO, M.R., KERKIS, I.E., VISINTIN, J.A., PEREIRA, L.V. (2002). **Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases.** Braz J Med Biol Res. 35(5):535-42.
- SWAIN, P.K., CHEN, S., WANG, Q.L., AFFATIGATO, L.M., COATS, C.L., BRADY, K.D., FISHMAN, G.A., JACOBSON, S.G., SWAROOP, A., STONE, E., SIEVING, P.A.,

- ZACK, D.J. (1997). **Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration.** *Neuron* 19(6):1329-36.
- SWAIN, P.K., HICKS, D., MEARS, A.J., APEL, I.J., SMITH, J.E., JOHN, S.K., HENDRICKSON, A., MILAM, A.H., SWAROOP, A. (2001). **Multiple phosphorylated isoforms of NRL are expressed in rod photoreceptors.** *J Biol Chem.* 276(39):36824-30.
- SWAROOP, A., WANG, Q.L., WU, W., COOK, J., COATS, C., XU, S., CHEN, S., ZACK, D.J., SIEVING, P.A. (1999). **Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function.** *Hum Mol Genet.* 8(2):299-305.
- SWAROOP, A., XU, J.Z., PAWAR, H., JACKSON, A., SKOLNICK, C., AGARWAL, N. (1992). **A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(1):266-70.
- TAKAGI, Y., TAKAHASHI, J., SAIKI, H., MORIZANE, A., HAYASHI, T., KISHI, Y., FUKUDA, H., OKAMOTO, Y., KOYANAGI, M., IDEGUCHI, M., HAYASHI, H., IMAZATO, T., KAWASAKI, H., SUEMORI, H., OMACHI, S., IIDA, H., ITOH, N., NAKATSUJI, N., SASAI, Y., HASHIMOTO, N. (2005). **Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model.** *J Clin Invest.* 115(1):102-9.
- TANG, F., SHANG, K., WANG, X., GU, J. (2002). **Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein.** *Cell Mol Neurobiol.* 22(1):95-101.
- THOMSON, J.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S.S., WAKNITZ, M.A., SWIERGIEL, J.J., MARSHALL, V.S., JONES, J.M. (1998). **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** *Science.* 282(5391):1145-7.
- TOMITA, M., ADACHI, Y., YAMADA, H., TAKAHASHI, K., KIUCHI, K., OYAIZU, H., IKEBUKURO, K., KANEDA, H., MATSUMURA, M., IKEHARA, S. (2002). **Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina.** *Stem Cells.* 20(4):279-83.
- TURNER, D.L., SNYDER, E.Y., CEPKO, C.L. (1990). **Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina.** *Neuron* 4(6):833-45.
- WAID, D.K., MCLOON, S.C. (1998). **Ganglion cells influence the fate of dividing retinal cells in culture.** *Development* 125(6):1059-66.
- WANG, Q.L., CHEN, S., ESUMI, N., SWAIN, P.K., HAINES, H.S., PENG, G., MELIA, B.M., MCINTOSH, I., HECKENLIVELY, J.R., JACOBSON, S.G., STONE, E.M., SWAROOP, A., ZACK, D.J. (2004). **QRX, a novel homeobox gene, modulates photoreceptor gene expression.** *Hum Mol Genet.* 13(10):1025-40.
- WATANABE, T., RAFF, M.C. (1990). **Rod photoreceptor development in vitro: Intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina.** *Neuron* 4(3): 461-67.
- YANG, X.J. (2004). **Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis.** *Semin Cell Dev Biol.* 15(1):91-103.

- YOSHIDA, S., MEARS, A.J., FRIEDMAN, J.S., CARTER, T., HE, S., OH, E., JING, Y., FARJO, R., FLEURY, G., BARLOW, C., HERO, A.O., SWAROOP, A. (2004). **Expression profiling of the developing and mature Nrl<sup>-/-</sup> mouse retina: identification of retinal disease candidates and transcriptional regulatory targets of Nrl.** Hum Mol Genet. 13(14):1487-503.
- YOUNG, M.J., RAY, J., WHITELEY, S.J., KLASSEN, H., GAGE, F.H. (2000). **Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats.** Mol Cell Neurosci. 16(3):197-205.
- YOUNG, R.W. (1967). **The renewal of photoreceptor cell outer segments.** J Cell Biol. 33(1):61-72.
- ZENG, X., CAI, J., CHEN, J., LUO, Y., YOU, Z.B., FOTTER, E., WANG, Y., HARVEY, B., MIURA, T., BACKMAN, C., CHEN, G.J., RAO, M.S., FREED, W.J. (2004). **Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells.** Stem Cells. 22(6):925-40.
- ZHAO, X., LIU, J., AHMAD, I. (2002). **Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons.** Biochem Biophys Res Commun. 297(2):177-84.
- ZOLOTUKHIN, S., POTTER, M., ZOLOTUKHIN, I., SAKAI, Y., LOILER, S., FRAITES, T.J. JR., CHIODO, V.A., PHILLIPSBERG, T., MUZYCZKA, N., HAUSWIRTH, W.W., FLOTTE, T.R., BYRNE, B.J., SNYDER, R.O. (2002). **Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors.** Methods. 28(2):158-67.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)