



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

RICARDO LUIZ DE AZEVEDO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO INIBIDOR DE CISTEÍNA PROTEASES E64 NA DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS EM CÉLULAS NEURAIS**

RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Luiz de Azevedo Pereira

**Avaliação do Inibidor de Cisteína Proteases E64 na Diferenciação de Células-
tronco Embrionárias em Células Neurais**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Fisiologia) Orientadores: Rosalia Mendez-Otero e Antônio Carlos Campos de Carvalho

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Azevedo-Pereira, Ricardo Luiz de. Azevedo-Pereira.

Avaliação do Inibidor de Cisteína Proteases E64 na Diferenciação de Células-Tronco Embrionárias em Células Neurais/ Ricardo Luiz de. Azevedo-Pereira. Rio de Janeiro, 2009.

XVI, 130 f.: 29il.

Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientadores: Rosalia Mendez Otero e Antonio Carlos Campos de Carvalho

1. Células-tronco embrionárias. 2. Cisteína proteases. 3. E64. 4. Diferenciação. – Teses. I. Mendez-Otero, Rosalia e Campos de Carvalho, Antônio Carlos (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

CDD:

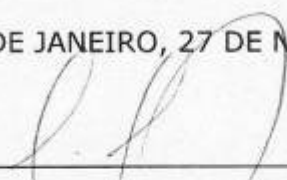
**"AVALIAÇÃO DO INIBIDOR DE CISTEÍNA PROTEASES E64
NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
EM CÉLULAS NEURAIS"**

RICARDO LUIZ DE AZEVEDO PEREIRA

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

APROVADA POR:

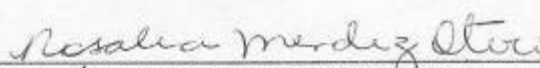
RIO DE JANEIRO, 27 DE NOVEMBRO DE 2009.




PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ)
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia)



PROF. ANTONIO CARLOS CAMPOS DE CARVALHO (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR



PROF^a ROSÁLIA MENDEZ OTERO (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADORA



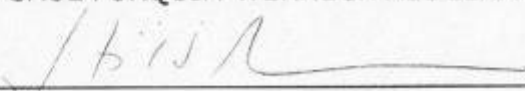
PROF. RICARDO AUGUSTO DE MELO REIS (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR



PROF^a CECÍLIA HEDIN PEREIRA (DOUTOR - UFRJ)



PROF^a ELIANA SAUL FURQUIM WERNECK ABDELHAY (DOUTOR - INCA)



PROF. STEVENS KASTRUP REHEN (DOUTOR - UFRJ)

RESUMO

Células-tronco embrionárias (ESCs) são pluripotentes, possuem auto-renovação ilimitada e devido a estas características vêm sendo utilizadas para compreender os eventos celulares durante o desenvolvimento embrionário. Cistatina C (CysC) é um inibidor de cisteína proteases secretado em muitos tecidos do corpo. Sua ação autócrina/parácrina mostrou induzir a proliferação de células-tronco/progenitores neurais *in vivo* e *in vitro* e ainda, mostrou induzir a diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo em células neurais. No entanto, não está claro se a inibição da atividade das cisteínas proteases é realmente a chave para a diferenciação em células neural ou se é a porção glicosilada desta molécula que agiria como um co-fator de FGF β (do inglês *fibroblast growth factor* β) levando a este evento celular. Neste trabalho, primeiro avaliamos as características indiferenciadas e pluripotentes da linhagem USP-1 de ESCs de camundongo. Segundo, estabelecemos um protocolo de diferenciação destas células em células neurais com ácido retinóico. Em seguida, avaliamos se o inibidor sintético E64 de cisteína proteases induziria a diferenciação destas células em neurônios. E por último, analisamos se CysC e o E64 teriam o mesmo efeito em ESCs humanas. Para isto, ESCs foram tratadas durante a formação dos EBs (do inglês *embryoid bodies*) com os inibidores de cisteína proteases. Após o tratamento os EBs foram transferidos para placas de cultura ou laminulas previamente tratada com laminina e poli-D-lisine e mantidas durante 24 dias. A presença de células neurais foi avaliada em diferentes dias do protocolo de diferenciação por imunocitoquímica, imunoblotting e PCR em tempo real. Nossos resultados mostraram que a inibição de cisteína proteases com E64 induziu o incremento de células que expressam marcadores de progenitores neurais em ESCs camundongo. As análises qualitativas mostraram a presença de células com característica de neurônios jovens com perfil migratório, neurônios maduros e poucas células positivas para GABA e tirosina hidroxilase. Além disso, não foi possível detectar astrócitos em grandes quantidades e não encontramos oligodendrócitos. As análises das propriedades eletrofisiológicas mostraram a presença de neurônios maduros com corrente de canais de Na⁺ e K⁺. Embora o tratamento com E64 tenha mostrado uma tendência de aumento no número de neurônios em nossas culturas em relação ao grupo sem tratamento, níveis elevados de mRNA de Sox2 ainda foram detectadas nas células tratadas com E64, sugerindo a presença de células progenitoras neurais. Surpreendentemente, quando nós tratamos ESCs humano com os inibidores de cisteína proteases não encontramos nenhum efeito sobre a indução da diferenciação neural. Estes resultados indicam que a inibição de cisteína proteases pode estar envolvida na diferenciação de progenitores neurais durante o desenvolvimento de ESCs de camundongos, mas em contrapartida, não parece participar da regulação da expressão de marcadores neurais na ESCs humanas, sugerindo ainda que diferentes caminhos moleculares podem estar envolvidos na diferenciação ESCs de camundongos e humanas.

ABSTRACT

Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent, self-renewable stem cells that have been used to understand the role of molecules during embryonic development. Cystatin C (CysC), an inhibitor of cysteine protease, is secreted in many tissues of the body and has been described as a powerful inducer of cell proliferation and guidance of mouse embryonic stem cells to a neural fate. However, it is unclear if inhibition of cysteine proteases is really promoting differentiation into neural fates or if glycosylation of the CysC is only a co-factor of β FGF to induce the differentiation. In this work, we first evaluated the pluripotency and self-renewable characteristics of USP-1 mouse ESC line. Second, we established a protocol to induce the differentiation of USP-1 line into neural cells. Next we evaluated the capacity of the synthetic cysteine protease inhibitor, E64, to direct mouse ESC towards neural cell fates. And in the last, we evaluated if human ESCs respond like mouse ESCs when treated with E64 and CysC. For this purpose ESCs were treated during the embryoid bodies (EBs) formation with the cysteine protease inhibitor. After the treatment, the EBs were transferred to culture plates or coverslips previously treated with laminin and poly-D-lysine and kept in neural media for 24 days. The presence of neural cells was evaluated in different days of the protocol of differentiation by immunocytochemistry and quantification of neural marker expression was evaluated by immunoblotting and qRT-PCR. Our results show that inhibition of cysteine proteases induced increments of early neural markers in mouse ESCs. We found migratory neurons, mature neurons and a few specific GABAergic and dopaminergic neurons, but astrocytes were rarely found and we did not find oligodendrocytes. Electrophysiology showed the presence of functional mature neurons with Na^+ channels. Although the number of neurons was higher when compared to a control group, high levels of Sox2 mRNA were still detected in E64 treated cells. Strikingly, when we treated human ESCs with the cysteine protease inhibitor we found no effect on neural differentiation. These results indicate that inhibition of cysteine proteases may be involved in the regulation of early neural markers during development of mouse ESCs but, not in the human ESCs, suggesting that different pathways may be involved in ESCs differentiation into mouse and human neural cells.

AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- Aos meus pais Silvio e Elizabeth e ao meu irmão Eduardo.
- À minha esposa Virgínia.
- Aos meus orientadores e amigos Dr^a. Rosalia Mendez Otero e Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho.
- Ao Dr. Thomas Reh (University of Washington-Seattle/EUA).
- Ao professores e amigos Dr. Marcelo Felipe Santiago e Dr^a. Regina Coeli Goldenberg (IBCCF/UFRJ).
- Aos amigos colaboradores Dr. Emiliano H. Medei, Dr. Edison Rondinelle, Dr. Deivid C. Rodrigues (IBCCF/UFRJ) e Dr. Stevens Kastrup Rehen
- Ao revisor e amigo Dr. Ricardo Augusto de Melo Reis.
- Aos meus alunos Anderson Rodrigo Cadedo, Gisele Montenegro, Fernanda Tubenclak e Bárbara Rangel
- Ao Dr. Carlos Roberto Alves (IOC-Fiocruz) e Dr^a. Ana Paula Lima (IBCCF/UFRJ).
- Aos técnicos Felipe Marins, Suelen Sérgio, Taline e Lanuza (IBCCF).
- Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular (IBCCF).
- Aos amigos do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular (IBCCF).
- Aos amigos Andrew McUsic e Dr. Deepak Lamba (University of Washington-Seattle/EUA).
- Às agências de fomento: CAPES; CNPq, FAPERJ, DECIT, PROTECEL, Programa de Terapia Celular e Bioengenharia, INBEB e IBCCF.

“Nothing in life is to be feared. It is only to be understood”

Marie Curie
(1867-1934)

“Sou cana forte, sou mesmo é cana caiana,
minha doçura de cana, é ruim de me derrubar”

Mestre Toni Vargas
(Grupo Capoeira Senzala)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes e tipos de células-tronco.	2
Figura 2. Culturas de células-tronco embrionárias.	5
Figura 3. Cisteína proteases de mamíferos e estrutura química do E64.	22
Figura 4. Esquema ilustrativo do protocolo de diferenciação de mESC em linhagens neurais.	32
Figura 5. Esquema ilustrativo do protocolo de diferenciação de hESC em linhagens neurais.	34
Figura 6. Detecção de marcadores de células pluripotentes em mESC/USP1 após 2 dias <i>in vitro</i> .	48
Figura 7. Diferenciação de mESC em células positivas para nestina após o tratamento com AR.	50
Figura 8. Tratamento com AR gerou células com prolongamentos celulares típicos de neurônios e positivos para tubulina β -III.	53
Figura 9. O tratamento com AR induziu mESC a se diferenciar em células que expressam marcadores de neurônios maduros e de astrócitos.	54
Figura 10. Perfil eletrofisiológico de mESC após o tratamento com AR.	55
Figura 11. O tratamento com E64 aumentou de forma dose dependente a expressão de Pax6 em mESC.	57
Figura 12. O tratamento com E64 não alterou o número e o tamanho dos EBs.	60
Figura 13. Diferenciação de mESC em células positivas para nestina após o tratamento com E64.	61
Figura 14. Caracterização de mESC tratadas com E64 no dia 3 do protocolo de tratamento.	64

Figura 15. Tratamento com E64 gerou células com características de neurônios migratórios.	65
Figura 16. Tratamento com E64 gerou células com características de astrócitos e neurônios.	66
Figura 17. Expressão de marcadores de neurônios maduros em mESC após o tratamento com E64.	67
Figura 18. Tratamento com E64 gerou células que expressam GAP-43.	68
Figura 19. Quantificação da expressão de tubulina β -III em mESCs tratadas com E64.	69
Figura 20. Detecção de neurônios com fenótipos GABAérgicos e dopaminérgicos em mESC após o tratamento com E64.	71
Figura 21. Detecção de canais de sódio em prolongamentos celulares típicos de neurônios em mESC após o tratamento com E64.	72
Figura 22. Análise de marcadores relacionados com células pluripotentes nas diferentes condições analisadas.	74
Figura 23. Perfil eletrofisiológico de mESCs após o tratamento com E64.	77
Figura 24. Cultura de hESCs linhagem H1.	79
Figura 25. Características de hESC-H1 indiferenciada.	80
Figura 26. Análise do número e das áreas dos EBs formados sob os diferentes tratamentos com inibidores de cisteína proteases.	83
Figura 27. Níveis relativos de mRNA de Pax6 em hESC-H1 nas diferentes condições de tratamento.	84
Figura 28. Níveis relativos de mRNA de Sox2 em hESC-H1 nas diferentes condições de tratamento.	85

Figura 29. Diferenciação de hESC-H1 em células positivas para tubulina β -III. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados nas análises por RT-PCR e qRT-PCR em mESCs	42
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados nas análises por qRT-PCR em hESCs	43
Tabela 3 – Níveis relativos de mRNA de genes relacionados com a pluripotência em mESC sob as diferentes condições estudadas.	75
Tabela 4 – Níveis relativos de mRNA de Pax6 em hESC-H1 sob as diferentes condições estudadas	86
Tabela 5 – Níveis relativos de mRNA de Sox2 em hESC-H1 sob as diferentes condições estudadas	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	(ácido retinóico)
BDNF	(fator neurotrófico derivado do cérebro; do inglês <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
BMP	(proteína morfogenética óssea; do inglês <i>bone morphogenetic protein</i>)
BSA	(Soro albumina bovina; do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CC	(cérebro de camundongo adulto)
cDNA	(DNA complementar)
CPP	(proteína de penetração celular; do inglês <i>cell-penetrating peptide</i>)
Ct	(ciclo limiar; do inglês <i>cycle threshold</i>)
Ctrl	(grupo controle)
Cys	(Cistatina; do inglês <i>cystatin</i>)
DAPI	(4', 6-diamidino-2-fenilindole)
DCX	(<i>doublecortin</i>)
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>)
DMEM-hg	(DMEM - <i>High glucose</i>)
DMSO	(dimetil sulfoxido)
dNTP	(trifosfato de deoxinucleotídeo; do inglês <i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
E64	(trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4- guanidino) butano)
EBs	(corpos embriões; do inglês <i>embryoid bodies</i>)
EGF	(fator de crescimento de epiderme; do inglês <i>epidermal growth factor</i>)
ERK1/2	(quinase reguladas de sinais extracelular; do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ESCs	(células-tronco embrionárias; do inglês <i>embryonic stem cells</i>)
FGF β	(fator de crescimento de fibroblasto β ; do inglês <i>fibroblast growth factor β</i>)
FL	(camada alimentadora; do inglês <i>feeder-layer</i>)
GAP43	(proteína associada ao crescimento 43; do inglês <i>growth associated protein 43</i>)
GDNF	(fator neurotrófico derivado da glia; do inglês <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	(proteína ácida fibrilar da glia; do inglês <i>glia fibrillar astrocyte protein</i>)
hESCs	(células tronco embrionárias humanas; do inglês <i>human embryonic stem cells</i>)
hESCs-H1	(células-tronco embrionárias humanas - linhagem H1)
HGF	(fator de crescimento de hepatócitos; do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>)
IGF-II	(fator de crescimento semelhante à insulina; do inglês <i>insulin like growth factor II</i>)
Indif	(ESCs indiferenciadas)
iPSCs	(células-tronco pluripotentes induzidas; do inglês <i>induced pluripotent stem cells</i>)
ITSF	(insulina, transferrina, selenito de sódio e fibronectina)
KSR	(soro "knockout" de reposição, do inglês <i>knockout serum replacement</i>)
LIF	(fator inibitório de leucemia; do inglês <i>leukemia inhibitory factor</i>)
MBP	(proteína básica da mielina; do inglês <i>myelin basic protein</i>)
MCI	(massa celular interna)

MCyMEF	(meio condicionado de γ MEF)
MEF	(fibroblasto embrionário de camundongo; do inglês <i>mouse embryonic fibroblast</i>)
mESCs	(células-tronco embrionárias de camundongo; do inglês <i>mouse embryonic stem cells</i>)
N-CAM	(molécula de adesão celular neural do inglês <i>neural cell adhesion molecule</i>)
NEAA	(aminoácido não-essenciais; do inglês <i>non-essential amino acid</i>)
Neu5Gc	(N-glicolilneuraminico)
NMDA	(ácido N-metil-D-aspartico; do inglês <i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NSC	(células-tronco neurais; do inglês <i>neural stem cells</i>)
Oct-3/4	(fator de transcrição ligante do octâmero 4; do inglês <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)
PBS	(solução tampão fosfato; do inglês <i>phosphate Buffer Solution</i>)
PCR	(reação em cadeia da polimerase; do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	(fator de crescimento derivado de plaqueta; do inglês <i>platelet derived growth factor</i>)
Poli-HEMA	(Poli 2-hidroxietil metacrilato)
PPD	(2,5-difenil-1,3,4-oxadiazole)
qRT-PCR	(PCR em tempo real; do inglês <i>quantitative real time RT-PCR</i>)
RT-PCR	(reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa; do inglês <i>reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i>)
SDF-1	(fator celular derivado de estroma 1; do inglês <i>stromal cell-derived factor 1</i>)
SFB	(soro fetal bovino)
Shh	(sonic hedgehog)
SSEA-1	(antígeno embrionário espécie específico 1; do inglês <i>stage-specific embryonic antigen-1</i>)
STAT3	(tradutor do sinal e ativador da transcrição 3; do inglês <i>signal transducer and activator transcription 3</i>)
TGF-1 β	(fator de crescimento transformante 1 β ; do inglês <i>transforming growth factor 1β</i>)
TGF- α	(fator de crescimento transformante α ; do inglês <i>transforming growth factor-α</i>)
TTX	(tetrodotoxina)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conceitos Gerais	01
1.2. Células-Tronco Embrionárias	03
1.3. Diferenciação de células-tronco embrionárias em fenótipos neurais	12
1.3.1. Diferenciação de células-tronco embrionárias em neurônios dopaminérgicos.	14
1.3.2. Diferenciação de células-tronco embrionárias em motoneurônios	15
1.3.3. Diferenciação de células-tronco embrionárias em neurônios da retina	16
1.3.4. Diferenciação de células-tronco embrionárias em células da glia	18
1.4. Cisteína proteases e inibidores de cisteína protease na proliferação e diferenciação de progenitores neurais	19

2. OBJETIVO GERAL

2.1. Objetivos específicos	26
----------------------------	----

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Cultura de Células	27
3.1.1 - Fibroblastos embrionários de camundongo	27
3.1.2 - Linhagens de células-tronco embrionárias humanas	28
3.1.3 - Linhagens de células-tronco embrionárias de camundongo	29
3.2 – Indução da diferenciação de mESC em células neurais com AR	30

3.3 – Tratamento de mESCs com trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino) Butano – E64	30
3.4 – Tratamento da hESC-H1 com E64 e Cistatina C	33
3.5 – Análise do número e do diâmetro dos corpos embrióides	35
3.6 – Quantificação de número de células nestina e NeuN positivas	35
3.6 – Imunocitoquímica	36
3.7 – Immunoblotting	38
3.8 – Reação em cadeia da polimerase	39
3.8.1 - PCR em mESC	40
3.8.2 - PCR em hESC-H1	42
3.9 - Eletrofisiologia	43
3.10 – Análises estatísticas	46
4 - RESULTADOS	
4.1- Análise do estado de indiferenciação da linhagem USP-1 de mESCs	47
4.2. – Avaliação do protocolo de diferenciação de mESCs em células neurais através do tratamento com AR e Neurobasal®	49
4.2.1 – O tratamento de mESCs com AR e Neurobasal® aumentou o número de células positivas para nestina	49
4.2.2. – O tratamento com ácido retinóico induziu a diferenciação de mESC em células características de neurônios e astrócitos	51
4.2.3 – Caracterização eletrofisiológica de mESCs após o tratamento com AR	52
4.3 – Avaliação do inibidor de cisteína protease, E64 na diferenciação de mESCs em células neurais	56
4.3.1 - Definição da melhor concentração de trabalho do E64	56

4.3.2 – O tratamento com E64 não interferiu na formação dos corpos embrióides (EBs)	58
4.3.3 – O tratamento de mESCs com E64 aumentou o número de células positivas para nestina	58
4.3.4 – Análise fenotípica e quantitativa das células neurais geradas após o tratamento de mESCs com E64	62
4.3.5 – Análise da expressão de marcadores de pluripotência em culturas de mESCs tratadas com E64	73
4.3.6 – O tratamento de mESCs com E64 gerou neurônios com corrente de entrada	76
4.4 – Avaliação de inibidores de cisteína protease na diferenciação de hESC	78
4.4.1 – Cultura de hESC	78
4.4.2 – Análise da formação de corpos embrióides de hESC-H1 após o tratamento com inibidores de cisteína proteases	81
4.4.3 – O tratamento com inibidores de cisteína proteases não induziu o aumento dos níveis de mRNA de progenitores neurais em hESC-H1	81
4.4.4 – Culturas de hESC-H1 diferenciaram-se em células positivas para tubulina β -III independente do tratamento com inibidores de cisteína proteases	87
5 – DISCUSSÃO	89
6 – CONCLUSÕES	98
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8 – ANEXO	118

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Conceitos Gerais

O estudo com células-tronco tem possibilitado o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos no processo de diferenciação durante o desenvolvimento embrionário (Darr e Benvenisty, 2006; Kucia *et al.*, 2006; Giehl, 2007) e aberto novas possibilidades de terapias celulares (Kobayashi, 2006; Olivier *et al.*, 2006; Lyon e Harding, 2007; Tang *et al.*, 2007).

As células-tronco apresentam características que as diferenciam das outras células do organismo tais como a capacidade de autorenovação e a de se diferenciar em vários tipos celulares. Em função da capacidade de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas como: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Figura 1). As células totipotentes são originadas do zigoto e são capazes de formar todos os tecidos, incluindo os extra-embrionários. As pluripotentes são capazes de formar tipos celulares dos três folhetos germinativos (endoderma, ectoderma e mesoderma). Além disto, as células-tronco pluripotentes podem ser classificadas de acordo com a sua origem, podendo ser: (1) da massa celular interna do blastocisto (no 4º ou 5º dia após a fecundação - células-tronco embrionárias); (2) da região da prega gonadal (entre a 5ª e a 10ª semana do desenvolvimento fetal – células-tronco germinativas); (3) de tumores embrionários como teratocarcinomas (células-tronco de carcinoma) e (4) ainda podem ser obtidas através da manipulação genética ativando genes relacionados à pluripotencia. As células multipotentes são células originadas de tecidos adultos ou neonatais, possuindo capacidade de diferenciação comprometida com os tipos celulares característicos do tecido de origem (para revisão ver, Mendez-Otero *et al.*, 2007).

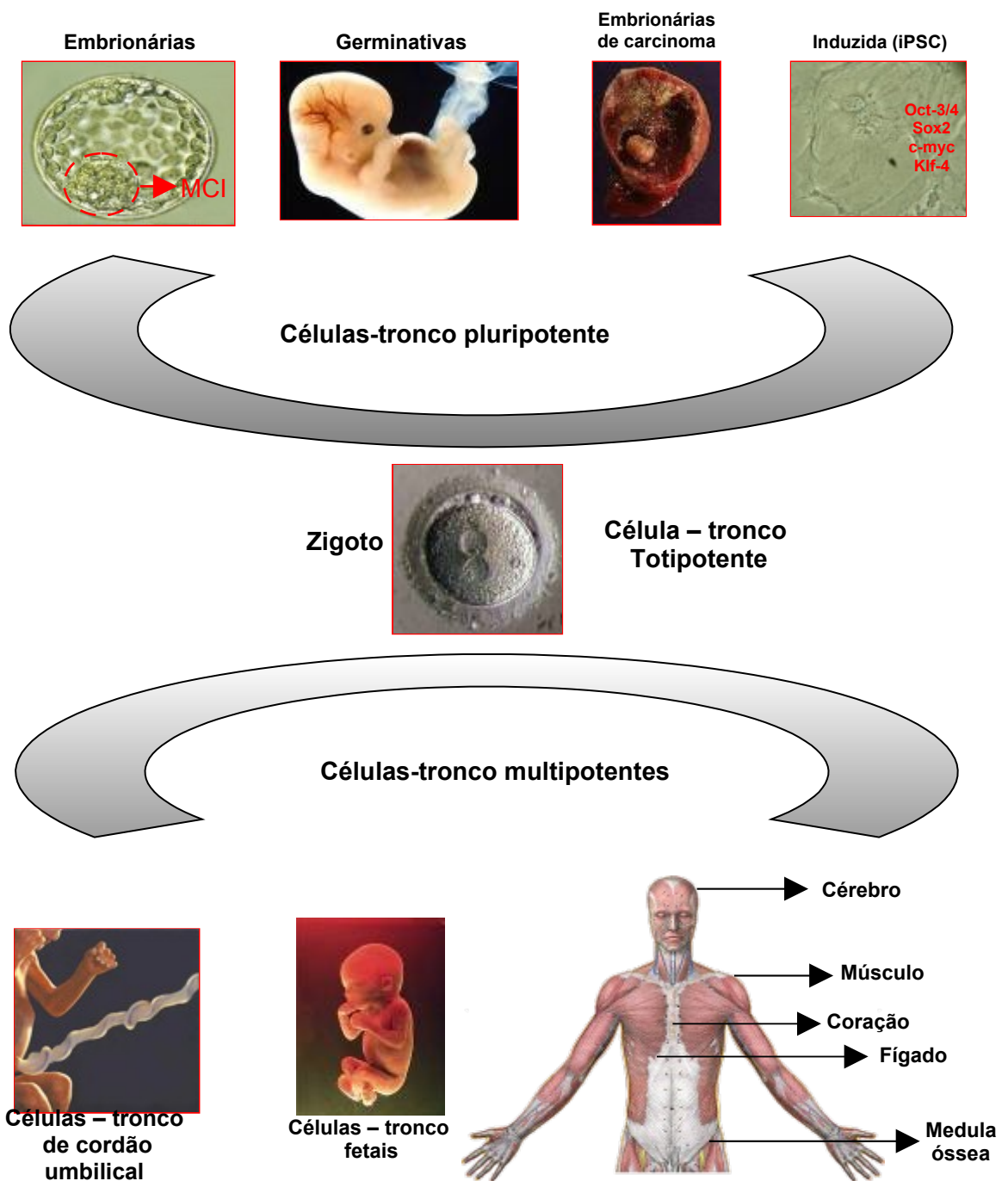


Figura 1. Fontes e tipos de células-tronco. As células-tronco totipotentes são obtidas a partir do zigoto. As células-tronco pluripotentes podem ser obtidas, da massa celular interna (MCI) dos blastocistos, da prega gonadal do embrião entre a 4^o e 10^o semana, de teratocarcinomas ou a partir da indução da atividade de fatores de transcrição específicos. As células-tronco multipotentes podem ser obtidas de tecido do organismo adulto, fetal e do sangue de cordão umbilical e de tecidos adulto, como cérebro, músculo, coração, fígado e medula óssea.

Em adultos, células-tronco foram identificadas em praticamente todos os tecidos, incluindo o sistema nervoso (Reynolds *et al.*, 1992; Gage *et al.*, 1995; Doetsch *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999), a medula óssea (Becker *et al.*, 1963; Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1970; Morrison *et al.*, 1997; Bianco *et al.*, 2001), músculo esquelético (Seale e Rudnicki, 2000), as criptas do trato gastrointestinal (Sirica *et al.*, 1990), a pele (Ghazizadeh e Taichman, 2001), o pâncreas (Zulewski *et al.*, 2001; Koblas *et al.*, 2007), o fígado (Sirica *et al.*, 1990) e o coração (Beltrami *et al.*, 2003). Além de difíceis de serem identificadas uma vez que há ainda poucos marcadores conhecidos, estes tipos de células-tronco uma vez isoladas não se diferenciam em todas as células do organismo adulto.

As células-tronco pluripotentes além de apresentarem a capacidade de originar células dos três folhetos germinativos, podem ser cultivadas por longos períodos sem perder sua característica indiferenciada. Assim, com o estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias abre-se uma maior possibilidade de utilizar células-tronco tanto para estudos de biologia celular, como para avaliar os efeitos celulares de novos fármacos, bem como o entendimento dos eventos moleculares durante a diferenciação celular. Cabe ainda ressaltar o enorme potencial destas células no tratamento de doenças crônico-degenerativas devido a sua pluripotencialidade.

1.2 - Células-Tronco Embrionárias

Células-tronco embrionárias (ESCs) são células especializadas isoladas da massa celular interna (MCI) de blastocisto de mamíferos (Figura 2). Em camundongos a MCI é isolada entre o terceiro e quarto dia após a fertilização (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981) enquanto em primatas (Macaco Rhesus) no

sexto dia (Thomson *et al.*, 1995) e em humanos entre o quinto e sétimo dia (Thomson *et al.*, 1998). As células da MCI são cultivadas em geral sobre uma monocamada de células (FL) e freqüentemente são utilizados fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) mitoticamente inativados (iMEF). Nestas condições, as ESCs formam colônias de células indiferenciadas. Alternativamente, as ESCs podem ser obtidas de mórulas - uma fase anterior no desenvolvimento embrionário- e neste caso são isolados blastômeros para obter as linhagens (Klimanskaya *et al.*, 2007; Wakayama *et al.*, 2007). Embora estes autores tenham sugerido que esta nova estratégia permita o desenvolvimento do embrião mesmo com a retirada do único blastômero necessário a produção das ESCs, todos os embriões utilizados nos estudos foram destruídos, e portanto, este procedimento não evitaria os possíveis conflitos éticos envolvidos no uso de embriões para pesquisa.

Além da capacidade de formarem células de diferentes tecidos *in vitro*, as linhagens de células-tronco embrionárias apresentam outras características que as definem como células-tronco pluripotentes. Por exemplo, quando reintroduzidas indiferenciadas em blastocistos são capazes de se integrar na massa celular interna e originar células de diferentes tecidos do embrião, inclusive das linhagens germinativas (Bradley *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1986). Além disto, quando injetadas indiferenciadas em tecido subcutâneo de camundongos atímicos formam teratomas ou teratocarcinomas, tumores que apresentam células dos três folhetos germinativos (Martin, 1981).

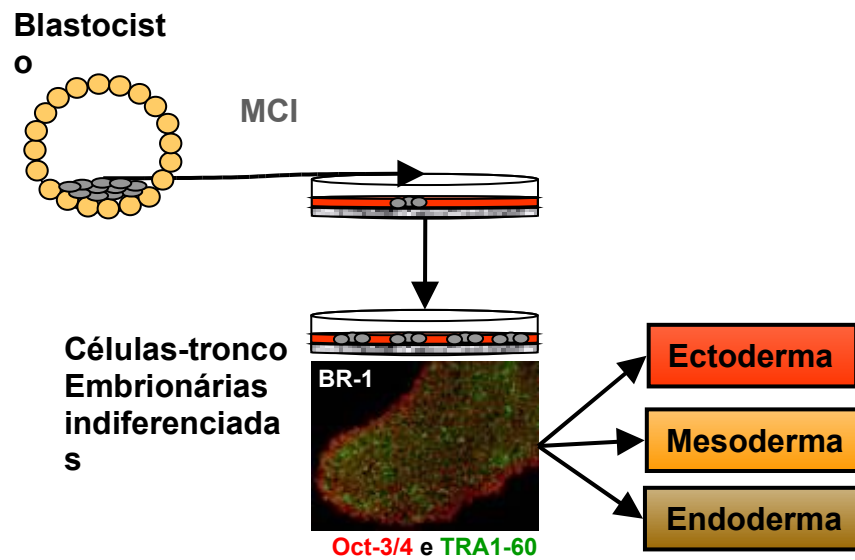


Figura 2. Culturas de células-tronco embrionárias. A massa celular interna (MCI) é retirada do blastocisto e cultivada *in vitro*. As células são ampliadas indiferenciadas e na ausência de fatores de crescimento específicos diferenciam-se em células dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma.

As primeiras ESCs isoladas da MCI foram obtidas de blastocistos de camundongos (mESCs), por dois grupos de pesquisadores em 1981 (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estes estudos com mESCs permitiram um maior conhecimento para o primeiro isolamento de ESC humanas (hESCs) a partir de blastócitos doados por casais em programas de fertilização *in vitro*. Estas células foram mantidas somente por duas passagens sendo positivas para fosfatase alcalina (Bongso *et al.*, 1994). Estudos realizados por Thomson *et al.* (1995 e 1996) com ESCs de Macaco Rhesus e sagüis permitiram o aperfeiçoamento da técnica sendo possível o estabelecimento logo a seguir das primeiras linhagens de hESCs *in vitro* (H1, H7, H9, H13 e H14) pelo mesmo grupo. Estas linhagens foram mantidas por 32 passagens, sendo positivas para marcadores celulares no estágio indiferenciado e formaram teratomas quando injetadas em camundongos imunodeficientes (Thomson *et al.*, 1998). A partir destes primeiros estudos, novas linhagens de hESCs têm sido estabelecidas e caracterizadas por outros grupos de pesquisa abrindo novas perspectivas para um maior entendimento dos processos de diferenciação celular e de aplicação nas terapias celulares (Cowan *et al.*, 2004).

Alem das linhagens de camundongo, de primatas não-humanos e humanas, outras linhagens de ESCs também foram estabelecidas, como de cachorro (Vaags *et al.*, 2009), rato e coelho (Honda *et al.*, 2008; Intawicha *et al.*, 2009; Sano *et al.*, 2009).

Os sistemas de coculturas utilizados nas linhagens de ESCs permitem que estas células mantenham-se indiferenciadas pelo contato direto com componentes da matriz extracelular secretados e/ ou principalmente pelos fatores tróficos e de crescimento liberados por estes FL. Neste sentido, vem sendo sugerido que iMEF com reduzidas passagens possuem melhor capacidade de manter ESCs

indiferenciadas (Villa-Diaz *et al.*, 2009). Porém, estudos recentes demonstraram que linhagens imortalizadas de fibroblastos embrionários de camundongos e de fibroblastos humanos permitem a manutenção de hESCs indiferenciadas. Camarasa *et al.* (2009) utilizando três linhagens de iMEF mostraram que mesmo após 50 passagens, as iMEF eram capazes de manter diferentes linhagens de hESCs indiferenciadas (Camarasa *et al.*, 2009). Com o objetivo de evitar o contato com componentes de origem não-humana (xenocomponentes) em cultura, fibroblastos humanos foram imortalizados pela ativação de genes que regulam a atividade da telomerase e o ciclo celular. Adicionalmente os fibroblastos imortalizados foram modificados para aumentar a secreção de FGF β , sendo capazes de manter linhagens de hESCs indiferenciadas pelo menos por dez passagens (Unger *et al.*, 2009). Entre as diferentes FL humanas que vêm sendo estudadas, podemos destacar: células de cordão umbilical (Zhan *et al.*, 2008), fibroblastos da pele (Unger *et al.*, 2008) e fibroblastos obtidos da placenta (Ilic *et al.*, 2008).

Embora diversos estudos tenham utilizado FL de origem humana, parecem existir diferenças nos fatores secretados por estas células e por células de iMEF. Enquanto TGF-1 β foi encontrado nas mesmas concentrações nos dois tipos de FL, murino e humano, activina A foi detectada em grandes quantidades em meio condicionado de iMEF. Em contraste, FGF β foi encontrado em níveis elevados em meio condicionado de fibroblastos humanos (Eiselleova *et al.*, 2008). Apesar dos diversos estudos existentes, a interação de FL com ESCs ainda precisa ser melhor investigada a fim de compreender os sinais químicos envolvidos na manutenção de ESCs indiferenciadas.

A presença de xenocomponentes em cultura é um risco para a utilização de hESCs em terapias, já que o contato, principalmente em sistemas de cocultura

resulta em transferência de moléculas com poder imunogênico. Em 2005, Martin *et al.* (2005) detectaram a presença de um xenocomponente imunogênico, o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), em hESCs cocultivadas com iMEF. Embora iMEF não produzam microvesículas, hESCs são grandes formadoras e secretoras destas vesículas. Análise proteômica das vesículas obtidas de hESCs em cocultura com iMEF detectou proteínas relacionadas a tumores invasivos e fontes de xenoproteínas imunogênicas, como apolipoproteína, Neu5Gc e proteína Gap retroviral de camundongo (Kubikova *et al.*, 2009). Tanto iMEF como soro KSR™(soro com formulação definida para manutenção de ESCs) apresentam apolipoproteínas que contaminam as hESCs tornando-as imunogênicas e não adequadas para possíveis transplantes (Hisamatsu-Sakamoto *et al.*, 2008). O antígeno Neu5Gc parece desaparecer quando culturas são posteriormente cultivadas na ausência de xenocomponente (Heiskanen *et al.*, 2007), porém nenhum estudo foi realizado avaliando se os outros xenocomponentes também desaparecem, o que ainda seria um problema para aplicação das hESCs em modelos de terapia celular.

Meios condicionados enriquecidos com fatores de crescimento também se tornaram uma opção para manter ESCs indiferenciadas e ainda reduzem a quantidade de xenocomponentes no sistema (Navarro-Alvarez *et al.*, 2008). Além disso, culturas de hESCs sem FL são mais favoráveis a manipulações genéticas através de transfecção com plasmídeo, transfecção viral e/ou do silenciamento de genes através de RNA de interferência (siRNA) (Braam *et al.*, 2008).

As células-tronco embrionárias apresentam proliferação celular relativamente rápida, porém a amplificação destas populações visando uma possível aplicação clínica ainda precisa ser melhorada. Neste sentido o uso de microcarregadores para

culturas de hESCs mostrou ser eficaz na expansão em larga escala destas células no estado indiferenciado, além de reduzir os custos do procedimento (Phillips *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2009), proporcionando assim uma alternativa viável e segura para a ampliação destas culturas *in vitro*. Em culturas de mESCs a presença de LIF e FL são determinantes para a manutenção destas células no estado indiferenciado. Porém, recentemente foi observado que a utilização de uma metodologia com a utilização de sistema 3D simulando a microgravidade de 10^{-3} g manteve mESCs indiferenciadas na ausência de FL e LIF (Kawahara *et al.*, 2009).

A pluripotência e a capacidade de auto-renovação das células-tronco embrionárias estão relacionadas a fatores endógenos, como fatores de transcrição. Por exemplo, o fator de transcrição Oct-3/4, que é expresso no período pré-implantação do embrião, tem sua regulação diretamente relacionada com a pluripotência (Yeom *et al.*, 1996). Além disso, Oct-3/4 liga-se à região promotora do DNA promovendo a expressão de outros genes envolvidos na auto-renovação das células-tronco, como *Fgf* e *Rex1* (Zfp-42) (Ambrosetti *et al.*, 1997). Outros fatores relacionados com os estágios iniciais do desenvolvimento do embrião são o Sox2 e Nanog. Foi demonstrado ainda que Sox2 é capaz de regular a transcrição de Oct-3/4 e de Nanog. Além disso, quando blastocistos de camundongos ausentes para Sox2 são cultivados *in vitro* não se observa a formação de linhagens de células-tronco embrionárias, ocorrendo somente à diferenciação de células do trofoectoderma e do endoderma parietal (Avilion *et al.*, 2003; Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005). Resultados semelhantes aos obtidos com relação a Sox2 foram observados quando embriões livres de Nanog foram cultivados *in vitro*, resultando na ausência de MCI e na formação de somente células do endoderma parietal (Mitsui *et al.*, 2003). Tanto em mESCs como em hESCs a redução na expressão de Nanog leva a diferenciação

para células com fenótipos extraembrionários, mostrando que Nanog tem papel importante na pluripotência e na diferenciação de células-tronco embrionárias (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003).

Linhagens de ESCs de diferentes origens apresentam diferenças em relação ao seu cultivo, principalmente em relação aos fatores exógenos acrescentados ao meio de cultivo. Em culturas de mESCs a presença do LIF parece ser essencial para manutenção do estado indiferenciado (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). Já no caso de hESCs, LIF não é necessário para a manutenção do estado indiferenciado, já que nestas linhagens a ativação de STAT3, via receptor de LIF (LIFR) não é suficiente para prevenir a diferenciação (Daheron *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2004). Por outro lado, FGF β é necessário para manutenção das hESCs indiferenciadas. Neste caso, FGF β ativaria a fosforilação de ERK1/2 regulando o gene *c-Fos*, o qual está envolvido nos processos de proliferação e diferenciação celular (Amit *et al.*, 2000; Dvash *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005). Em mESCs, a ativação de ERK1/2 parece não manter as células indiferenciadas (Burdon *et al.*, 1999). Sendo assim, fatores exógenos parecem ativar as vias de sinalização intracelular de linhagens de ESCs de modo diferente, podendo induzi-las ao processo de diferenciação ou mantê-las no estado indiferenciado.

Como alternativa para uso de ESCs, recentemente, células somáticas e embrionárias de camundongo foram reprogramadas, induzindo estas células a apresentarem as muitas características semelhantes de ESCs (chamadas de células-tronco pluripotente induzidas - iPSCs) (Takahashi e Yamanaka, 2006). Utilizando a mesma metodologia, os mesmos quatro fatores de transcrição (Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc) foram inseridos em fibroblastos humanos da pele, formando colônias semelhantes às colônias de hESCs. As células destas colônias

expressaram marcadores de células indiferenciadas, diferenciaram-se em células dos três folhetos embrionários *in vitro* e formaram teratomas *in vivo* (Takahashi *et al.*, 2007). Usando a mesma combinação de fatores de transcrição, iPSCs humanas foram geradas a partir de células fetais, células de neonato e de fibroblastos primários de adultos (Park *et al.*, 2008). Em outro estudo foi proposta uma outra combinação de fatores transcrição (Oct-3/4, Sox2, Nanog e Lin28), que também resultou na formação de células pluripotentes a partir células somáticas humanas de neonatos e de fetos (Yu *et al.*, 2007). Todavia, as células pluripotentes geradas através da manipulação gênica possuem limitações quanto ao uso em terapias, já que resultaram de transfecção gênica por retrovírus ou lentivírus, cujo material genético integra-se a célula hospedeira. O uso de adenovírus, embora ainda possua a desvantagem de estimular o sistema imunológico, mostrou cerca de 20-30% de eficácia na geração de iPSCs murinas com os mesmos fatores utilizados por Takahashi *et al.* em 2007, tornando-se uma alternativa para a aplicação das iPSCs em terapias clínicas (Stadtfield *et al.*, 2008). Adicionalmente, o uso de plasmídeo para inserção do DNA complementar dos fatores de transcrição Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc, também surge como possibilidade para obtenção segura das iPSCs (Okita *et al.*, 2008). Células-tronco neurais humanas obtidas de tecido fetal mostraram ser mais induzíveis a formação de iPSCs, já que foi possível reprogramá-las utilizando apenas o fator Oct-3/4 através da infecção viral com retrovírus (Kim, *et al.*, 2009). Outras metodologias que evitam a incorporação do material genético de vetores vêm sendo descritas, incluindo o uso de vetor episomal e a utilização de peptídeos - CPP (Kim, *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). As iPSCs são excelentes alternativas de células-tronco pluripotentes devido a sua similaridade com ESCs, evitando problemas éticos como a utilização de blastocistos humanos.

1.3 - Diferenciação de células-tronco embrionárias em fenótipos neurais

A diferenciação de ESCs *in vitro* utilizando fatores extrínsecos, como fatores de crescimento e tróficos permitem além da especialização celular, a análise molecular das células isoladas, possibilitando avaliar vias intracelulares, fatores de transcrição e genes envolvidos durante o processo de diferenciação.

Células-tronco embrionárias são capazes de se diferenciar espontaneamente *in vitro* gerando células dos três folhetos germinativos. Para induzir a diferenciação espontânea, as ESCs são cultivadas em placas bacteriológicas ou tratadas com polímeros que inibem a adesão (cultura em suspensão) e na ausência de fatores que as mantêm no estado indiferenciado, como FGF β e LIF, dão origem a agregados celulares chamados de corpos embrióides (EBs). Estes EBs quando transferidos para placas de culturas diferenciam-se espontaneamente em células dos três folhetos germinativos (Martin, 1981; Odorico *et al.*, 2001). Embora a diferenciação espontânea gere cerca de 20-30% de células neurais, este número é ainda muito pequeno para possíveis terapias e as células neurais produzidas estão misturadas com outros tipos celulares (Schuldiner *et al.*, 2001). Para uma maior diferenciação de células com fenótipo neural a partir de ESCs, fatores extrínsecos podem ser empregados, guiando as ESCs para tipos celulares específicos do sistema nervoso, aumentando o rendimento de células neurais *in vitro* para posterior purificação.

A sinalização celular via Notch nas fases iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central mostrou ter um papel importante na proliferação e diferenciação celular (Lardelli *et al.*, 1996). Em modelos *in vitro* a sinalização de receptores para Notch ativam o gene sonic hedgehog (*Shh*) e o fator de transcrição

STAT-3, que estão envolvidos na sobrevivência e na diferenciação de ESCs em células neurais (Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2006). A depleção ou inibição de fatores envolvidos na manutenção do estado indiferenciado e/ou na diferenciação de células não neurais também podem ser utilizadas para enriquecer precursores de células neurais *in vitro*. A sinalização celular de Wnt ativa a via β -catenina que tem sido relacionada com vários mecanismos celulares, incluindo a autorenovação de células-tronco (Nusse, 2008). Assim a inibição dos sinais de BMP (relacionado com a diferenciação de células do mesoderma) e Wnt vem sendo utilizados como estratégia na obtenção de culturas enriquecidas com fenótipos celulares neurais a partir de ESCs (Lamb *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 2002).

O emprego do ácido retinóico (AR) em meio de cultura mostrou ser importante na diferenciação de células embrionárias de teratocarcinoma (P19) em células neurais, principalmente neurônios (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982; Bain e Gottlieb, 1994). O AR apresenta a mesma ação indutora em ESCs e vem sendo utilizado em diferentes protocolos de diferenciação para obtenção de fenótipos neurais (Bain *et al.*, 1995; Fraichard *et al.*, 1995; Bain *et al.*, 1996; Glaser e Brustle, 2005). O efeito do AR parece ser dose dependente, como observado em hESCs, já que altas concentrações deste componente, geram um maior número de neurônios (Schuldiner *et al.*, 2001). A ação do AR na indução da diferenciação para o fenótipo neuronal está correlacionada com a expressão de fatores de transcrição, como Pax6, envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso central (Gajovic *et al.*, 1997). Por outro lado, o tratamento com AR em células de carcinoma embrionário, além de favorecer a diferenciação para neurônios, também mostrou um incremento na morte celular por apoptose (Herget *et al.*, 1998), revelando limitações na obtenção de fenótipos neurais em larga escala.

Outros métodos de obtenção de culturas enriquecidas em células com fenótipos neurais a partir de ESCs também foram propostos. Por exemplo, precursores neurais foram obtidos quando hESCs sofreram diferenciação espontânea por três semanas, dando origem a áreas com células colunares, chamadas de rosetas neurais, as quais são áreas morfológicamente semelhantes ao neuroectoderma primordial. Estas áreas foram isoladas mecanicamente e plaqueadas em laminina gerando células que expressavam marcadores neurais como N-CAM, nestina e vimentina (Reubinoff *et al.*, 2000). A utilização de meios definidos para obtenção de progenitores neurais a partir de hESCs também foi avaliada. Meio de cultura foi suplementado com FGF β e um conjunto de componentes (insulina, transferrina, selenito de sódio, progesterona, putrescina) conhecido comercialmente como suplemento N2 (Bottenstein e Sato, 1979), gerando um maior número de rosetas neurais que posteriormente foram isoladas com tratamento enzimático com dispase (Zhang *et al.*, 2001). Este protocolo permitiu o isolamento de precursores neurais, capazes de formar neurônios, astrócitos e oligodendrócitos quando induzidos com PDGF.

1.3.1- Diferenciação de células-tronco embrionárias em neurônios dopaminérgicos

A combinação de AR com outros componentes pode ampliar o número de células neurais, pela inibição da morte celular ou pelo aumento da proliferação dos progenitores gerados. Neste sentido, neurônios dopaminérgicos foram obtidos a partir de hESCs através da adição de BDNF ou TGF- α em combinação com AR e FGF β . Culturas de hESCs foram mantidas por 21 dias, gerando cerca de 20% de neurônios que expressam tirosina hidroxilase, enzima fundamental para síntese de

dopamina (Park *et al.*, 2004). O sistema de cocultura também mostrou ser eficiente na diferenciação de hESCs em neurônios dopaminérgicos. Neste caso, células de estroma de medula óssea (MS-5), que superexpressam ou não Wnt1, em combinação com diversos fatores, incluindo BDNF, Shh, GDNF, FGF8 e TGF- β 3, induziram a diferenciação de hESCs em neurônios dopaminérgicos *in vitro* (Perrier *et al.*, 2004). Diferenciação em células neurais incluindo elevado número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase também foi alcançada quando hESCs foram cocultivadas com células PA6 (células de estroma de camundongo), tendo seu efeito inibido quando BMP4 foi introduzido ao sistema (Zeng *et al.*, 2004; Brederlau *et al.*, 2006). Recentemente, um estudo da análise gênica por microarranjo detectou quatro fatores (SDF-1; PTN, pleiotrofina; IGF-II; e EFNB1, eferina B1) liberados em conjunto pelas células PA6 como responsáveis pela diferenciação de neurônios dopaminérgicos a partir de ESCs (Vazin *et al.*, 2009). Com maior eficiência, Cho *et al.* (2008), usando metodologia para isolar progenitores neurais através da formação de esferas em conjunto com a combinação de diferentes fatores, desenvolveram um protocolo para gerar neurônios dopaminérgicos, com aproximadamente 92% de células expressando tirosina hidroxilase (Cho *et al.*, 2008a; Cho *et al.*, 2008b). Outras combinações de fatores para guiar ESCs a se diferenciar em neurônios dopaminérgicos também foram propostas incluindo a presença de GDNF e Noggin (Buytaert-Hoefen *et al.*, 2004; Sonntag *et al.*, 2007; Chiba *et al.*, 2008)

1.3.2 - Diferenciação de células-tronco embrionárias em motoneurônios

O isolamento e cultivo de rosetas, obtidas previamente através da indução de hESCs com suplemento N2 e heparina, originou culturas enriquecidas de células

com fenótipo neural. Estas células foram cultivadas na ausência de soro e na presença de AR e Shh dando origem a motoneurônios com atividade eletrofisiológica que expressam colina acetiltransferase e proteínas de vesículas transportadoras de acetilcolina (Li *et al.*, 2005). A sinalização via a proteína Shh é bem caracterizada para o desenvolvimento de estruturas ventrais no sistema nervoso, sendo fundamental na diferenciação de ESC em neuroectoderma (Maye *et al.*, 2004). Recentemente, purmofamina, um fármaco que induz a diferenciação em células ósseas, mostrou-se eficaz em substituir AR e Shh na indução da diferenciação para motoneurônios a partir de hESCs. Neste protocolo após duas semanas sem fatores morfogênicos foi adicionado AR e Shh ou purmofamina obtendo-se em ambos os protocolos para motoneurônios funcionais (Hu e Zhang, 2009). Outros tipos de neurônios também foram gerados a partir de ESCs como neurônios serotoninérgicos (Lee *et al.*, 2000; Alenina *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009), GABAérgicos (Chatzi *et al.*, 2009) e neurônios cerebelares, incluído células de Purkinje (Paredes *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2009).

1.3.3 - Diferenciação de células-tronco embrionárias em neurônios da retina

A retina é considerada parte do sistema nervoso central. Sua estrutura e os componentes celulares já estão bem descritos tornando-se excelente modelo para protocolos de diferenciação de ESCs. Diversos grupos têm publicado protocolos para diferenciar ESCs em progenitores e neurônios da retina. Trabalhos de Aoki *et al.* (2006, 2007 e 2008) vêm mostrando a diferenciação e integração de mESCs previamente diferenciadas através da cocultura com células de estroma PA6. Estas células após serem transplantadas se diferenciam em células ganglionares da retina, *in vitro* e *in vivo*, principalmente em retinas de camundongos que sofreram perda

destas células devido à injeção intravítrea de NMDA um agonista do glutamato. Embora as células se integrem a retina e sobrevivam por longos períodos após o transplante não foi possível detectar potenciais visuais evocados (Aoki *et al.*, 2006; 2007; 2008).

A utilização de fatores extrínsecos para guiar o processo de diferenciação ao fenótipo de progenitores de neurônios da retina também vem sendo estudado (Ikeda *et al.*, 2005; Lamba *et al.*, 2006; Osakada *et al.*, 2008; Jagatha *et al.*, 2009). Em mESCs, Ikeda *et al.* (2005) mostraram uma indução eficiente de progenitores da retina utilizando uma combinação de antagonista de Wnt (Dkk1), de Nodal (LeftA) e de Activina-A. A combinação destes três fatores foi capaz de gerar cerca de 25% de colônias imunopositivas para Rx e Pax6, ambos expressos em progenitores neuronais da retina. Quando estes progenitores foram cocultivados com retina embrionária se diferenciaram e expressaram recoverina e rodopsina, marcadores de fotorreceptores (Ikeda *et al.*, 2005).

A combinação de inibidores de BMP e Wnt ou a combinação de antagonistas Nodal e de Wnt também foram utilizados em hESCs guiando a diferenciação em progenitores de neurônios da retina e fotorreceptores (Lamba *et al.*, 2006; Osakada *et al.*, 2008). Neste sentido, corpos embrióides foram formados durante três dias combinando noggin (inibidor de BMP), DKK1 (inibidor de Wnt) e IGF-1. Em seguida foram transferidos para suporte de Matrigel® e mantidos durante três semanas no mesmo meio de cultura suplementado com FGFβ. Embora o protocolo descrito por Lamba *et al.* tenha obtido cerca de 82% de células com expressão de progenitores da retina, o número de células que expressam s-opsina e rodopsina (marcadores de fotorreceptores) foi muito baixo, cerca de 0,01% (Lamba *et al.*, 2006). A utilização de inibidor de Wnt e Nodal seguida da combinação de FGFα, FGFβ, taurina, Shh e AR

foi capaz de aumentar o número de células que expressam rodopsina gerados a partir de hESCs (Osakada *et al.*, 2008).

1.3.4 - Diferenciação de células-tronco embrionárias em células da glia

Células da glia, principalmente oligodendrócitos, também são alvos de diferenciação a partir de ESCs, visando terapias celulares em doenças desmielinizantes. Em protocolos clássicos de diferenciação, como a utilização do AR, o número de oligodendrócitos gerados é baixo. Sendo assim, como visto para determinados tipos de neurônios, metodologias de enriquecimento de oligodendrócitos vêm sendo desenvolvidas.

Neste sentido, o tratamento com AR em conjunto com meio enriquecido com suplemento N2 gerou progenitores de oligodendrócitos. Estes progenitores foram deslocados da placa de cultura sob leve agitação e então recolhidos no sobrenadante (Liu *et al.*, 2000). Outros fatores extrínsecos também vêm sendo empregados para enriquecimento de oligodendrócitos *in vitro*. Interleucina-6 ligada a uma forma solúvel do seu receptor foi capaz de promover a diferenciação de ESCs em oligodendrócitos via glicoproteína 130 (Zhang *et al.*, 2004). Em hESCs, oligodendrócitos foram gerados através de várias etapas de diferenciação, com diferentes combinações de componentes extrínsecos. Progenitores de oligodendrócitos foram isolados através de seleção mecânica por leve agitação em meio enriquecido com EGF (Nistor *et al.*, 2005). Em metodologia mais simples e mais eficiente, rosetas neurais foram isoladas de hESCs previamente induzidas com suplemento ITSF, gerando precursores neurais que foram então guiados a diferenciar-se em progenitores de oligodendrócitos sobre influência dos fatores de crescimento EGF e PDGF. Após ampliação destes progenitores, o hormônio T3 foi

adicionado ao sistema de cultivo na ausência de mitógenos para amadurecimento dos oligodendrócitos (Kang *et al.*, 2007). Proteínas da matriz extracelular também estão envolvidas no favorecimento da diferenciação de oligodendrócitos a partir de hESCs. A indução inicial com Shh, AR e noggin seguida de transferência para suporte com vitronectina gerou progenitores de oligodendrócitos *in vitro*, capazes de proliferar e amadurecer sobre influência de mitógenos (Gil *et al.*, 2009). Recentemente a combinação de dois componentes, o HGF e o suplemento G5 (insulina, tranferrina, selenito de sódio, biotina, hidrocortisona, FGF β e EGF) também gerou oligodendrócitos a partir de hESCs. Neste protocolo, após indução inicial com estes dois componentes, foram formados agregados celulares em suspensão e mantidos durante um mês com HGF. Ao final foram geradas células que expressavam O4 e MBP, ambos marcadores de oligodendrócitos (Hu *et al.*, 2009).

1.4 - Cisteína proteases e inibidores de cisteína proteases na proliferação e diferenciação de progenitores neurais

Cisteína proteases (EC 3.4.22) pertencem a uma classe de proteases que possuem um mecanismo comum de catálise que envolve o radical tiol e um sítio ativo conservado composto por resíduos de cisteína e histidina. Cisteína proteases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e foram descritas primeiramente a partir do isolamento da papaína a partir do extrato da fruta papaia. Entre as cisteína proteases de mamíferos as calpaínas, catepsinas e caspases vêm recebendo maior atenção, devido ao seu papel na fisiopatologia de diversas enfermidades.

A atividade proteolítica das calpaínas é tipicamente limitada e normalmente se apresenta inativa, sendo ativada por íons cálcio e fosfolipídeos (Saido *et al.*, 1992).

Sua atividade é regulada pelo nível de compartimentalização da enzima e pela calpastatina, seu inibidor endógeno. Calpaínas têm sua atividade considerada máxima em pH neutro e têm sido relacionadas com diversos eventos celulares. Dependendo da maneira que são ativadas e do tipo celular envolvido, sua ação pode ser intracelular, ser liberada para a matriz extracelular e/ou ser translocada para o núcleo levando a proteólise de proteínas nucleares e fatores de transcrição (Goll *et al.*, 2003).

As catepsinas são um amplo grupo de proteases geralmente lisossomais também envolvidas em diferentes eventos celulares. Em humanos já foram descritas onze catepsinas com atividade de cisteína proteases, entre elas podemos citar as catepsinas H, B, S, F e L. Com exceção da catepsina S, todas catepsinas humanas possuem ótima atividade em pH ácido, sendo compatível com a atividade do lisossomo. Em mamíferos as catepsinas estão envolvidas em diversos eventos celulares como apresentação de antígeno, degradação de proteínas durante a reciclagem e maturação hormonal, entre outras (Lecaille *et al.*, 2002).

Caspases são cisteína proteases que inicialmente foram descritas como ativadoras de citocinas próinflamatórias e em seguida foram mais amplamente estudadas no processo de morte celular por apoptose. Em mamíferos estão reunidas em um grupo de quatorze caspases, as quais sete delas estão envolvidas com a morte celular. De acordo com a posição hierárquica da sua atividade proteolítica pode ser divididas em iniciadoras e executoras. Sua atividade é dependente de ativação que pode ser através de duas vias diferentes: extrínseca, iniciada por receptores; e intrínseca relacionada com o dano mitocondrial. Estão dispersas no citoplasma, agindo em pH neutro e uma vez ativadas possuem ação proteolítica clivando o citoesqueleto. Uma vez translocadas para o núcleo, ativam

endonucleases que clivam o DNA em múltiplos pares de bases com tamanho entre 180 e 200 pares de base (Feinstein-Rotkopf *et al.*, 2009).

As cisteína proteases apresentam inibidores endógenos. Entre os inibidores endógenos a calpastatina é inibidor específico das calpaínas. Distribuída em diversos tipos celulares possui ação regulatória em função da atividade proteolítica desta cisteína protease. Outro inibidor endógeno são as cistatinas (Cys). Cistatinas constituem uma superfamília dividida em três tipos. As cistatinas do tipo 1 perdem a ligação dissulfeto e inibem principalmente cisteína proteases intracelulares. As cistatinas do tipo 2 possuem duas ligações dissulfeto e geralmente são secretadas para o meio extracelular. Todavia, recentemente foi mostrado que um membro desta família, a cistatina C (CysC), foi internalizada em células tumorais (Ekstrom *et al.*, 2008). As cistatinas do tipo 3 de alto e baixo peso molecular contém cópias das seqüências das cistatinas do tipo 2. Cistatinas inibem catepsinas e as papaínas, porém não inibem as calpaínas, com exceção quando altas concentrações de cistatinas do tipo 3 são utilizadas. Muitos inibidores orgânicos de cisteína proteases já foram descritos, como leupeptina, antipaina e N-etilmaleimida, porém quando utilizados em ensaios *in vitro* são tóxicos ou agem em outras proteases como serina proteases (Katunuma e Kominami, 1995). O inibidor sintético de cisteína proteases E64 (trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamido-(4- Guanidino) Butano) tem ação irreversível e específica sobre cisteína proteases, é capaz de inibir catepsinas uma hora após ser administrado *in vivo* e ainda possui reduzida toxicidade em células de mamíferos (Barrett *et al.*, 1982; Hashida *et al.*, 1982; Katunuma e Kominami, 1995; Figura 3).

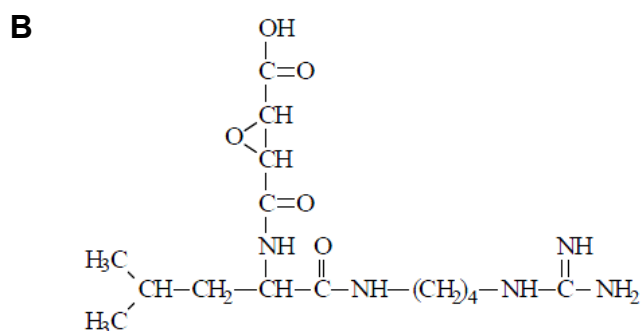
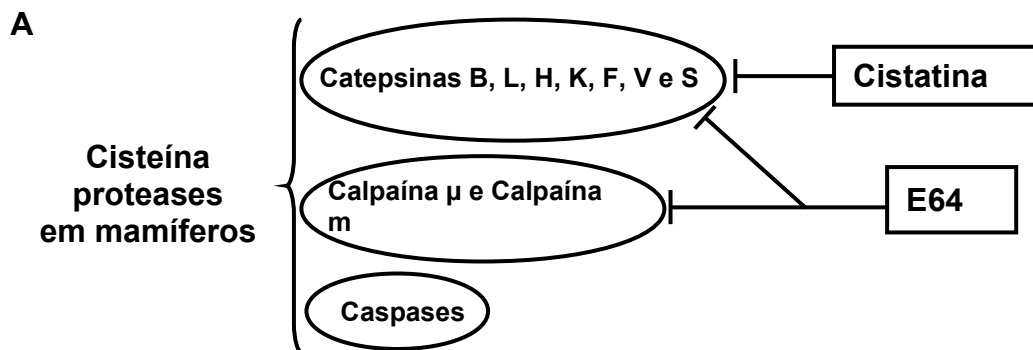


Figura 3. Cisteína proteases de mamíferos e estrutura química do E64. As cisteína proteases encontradas em mamíferos são divididas em três grupos, contendo vários membros. Em mamíferos, as cistatinas inibem as catepsinas enquanto o inibidor E64 inibe as catepsinas e as calpaínas. As caspases possuem outros mecanismos de ativação e de inibição (A). Estrutura química do trans epoxissuccinil-L-leucilamido-(4 guanidino)-butano/E64 (B).

A inibição de cisteína proteases vem sendo estudada em diversos eventos biológicos como na morte celular, na migração celular, no processo inflamatório, na interação parasito-hospedeiro e na diferenciação celular. A CysC foi detectada em diferentes tecidos do corpo e durante o período de implantação do embrião no útero ocorre o aumento da sua expressão pelas células da decídua mostrando uma relação com as proteases liberadas pelo trofoblasto. O papel dos inibidores de cisteína proteases durante a implantação foi comprovado após o E64 ser injetado em fêmeas de camundongo grávidas impedindo a nidação (Afonso *et al.*, 1997). Adicionalmente, fatores de crescimento TGF β e EGF regulam positivamente a expressão do gene da CysC de células da decídua *in vitro*. Assim, os inibidores de proteases podem ser liberados e/ou ativados em resposta a ação de fatores de crescimento. Isto indica que outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação da atividade de inibidores de proteases (Afonso *et al.*, 2002).

No sistema nervoso, a CysC já foi detectada no plexo coróide, em neurônios e astrócitos hipotalâmicos (Thomas *et al.*, 1989; Yasuhara *et al.*, 1993). A redução da sua expressão está relacionada com doenças degenerativas, como Alzheimer (Benussi *et al.*, 2003; Ghidoni *et al.*, 2007). A expressão de CysC também foi detectada em células ganglionares, em neurônios fotorreceptores e no epitélio pigmentar da retina. O balanço da expressão de catepsinas e CysC durante o desenvolvimento da retina é importante no remodelamento da matriz extracelular permitindo a formação das camadas celulares da retina (Ahuja *et al.*, 2008). O aumento da expressão da CysC e das catepsinas B, L e S está envolvida com o estresse oxidativo. Em modelo de degeneração macular da retina, onde camundongos foram expostos a condição de hiperóxia ambos os mRNA da catepsina e CysC tiveram a expressão aumentada (Alizadeh *et al.*, 2006). Assim

cisteína proteases e seus inibidores são expressos em células do sistema nervoso, participando dos mecanismos das doenças degenerativas e do desenvolvimento embrionário.

O papel das cistatinas também foi avaliado em células-tronco neurais. Cistatinas foram detectadas no tecido neuroepitelial embrionário, em células endimárias e subendimárias da parede do ventrículo lateral de ratos adultos. Cistatina B, um membro da família tipo 1 das cistatinas foi detectada em células-tronco neurais isoladas e mantidas *in vitro* da parede do ventrículo lateral e do hipocampo (Brannvall *et al.*, 2003). Cistatina C também é expressa e secretada por células-tronco neurais e sua ação autócrina/parácrina parece estar relacionada com a especificação de células gliais (Cai *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2007). A expressão deste inibidor endógeno em progenitores de astrócitos parece ter uma relação com a expressão de GFAP, sendo expresso antes de GFAP quando estas células são tratadas com TGF β . A ação parácrina da CysC parece guiar estes progenitores gliais para diferenciação em astrócito regulando a expressão de GFAP e impedindo a diferenciação em oligodendrócitos (Kumada *et al.*, 2004). CysC também está relacionada com a proliferação de progenitores neurais do hipocampo. Em cooperação com FGF β aumentou a proliferação de progenitores neurais do hipocampo *in vivo* e *in vitro* (Taupin *et al.*, 2000). Embora Taupin *et al.* (2000) tenham sugerido que apenas a porção N-glicosilada da CysC seria capaz de induzir a proliferação dos progenitores neurais, estudos mais recentes mostraram que outras isoformas, tanto N como O-glicosiladas também seriam capazes de induzir a proliferação dos progenitores neurais e ainda, que o mecanismo celular envolvido parece ser independente de atividade enzimática (Taupin *et al.*, 2000; Dahl *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2007).

Em 2006, Kato *et al.* investigando o meio condicionado de neuroesferas (agregados esféricos de células-tronco neurais) identificaram, em uma fração de moléculas de peso molecular menor que 20kDa, a presença da CysC. Quando trataram mESCs com o recombinante de camundongo deste inibidor endógeno das cisteína proteases observaram uma potente indução para diferenciação em células neurais. Portanto, a CysC parece ter um envolvimento na proliferação de progenitores neurais e na diferenciação de mESCs em células neurais. Entretanto, ainda não está claro se sua glicosilação é a chave do mecanismo para induzir a proliferação e a diferenciação celular. Novos estudos precisam ser realizados para melhor compreendermos os mecanismos moleculares da CysC e de outros inibidores de proteases na diferenciação de células neurais.

Fatores extrínsecos são ferramentas importantes para o estudo da diferenciação celular, podendo contribuir para esclarecer os eventos celulares durante o desenvolvimento embrionário. Apesar da importância dos inibidores de proteases no desenvolvimento embrionário, poucos trabalhos têm avaliado o seu papel durante o processo de diferenciação em células-tronco embrionárias. Nenhum trabalho avaliou se a inibição de cisteína proteases de mESCs induz a diferenciação em células neurais *in vitro*. Além disso, ainda não foi investigado o papel neurodiferenciador da CysC em hESCs. Sendo assim, o estudo que será desenvolvido nesta tese de doutorado pode gerar um novo protocolo de diferenciação de ESCs em células neurais através da inibição de cisteína proteases, sugerindo um papel ainda não descrito das mesmas na diferenciação celular.

2 - OBJETIVO GERAL

Neste estudo visamos verificar o possível papel do inibidor sintético de cisteína proteases E64 na diferenciação de mESCs em células com fenótipo neural. Adicionalmente, investigamos se o E64 e o recombinante humano da cistatina C induzem a diferenciação de hESC em células neurais.

2.1 – Objetivos Específicos:

- Avaliar o protocolo descrito por Fraichard *et al.* (1995) de diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo (linhagem USP-1) em células neurais, utilizando a linhagem celular USP-1 e o meio Neurobasal® suplementado com B27, para o enriquecimento neuronal.
- Avaliar se a inibição de cisteína proteases com E64 induz a diferenciação de mESC em células neurais.
- Avaliar se o recombinante cistatina C humana é capaz de induzir a diferenciação de hESCs em células neurais.
- Avaliar se o tratamento com o inibidor de cisteína proteases E64 induz a diferenciação de hESCs em células neurais.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Cultura de Células

3.1.1 - Fibroblastos embrionários de camundongo

Todos os procedimentos com animais seguiram as normas e a aprovação (IBCCF 045) da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde (CEUA-CCS).

Fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) foram obtidos de camundongos C57Black/6 no período embrionário de 14 dias (E-14). Para isto, fêmeas grávidas foram sacrificadas e os úteros inteiros removidos para uma placa de Petri com tampão fosfato 10 mM pH 7,4 (PBS do inglês *Phosphate Buffer Solution*). Em seguida, os embriões foram retirados e transferidos para uma placa contendo meio DMEM-F12 (Invitrogen, CA - USA). Em ambiente estéril, os embriões foram dissecados, retirando a cabeça e todas as vísceras. O tecido restante foi picotado e dissociado com tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen) por cinco minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado o dobro do volume da amostra de meio MEF [DMEM-F12 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen) e 2 mM de glutamina]. O material foi mantido a temperatura ambiente por aproximadamente dez minutos para decantar os fragmentos de tecido restantes. Após coletar o sobrenadante o material foi centrifugado a 300 g por cinco minutos e o sedimento foi ressuspensionado em meio MEF e as células contadas em câmara de Neubauer. As células foram transferidas para placas de cultura de 100 mm na proporção de $5,5 \times 10^6$ células/placa e mantidas em ambiente úmido a 37°C com 5% de CO₂ para ampliação em até cinco passagens. As células foram então congeladas em SFB com 5% de dimetil sulfoxido (DMSO – Merck, RJ- Brasil) e mantidas em nitrogênio líquido.

Para utilização em cocultura com ESCs, o ciclo mitótico das MEFs foi inativado. As células foram lavadas três vezes com PBS e posteriormente foi adicionado meio DMEM-F12 com 30 μ M de Mitomicina C (Sigma – Aldrich, MO - USA). As células foram incubadas por 3 horas a 37 C° em 5% de CO₂. Ao fim de novo ciclo de três lavagens com PBS foi adicionado meio MEF e as células foram mantidas até o dia seguinte para uso com as ESCs. Alternativamente as células foram γ -irradiadas com 4.000 rad em DMEM-F12 em colaboração com Instituto Nacional do Câncer (INCA). As MEFs γ -irradiadas foram congeladas seguindo o mesmo protocolo de congelamento descrito acima ou transferidas para placas de cultura de 35 mm ou de seis poços na proporção de $5,5 \times 10^5$ células/poço. Neste texto será adotada a nomenclatura iMEF quando as células sofreram inativação por Mitomicina C e γ MEF quando as células foram inativadas pela radiação γ .

3.1.2 - Linhagens de células-tronco embrionárias humanas

Células-tronco embrionárias humanas - linhagem H1 (hESCs-H1) foram cultivadas em colaboração com o Dr. Thomas Reh no *Stem Cells Core of the Institute of Regenerative Medicine – University of Washington* (Seattle, WA – USA). As células foram mantidas em placas de cultura com 1% de gelatina (Invitrogen) em cocultura com γ MEF e em meio hESC [DMEM/F12 suplementado com 25% de soro Knockout™ SR, 1% HEPES, 1% NEAA (do inglês *non-essential amino acid*), 0,7% β -2 mercaptoetanol, 2 mM de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, 4 ng/mL de FGF β (todos adquiridos da Invitrogen) e 16 mM de glicose (Sigma)]. Alternativamente hESCs-H1 foram cultivadas sobre Matrigel (BD Biosciences) em meio condicionado de γ MEF (MC γ MEF). O MC γ MEF foi obtido cultivando γ MEF em

meio hESC e coletando o sobrenadante todos os dias durante uma semana. Ao final foi adicionado 8 ng/mL de FGF β .

As culturas foram passadas com colagenase e dispase (Gibco/Invitrogen). Para isto, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas 2x com DMEM. Em seguida foi adicionada 1 mg/mL de colagenase e dispase em DMEM e a cultura incubada a 37° C com 5% CO₂ durante 3 a 5 minutos. Em seguida as enzimas foram aspiradas e as células lavadas 2x com DMEM. Após lavagem, foi adicionado 2 mL de meio hESC e as células foram deslocadas mecanicamente com pipeta de 5 mL. Todo o conteúdo foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e as colônias foram dissociadas com pipeta. As células foram então transferidas na proporção de 2,5 x 10⁵ células/poço com γ MEF previamente plaqueados e mantidas a 37° C em 5% CO₂.

3.1.3 - Linhagens de células-tronco embrionárias de camundongo

Células-tronco embrionárias de camundongo – linhagem USP1 (Sukoyan *et al.*, 2002) foram doadas pela Dra. Lygia Pereira (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – SP). As células foram mantidas indiferenciadas em placa de cultura com 0,1% de gelatina (Sigma) em cocultura com iMEF em meio mESC [DMEM - High glucose (DMEM-hg) suplementados com 10% de SFB, 2 mM de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina e LIF recombinante (doado pelo Dr. Steven K. Rehen – Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ) na proporção de 1:100]. Para ampliação, as células foram lavadas 1x com PBS e dissociadas com a enzima TrypLE (Invitrogen) por aproximadamente 5 minutos a 37°C com 5% de CO₂. As células foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL contendo igual volume de meio mESC e o material foi centrifugado a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi

desprezado e as células sedimentadas foram ressuspensas em novo meio mESC. As células foram transferidas na proporção de 1:3 com iMEF previamente plaqueados e mantidas a 37° C com 5% CO₂.

3.2 – Indução da diferenciação de mESC em células neurais com AR

Para diferenciação foi adotado um protocolo de indução semelhante ao descrito por Fraichard et. al (1995). As colônias de mESC foram dissociadas com TrypLE após 48 horas do início das culturas. As células dissociadas foram transferidas na proporção de $5,0 \times 10^5$ células/poço previamente tratados com Poli 2-hidroxietil metacrilato (Poli-HEMA – 10 mg/mL – Sigma) para formação dos EBs em DMEM-hg suplementado com 10% de SFB na ausência de LIFr e na presença de 5 µM de AR (AR).

Em seguida os EBs foram transferidos para lamínulas ou para placas de cultura tratadas com Poli-L-lisina (10 µg/mL) e laminina (20 µg/mL – Invitrogen). Os EBs que aderiram foram mantidos em meio Neurobasal (Invitrogen), suplementado com B27 (Gibco/Invitrogen), 16 mM de glicose e incubadas a 37°C em 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três ou quatro dias. Em culturas confluentes foi realizada dissociação enzimática com TryPLE na proporção de 1:3. Após 16 dias de cultura metade do meio foi trocado diariamente até completar 24 dias.

3.3 – Tratamento de mESC com trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamido-(4-Guanidino) Butano – E64

O inibidor de cisteína protease trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamido-(4-Guanidino) Butano – E64 (Sigma) foi diluído em DMEM na concentração final de 1M e estocado a -20°C. Após sofrer dissociação enzimática, mESCs indiferenciadas

foram transferidas para placas de cultura previamente tratadas com Poli-HEMA para formação de EBs, sendo mantidas em DMEM-hg suplementado com 10% de SFB, e E64 (nas concentrações: 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1,0 μ M, 5,0 μ M e 10 μ M) na ausência de LIFr. Após dois dias, os EBs foram transferidos para lamínulas ou placas de culturas e as células mantidas em meio Neurobasal como descrito acima (subitem 3.2). As células foram processadas em diferentes tempos de cultura (Figura 4):

1. 1º dia do protocolo: os EBs gerados foram contados e o diâmetro foi medido. Em seguida os EBs foram transferidos para placas aderentes ou processados para *imunoblotting*.

2. 3º dia do protocolo: após três dias em lamínula as células foram fixadas para imunocitoquímica.

3. 14º dia do protocolo: as células foram fixadas para imunocitoquímica, processadas para *imunoblotting* ou para RT-PCR e PCR em tempo real.

4. 24º dia do protocolo: as células foram fixadas para imunocitoquímica e para registros eletrofisiológicos.

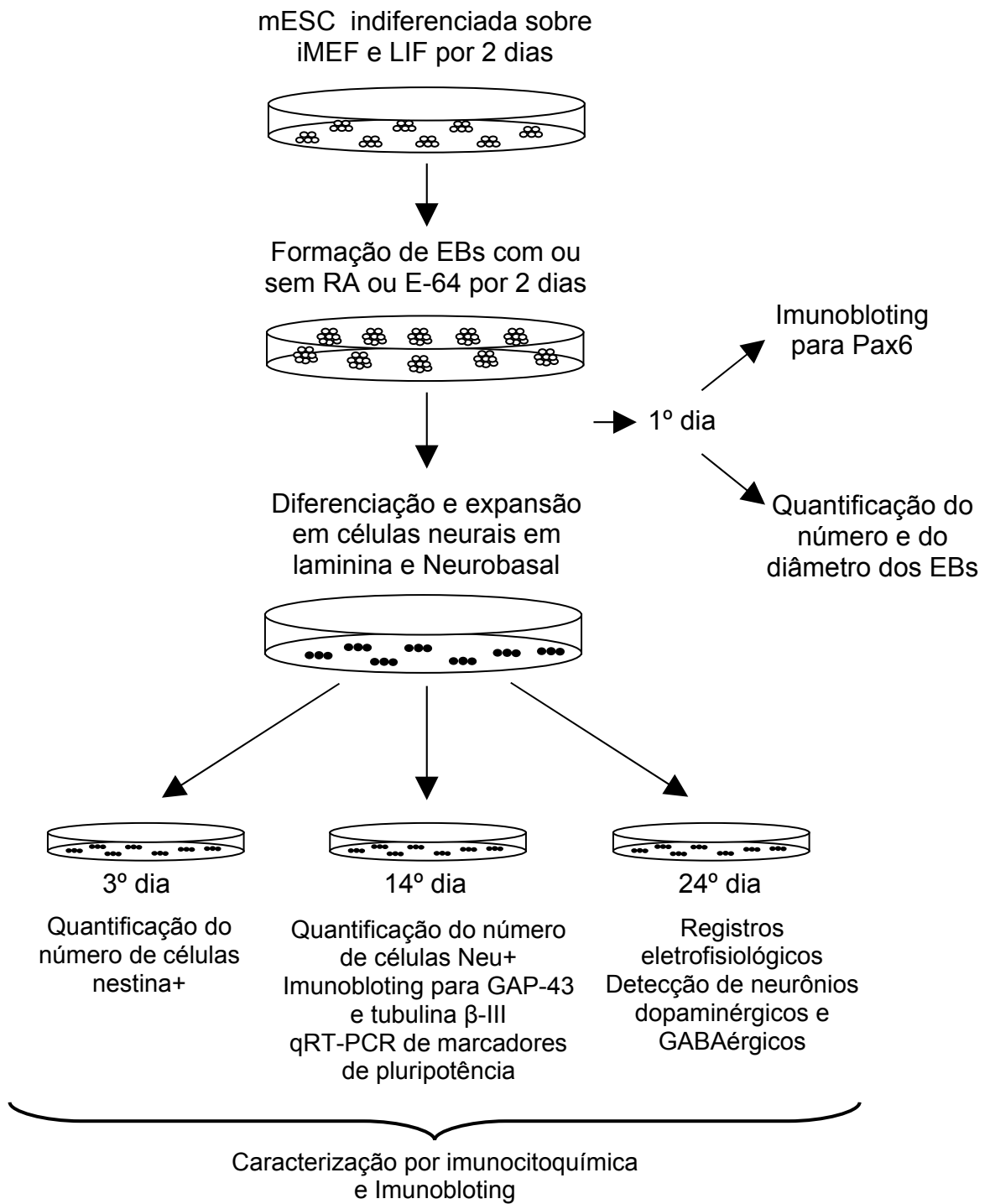


Figura 4. Esquema ilustrativo do protocolo de diferenciação de mESC em linhagens neurais.

3.4 – Tratamento da hESC-H1 com E64 e Cistatina C

A linhagem de hESC - H1 foi mantida indiferenciada por 4 ou 5 dias. Em seguida as células sofreram dissociação com colagenase e dispase (1 mg/mL) como descrito acima (item 3.1.2). As células foram ressuspensas em meio hESC porém com 10% de KSR e sem FGF β (meio EB-H1). Foram adicionados a este meio duas concentrações de E64 (5 μ M ou 10 μ M) ou 20 ng/mL de recombinante de cistatina C humana (hCysC – R&D Systems). Em seguida as células foram transferidas na proporção de 1:2 e mantidas em placas de cultura com baixa aderência por quatro dias a 37° C com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias. Em seguida, os EBs foram transferidos para placas previamente tratadas com Matrigel® (BD Biosciences). As células foram então mantidas por duas semanas em meio de diferenciação (DMEM-F12 acrescido de 1,25% de albumina de soro bovino (BSA do inglês *bovine serum albumin*), suplementos B27 e N2, 4ng/mL de β FGF, 16mM de glicose, 0,5% de HEPES, 1% de NEEA e 1% de penicilina/estreptomicina. O meio foi trocado a cada dois dias durante a primeira semana e na segunda semana metade do meio foi trocado todos os dias. As células foram processadas no final de cada semana para avaliação de marcadores neurais por PCR em tempo real. Adicionalmente, no final da segunda semana as células foram deslocadas mecanicamente e transferidas para lamínulas previamente tratadas com Matrigel® e mantidas em cultura por mais uma semana para imunocitoquímica (Figura 5).

Alternativamente, EBs foram gerados e mantidos por duas semanas em meio EB-H1 com as duas concentrações de E64 (5 μ M ou 10 μ M) ou com 20 ng/mL de CysC. O meio foi trocado a cada dois dias e ao final os EBs foram fixados para imunocitoquímica.

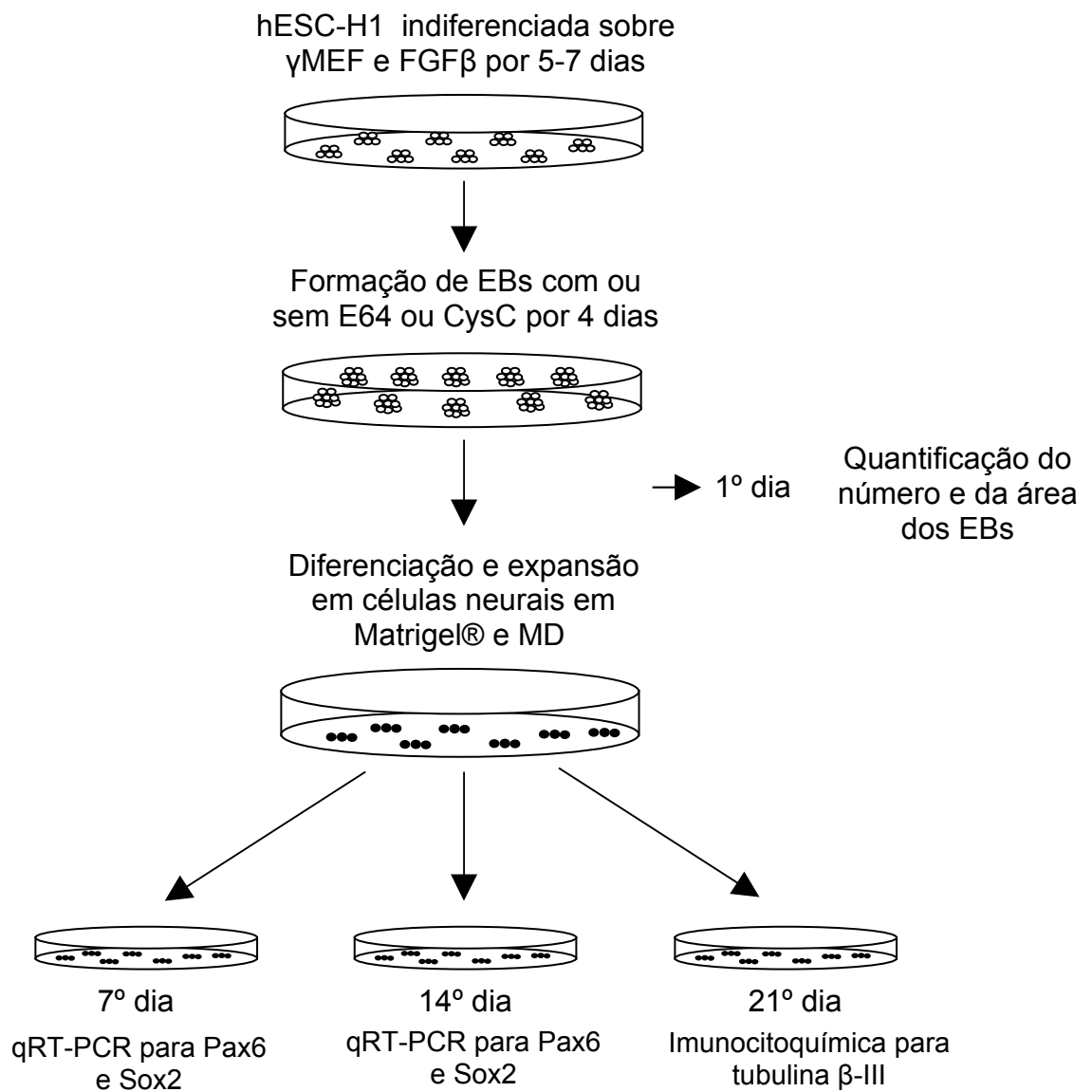


Figura 5. Esquema ilustrativo do protocolo de diferenciação de hESC em linhagens neurais.

3.5 – Análise do número e do diâmetro dos corpos embrióides

Os EBs formados a partir de mESCs foram fotografados em campo escuro em microscópio invertido Zeiss Axiovert 135 acoplado ao sistema AxioCam HCR (Zeiss). O diâmetro e o número dos EBs formados foram analisados através do programa da Axiovision 3.1.1.1 SP4 (Zeiss) nas diferentes condições estudadas.

Os EBs gerados de hESC-H1 e formados por duas semanas foram fotografados em campo escuro em microscópio invertido Axio Observet A1m acoplado ao sistema AxioCam (Zeiss) de captura de imagem. A área e o número de EBs formados foram analisados através do programa Image J (NIH).

3.6 – Quantificação de número de células nestina e NeuN positivas

Para quantificar o número de células positivas para nestina e NeuN, de três a cinco EBs foram transferidos para lamínulas tratadas com poli-D-lisina e laminina. Após 3 dias ou 14 dias as células foram fixadas e processadas para imunocitoquímica. As lamínulas foram fotografadas e as imagens foram então analisadas pelo programa Image J (NIH). Foram quantificadas as células positivas para nestina e coradas com DAPI que estavam fora de cada explante de EB. Foram realizadas médias das razões entre as células positivas para nestina e coradas com DAPI de três EBs por lamínula, considerando-se cada lamínula n=1.

Na quantificação de células positivas para NeuN, foi adotada a mesma estratégia de quantificação, porém foram contabilizadas somente as células dentro do explante dos EBs, desprezando-se as células fora do explante. Neste caso, escolhemos a área do explante de EB em que observávamos o maior número de células positivas para nestina. A área foi fotografada utilizando-se mesmo nível focal para as células positivas para NeuN e coradas com DAPI (4', 6-diamidino-2-

fenilindole - Sigma). Em seguida estas células foram quantificadas. As imagens dos diferentes grupos analisados foram obtidas no mesmo dia.

3.6 - Imunocitoquímica

Para o processamento imunocitoquímico as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em duas etapas. Primeiramente, a metade do sobrenadante do meio de cultura foi desprezada, adicionando-se igual volume de paraformaldeído a 4% e incubando por 10 minutos a 37°C. Em seguida, desprezou-se todo o sobrenadante e foi adicionado novamente paraformaldeído a 4% incubado por mais 10 minutos a 37°C. Após incubação as células foram lavadas 3x por 5 minutos com PBS para imediato ensaio de imunocitoquímica. No caso de armazenamento para ensaios posteriores as células foram mantidas em PBS com 0,02% de azida sódica.

As lamínulas contendo as células foram incubadas com soro normal de cabra (1:5 em PBS, Vector) por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida o excesso de soro foi desprezado e foram adicionados anticorpos primários diluídos em PBS contendo 0,3 ou 0,1% de Triton X-100 (Sigma) seguido de incubação por 60 minutos à temperatura ambiente ou por doze horas a 4°C em câmara úmida. As lamínulas foram lavadas 3x por 5 minutos com PBS e incubadas por duas horas com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos. Após incubação as células foram lavadas 2x por 5 minutos com PBS. Para marcação dos núcleos, as células foram incubadas por três minutos com DAPI seguida de uma lavagem com PBS. As lamínulas foram preparadas em lâminas com PPD (2,5-difenil-1,3,4-oxadiazole – Sigma) diluído em glicerol e vedadas com esmalte.

A reação para fosfatase alcalina foi realizada em mESC indiferenciadas. Para isto, foram seguidas as instruções do fabricante (Vector Red - Alkaline Phosphatase

Substrate Kit I cat nº: SK-5100). Após a reação as lamínulas foram montadas em PPD como descrito acima e vedadas com esmalte.

O material foi analisado e fotografado ao microscópio invertido ApoTome (Zeiss) conectado a sistema digital para captura e armazenamento das imagens AxioCam MRm (Zeiss). Alternativamente as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência Olympus BX61 - U-RFL-T e as imagens capturadas e digitalizadas em câmera acoplada ao sistema. As imagens digitalizadas foram processadas pelo programa Adobe Photoshop 7.0.1® (Adobe Systems Inc.)

Os anticorpos primários utilizados para imunocitoquímica foram: anti-SSEA1 (monoclonal - camundongo, 1:100, Santa Cruz), anti-Oct3/4 (policlonal - coelho, 1:500, Abcam), anti-Oct3/4 (policlonal - coelho, 1:200, Santa Cruz), anti-nestina (monoclonal - camundongo, 1:100, Abcam), anti-SSEA-1 (monoclonal, 1:100, Santa Cruz), anti-Pax6 (policlonal - coelho, 1:200, Abcam), anti-GFAP (policlonal - coelho, 1:200, DAKO), anti-NeuN (monoclonal - camundongo, 1:100, Millipore), anti-neurofilamento 200 (policlonal - coelho, 1:100, Sigma), anti-tubulina β III (monoclonal - camundongo, 1:100, Sigma), anti-tirosina hidroxilase (monoclonal - camundongo, 1:50, Sigma), anti-GABA (policlonal - coelho 1:4000 policlonal, Sigma), anti-MBP (monoclonal - camundongo, 1:100, Millipore), anti-CD60b (monoclonal - camundongo, 1:100, Santa Cruz), anti-GAP43 (policlonal - coelho, 1:200, Santa Cruz), anti-Nav 1.5 (monoclonal - camundongo, 1:100, Abcam), e anti-DCX (policlonal - coelho, 1:100, Santa Cruz).

Os anticorpos secundários utilizados para imunocitoquímica foram: Cy3 anti-IgM de camundongo feito em cabra (1:1000 - Jackson), Cy3 anti-IgG de camundongo feito em cabra (1:1000 - Jackson), Alexa 488 anti-IgG de coelho feito

em cabra (1:400 Invitrogen), Alexa 546 anti-IgG coelho feito em cabra (1:400 - Invitrogen).

3.7 – Immunoblotting

As células foram processadas com tampão de lise (Tris HCL 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM e 0,2% Triton X-100) com coquetel de inibidor de protease III (Calbiochem) por 40 minutos no gelo. A cada 10 minutos o material foi agitado vigorosamente para melhor ação do tampão de lise. As proteínas foram dosadas segundo o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

O perfil protéico dos extratos (cerca de 30µg) foi obtido através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições de redução segundo o procedimento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham) usando-se as condições descritas por Towbin *et al* (Towbin *et al.*, 1979) em sistema convencional de transferência a 200 mA por 2 horas (Bio-Rad). Nos ensaios de SDS-PAGE foram utilizados marcadores de peso molecular (Amersham-RPN756).

Após incubação por uma hora com 5% de leite desnatado (Molico®) em tampão de lavagem (PBS 10 mM pH 7,4 com 0,05% de Tween 20 – Sigma) a membrana foi lavada por 15 minutos com tampão de lavagem. Em seguida a membrana foi incubada 12 horas a 4°C com anticorpo primário diluído em 1% de leite desnatado em tampão de lavagem. Após lavagem de 15 minutos a membrana foi incubada por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Finalizando com nova lavagem de 15 minutos, o complexo formado foi revelado por quimioluminescência (ECL – Chemiluminescence Luminol

Reagente – Amersham) e a membrana exposta ao filme (Hiperfilm – Amersham). Após exposição, o filme foi revelado com revelador e fixador (Kodak).

Para reutilização das membranas com anticorpos primários diferentes, as mesmas foram lavadas por 15 minutos em tampão de lavagem e incubadas em banho-maria a 60° C com solução de *stripping* (100 mM de 2-β mercaptoetanol, 2% SDS e 62,5 mM de Tris-HCL pH 6,7) sob agitação constante. Em seguida as membranas foram lavadas 3x por 10 minutos para nova reação de *immunoblotting*.

Como controle positivo utilizamos extratos celulares de cérebro de camundongo adulto (CC) e neuroesferas obtidas de células-tronco neurais de embrião de 14 dias (NSC – do inglês *neural stem cells*).

Os filmes foram digitalizados e as imagens foram analisadas pelo programa Image J (NIH) para determinação da densidade óptica das bandas obtidas. A quantidade de proteína foi normalizada com o controle endógeno da tubulina-α.

Os anticorpos primários utilizados para o *immunoblotting* foram: anti-Oct3/4 (policlonal - coelho, 1:1.000, Abcam), anti-Pax6 (policlonal - coelho, 1:2.000, Abcam), anti-GFAP (policlonal - coelho, 1:32.000, DAKO), anti-tubulina βIII (monoclonal - camundongo, 1:1.000, Sigma), anti-GAP43 (policlonal - coelho, 1:2.000, Santa Cruz) e anti-tubulina-α (monoclonal – camundongo, 1:30.000, Sigma)

Os anticorpos secundários utilizados para o *immunoblotting* foram: HRP anti-IgG de coelho feito em cabra (1:4.000 - Sigma) e HRP anti-IgA, M e G de camundongo feito em cabra (1:5.000 - Sigma).

3.8 – Reação em cadeia da polimerase

Neste trabalho foram usadas duas metodologias para os ensaios de PCR (do inglês *polymerase chain reaction*). A primeira, realizada em mESCs em colaboração

com o Dr. Deivid Rodrigues e o Dr. Edson Rondinelli do Laboratório de Metabolismo Macromoléculas do IBCCF-UFRJ. A segunda realizada com hESC-H1 no *Department of Biological Structure da University of Washington*, Seattle-EUA em colaboração com Dr. Thomas Reh. Foram usadas mESC e hESC-H1 indiferenciadas, na condição controle e sob os tratamentos.

3.8.1 - PCR em mESC

As células foram processadas e o RNA foi extraído para realização de RT-PCR (do inglês *reverse transcriptase – polymerase chain reaction*) e do qRT-PCR (do inglês *quantitative real time RT-PCR*). Inicialmente, as células foram centrifugadas e ao final todo o sobrenadante foi desprezado. O sedimento celular foi processado para obtenção do mRNA de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante do Kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) e a concentração do mRNA foi dosada por espectrofotometria em comprimento de 280nm.

Para obtenção dos cDNA (DNA complementar), 1 µg de cada mRNA foi transcrito reversamente seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante do Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Para verificar a presença de DNA contaminante, a reação foi realizada utilizando amostras correspondentes com a mesma solução na ausência de transcriptase reversa. Para o RT-PCR foram utilizados *primers* senso e anti-senso específicos (Tabela 1). A amplificação do cDNA foi realizada em tampão de PCR (Invitrogen) contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP do inglês *deoxynucleotide triphosphate*), 0,2 µM de cada *primer* e 1 U de Tag polimerase Platinum (Invitrogen). O programa do RT-PCR consiste em desnaturação a 95° C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação por 1 minuto, anelamento a 56° C por 1

minuto e extensão a 72° C por 1 minuto, seguido por extensão final a 72° C por 10 minutos. O produto do RT-PCR foi separado e analisado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

O qRT-PCR foi realizado em ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems). As amplificações foram realizadas em placas de 96 poços com o cDNA diluído 10x, 50% de Power SYBR Master Mix (Applied Biosystems) e 150 nM de cada *primer* no volume final de 25 µL. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2. O programa de amplificação consistiu em 55° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95° C por 30 segundos e 60° C por 1 minuto. Cada cDNA foi reversamente transcrito em triplicata e uma amostra correspondente sem transcriptase reversa foi incluída como controle negativo. A expressão dos genes alvos foi normalizada com controle endógeno da actina-β.

A quantidade relativa da expressão de mRNA dos genes específicos foi determinada por método comparativo do Ct (do inglês *cycle threshold* – número de ciclos necessários para o sinal fluorescente ultrapassar o limiar) expresso pela fórmula $2^{-(\Delta Ct)}$ (Schmittgen *et al.*, 2008) onde a ΔCt corresponde a diferença entre o Ct do gene alvo com o Ct do controle endógeno da actina β. A regulação da expressão dos genes em resposta aos tratamentos foi calculada pela média ± d.p. dos $2^{-(\Delta Ct)}$ de cada controle e de cada amostra do grupo tratado com E64 ou AR seguido pela determinação da razão entre as condições analisadas (grupo controle e tratamentos com E64 e AR) e as células indiferenciadas. Os cálculos foram usados para analisar todos qRT-PCR realizados (tanto para mESC como hESC-H1).

Tabela 1 – Primers utilizados nas análises por RT-PCR e qRT-PCR em mESCs

Gene	Primers sense	Primers anti-sense
Oct-3/4	GACACCTGGCTTCAGACTTC	CTCTTCTCGTTGGGAATACTC
Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
Nanog	CAGGTGTTTGAGGGTAGCTC	CGGTTTCATCATGGTACAGTC
Klf4	GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC	TCGCTTCCTCTTCCTCCGACACA
<i>Actina β</i>	CATCACTATTGGCAACGAGCG	ATGGATGCCACAGGATTCCA

3.8.2 - PCR em hESC-H1

As células foram processadas e o RNA foi extraído para realização de PCR em tempo real (qRT-PCR). As células foram centrifugadas e o sedimento celular foi ressuspensionado em Trizol® (Invitrogen). O material foi homogeneizado durante dois minutos. Foi adicionado clorofórmio (1:6 - MERCK) com nova homogeneização seguida de centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e foi adicionado igual volume (v/v) de clorofórmio seguido de nova centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente recolhido e foi adicionado álcool isopropílico (v/v). Após dez minutos em temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 80% a 4°C. Em seguida o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O material foi ressuspensionado em 20 µL de água ultra pura livre de RNases.

Em seguida foi adicionado à amostra 20 µL de tampão de DNase (2,5% de DNase e 2,5% de inibidor de RNase) e a mistura foi incubada por 30 a 45 minutos em banho Maria a 37°C. Em seguida o RNA foi obtido através de colunas de purificação (QIAGEN). Após procedimento, a concentração de RNA foi obtida

através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) no comprimento de 280nm.

Para preparo dos cDNAs, 0,6 µg dos RNAs das amostras foram misturados em solução contendo 5,3% de OligodT, 5,3% de dNTP, 2,6% de inibidor de RNase, 10% de DTT, 20% de tampão 5 x e 2,6% de transcriptase reversa SuperScript® III (todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen). Adicionalmente foram preparadas amostras correspondentes em mesma solução sem a transcriptase reversa SuperScript® III para verificar se houve contaminação de DNA. O RNA foi transcrito reversamente em cDNA no termociclador (Therma Cyclor Eppendorf) seguindo a sequência: 65° C por 5 minutos, 4° C por 2 minutos, 42° C por 2 minutos, 42° C por 50 minutos, 70° C 15 minutos e finalizando a 4° C.

O qRT-PCR, assim como as análises dos resultados, foram realizados como descrito no item anterior (item 3.71) para qRT-PCR em mESC. Os *primers* utilizados para o qRT-PCR em hESC-H1 estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – *Primers* utilizados nas análises por qRT-PCR em hESCs

Gene	<i>Primers sense</i>	<i>Primers anti-sense</i>
Pax6	TCTAATCGAAGGGCCAAATG	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
Sox2	CCCCCGGCGGCAATAGCA	TCGGCGCCGGGGAGATACAT
<i>Actina β</i>	ACTCTTCCAGCCTTCCTTC	ATCTCCTTCTGCATCCTGTC

3.9 - Eletrofisiologia

Para avaliar se os tratamentos com AR e com E64 geraram neurônios eletricamente funcionais, foi utilizada a técnica de *patch-clamp* sob configuração *whole-cell*. Os registros foram realizados em mESCs 24 dias após o início da diferenciação. Todo o procedimento foi feito em colaboração com o Dr. Emiliano

Horacio Medei do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho
– IBCCF/UFRJ.

O método de *patch-clamp* foi utilizado neste trabalho, tal como descrito por Hamill *et al.* (1981).

Para o estudo das correntes macroscópicas, utilizou-se a modalidade *whole-cell*, onde a membrana é rompida e a integridade da estrutura restante da membrana mantida. Deste modo tem-se acesso à totalidade dos canais iônicos presentes na célula e com a aplicação de pulsos de voltagem pode-se observar uma resposta da corrente que passa por toda a célula naquele momento.

As micropipetas para *patch* foram confeccionadas a partir de capilares de borosilicato (com diâmetro externo 1,2 mm e interno 0,68 mm; A-M Systems Inc.) e tracionadas em dois estágios através de um estirador horizontal de pipetas (Sutter Instruments, Co, Mod. P-97). Em seguida as pipetas tiveram as suas pontas polidas pelo calor em uma microforja (Narishige, MF-9, Tóquio, Japão) e, quando preenchidas com uma solução eletrolítica e medidas na solução externa padrão, atingiram resistências entre 3 e 7 M Ω . O eletrodo de referência consistia de um fio de Ag/AgCl imerso no banho.

As correntes macroscópicas foram medidas através de micropipetas contendo um eletrodo de Ag/AgCl conectado a um pré-amplificador conversor de corrente-voltagem (headstage CV 4, Axon Instruments). O conjunto, pipeta e pré-amplificador, estava acoplado a um micromanipulador hidráulico (Narishige, Nikon, Japão) que permitia a aproximação da pipeta em direção às células através de movimentos ultrafinos. O conversor por sua vez estava ligado a um amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) que permitia a leitura do potencial de

membrana (na configuração *current clamp*) ou a fixação do potencial de membrana e a quantificação das correntes iônicas (modo potencial controlado - *voltage clamp*).

Assim, as células foram transferidas para placas de petri e mantidas em solução de Tyrode (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,36 de NaH₂PO₄, 0,49 mM MgCl₂ 6H₂O, 11,9 mM NaHCO₃, 1,36 mM CaCl₂ 2H₂O, e 5,04 mM de glicose em pH 7,4). Os registros foram obtidos a partir de mESCs tratadas e visualizadas em microscópio invertido (Modelo Diaphot, Nikon). Para registro *whole-cell* de corrente de K⁺, a solução intracelular usada foi: 1 mM de CaCl₂, 140 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, 10 mM de EGTA, 2 mM de Na₂ATP e 0.2 mM de Na₂GTP em pH 7,2. Nos estudos de corrente de K⁺ o potencial de membrana foi de -50 mV. O protocolo de *voltage-clamp* consistiu em pulsos despolarizantes de 100 ms com incrementos de 10 mV a 0,5 Hz, levando o potencial de membrana de -60 a +60 mV. Para registros *whole-cell* de correntes de Na⁺ a solução intracelular utilizada foi: 140 mM de CsCl, 2 mM K-ATP, 4 mM de MgCl₂, 10 mM de EGTA e 10 mM de HEPES em pH 7,3, e 300 Osm. Além disso, 0,1 μM de Tetrodotoxina (TTX) e 5 mM de BaCl₂ foram adicionados a solução extracelular de Tyrode para bloquear a corrente de Na⁺ e K⁺. O protocolo de *voltage-clamp* para estudar a corrente de Na⁺ consistiu em um pulso hiperpolarizante de 100 ms a partir do potencial de holding de -80 a -120 mV para remover a inativação do canal, seguido por etapa de despolarização de 200 ms com aumento de 10 mV a 0,5 Hz, trazendo o potencial de membrana de -80 a 70mV.

3.10 – Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas intergrupos utilizando os testes t (Mann-Whitney) e ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism versão 4.02 para Windows (GraphPad Software, CA, USA).

4 - RESULTADOS

Células-tronco embrionárias são pluripotentes e devido a este fato, devem ser mantidas sob condições definidas para que se mantenham em estado indiferenciado. Na primeira parte deste trabalho avaliamos se as condições de cultura do nosso laboratório manteriam a linhagem USP-1 de mESCs indiferenciadas por mais de 20 passagens.

4.1- Análise do estado de indiferenciação da linhagem USP-1 de mESCs

Como pré-requisito para realização dos nossos objetivos, foi necessário confirmar as características indiferenciadas e de células pluripotentes da linhagem USP-1 em nossas condições de cultura. Para este fim, um criotubo com estas células na passagem 17 foi descongelado e as células mantidas por mais 20 passagens no nosso laboratório. Através da análise morfológica observamos colônias brilhantes e com bordas definidas que são características de mESCs indiferenciadas (Figura 6A). Além disto, as colônias foram também positivas para fosfatase alcalina (Figura 6B), um marcador de indiferenciação. As características de pluripotência foram analisadas por imunocitoquímica, RT-PCR e *imunoblotting*. A análise por imunocitoquímica mostrou colônias com células positivas para Oct-3/4 e SSEA-1, marcadores de células pluripotentes (Figura 6C e 6E). A expressão de Oct-3/4 também foi observada por *imunoblotting* (Figura 6G). Além de Oct-3/4 e SSEA-1, outros marcadores de células pluripotentes como Sox2, Nanog e Klf4 também foram observados por RT-PCR (Figura 6H). Quando as células foram mantidas na ausência de LIF por 13 dias, áreas de diferenciação espontânea foram observadas, incluindo áreas com células contráteis, sugerindo a presença de células musculares (dados não mostrados).

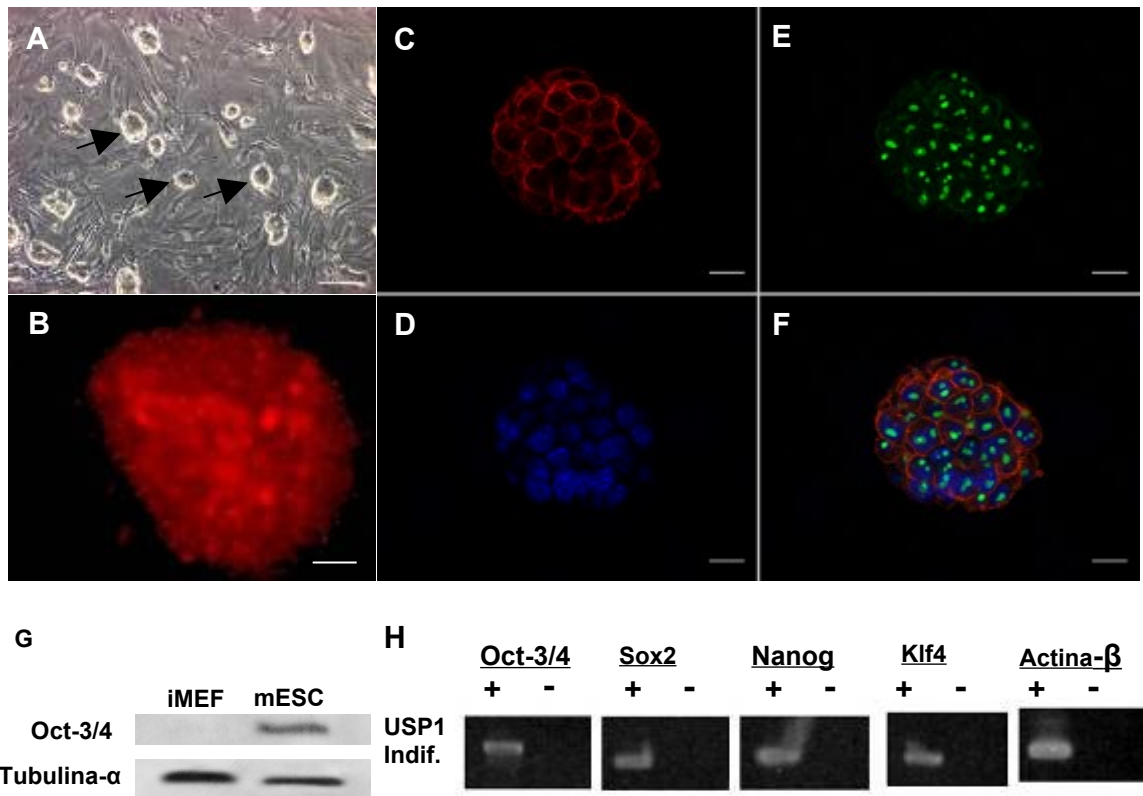


Figura 6. Detecção de marcadores de células pluripotentes em mESC/USP1. Microscopia de contraste de fase mostrando colônias (setas) de mESC sobre iMEF (A). Imagem de uma colônia de mESC positiva para reação da fosfatase alcalina (B). Imunocitoquímica de uma colônia de mESC positiva para SSEA-1 (C), positivas para Oct-3/4 (E), núcleos corados com DAPI (D) e sobreposição de C, D e E (F). Imunoblotting dos extratos totais de iMEF e de cultura de mESC mostrando a presença de Oct-3/4 somente nos extratos de cultura de mESC (G). RT-PCR de mESC mostrando a presença de marcadores de células pluripotentes (H). Barra de calibração de 100µm (A), de 10µm (B) e 20µm (C, D, E e F).

4.2. – Avaliação do protocolo de diferenciação de mESCs em células neurais através do tratamento com AR e Neurobasal®

Nesta etapa avaliamos um protocolo de diferenciação de mESCs em células neurais através do tratamento com 5,0 μM de AR e maturação em neurônios com meio Neurobasal® e suplemento B27.

4.2.1 – O protocolo de tratamento de mESCs com AR e Neurobasal® aumentou o número de células positivas para nestina

Uma vez confirmada a manutenção do estado indiferenciado das células da linhagem USP-1, fomos avaliar se o protocolo de diferenciação com AR enriqueceria o número de células neurais. Para isso, no primeiro dia do protocolo de tratamento com AR (5 μM) de 3-5 EBs foram transferidos para lamínulas previamente tratadas com poli-D-lisina e laminina. Os EBs aderiram ao substrato (explantes de EBs) e foram mantidos em meio Neurobasal®. Após três dias os mesmos foram fixados e foi realizado ensaio de imunocitoquímica para nestina, filamento intermediário detectado em células precursoras neurais. Foi detectada a presença do filamento de nestina em células localizadas no interior dos explantes de EBs (Figura 7A) e em células que migraram para fora dos explantes (Figura 7B). Foram quantificadas as células positivas para nestina que migraram para fora dos explantes de EBs. O tratamento com 5 μM de AR ($0,68 \pm 0,11$ – células nestina+/células DAPI+) levou a um aumento de 72,7% de células positivas para nestina em relação ao grupo controle (Ctrl; $0,39 \pm 0,04$ - células nestina+/células DAPI+). A diferença entre o número de células positivas para nestina no grupo tratado com AR e o grupo Ctrl foi significativa ($p < 0,05$; Teste t – Mann Whitney) (Figura 7E).

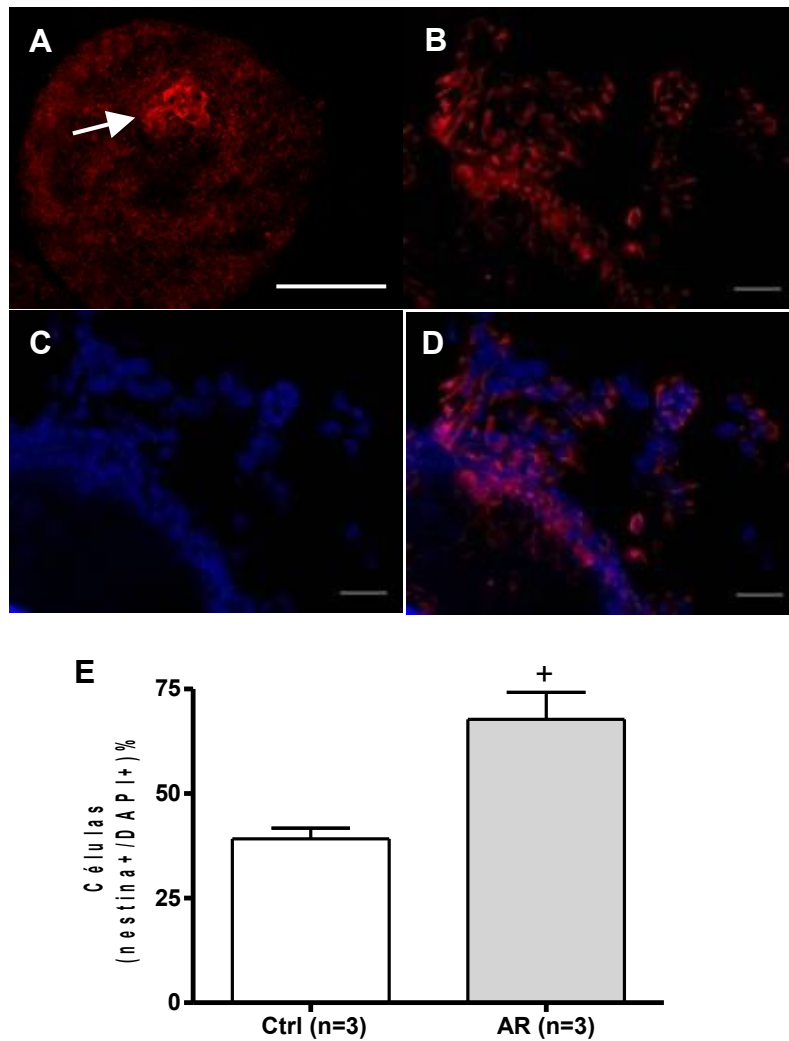


Figura 7. Diferenciação de mESC em células positivas para nestina após o tratamento com AR. Imunocitoquímica após três dias da transferência dos EBs para suporte com laminina/poli-D-lisina mostrando um explante de EB com células positivas para nestina (A). A seta sugere a presença de roseta neural dentro do explante de EB. Em maior aumento observamos células positivas para nestina migrando a partir de um explante de EB (B). Núcleos corados com DAPI (C) e sobreposição de B e C (D). O gráfico representa o número de células positivas para nestina sobre o número de núcleos corados com DAPI (E). Foram contadas somente as células que migraram dos explantes dos EBs. O tratamento com 5 μ M de AR aumentou significativamente (+ $p < 0,05$; Teste t - Mann Whitney) o número de células positivas para nestina. Barras representam os valores das médias \pm EPM. Barra de calibração de 100 μ m (A) e 20 μ m (B, C e D).

4.2.2. – O tratamento com AR induziu a diferenciação de mESC em células com características de neurônios e astrócitos

Após verificar que o protocolo de tratamento com 5 μ M de AR induziu um maior número de progenitores neurais, investigamos a presença de células com características de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos no décimo quarto dia do protocolo. Nossas análises revelaram a presença de inúmeros prolongamentos típicos de neurônios ao redor dos explantes de EBs (Figura 8A). Através da análise por imunocitoquímica observamos que estes prolongamentos foram positivos para tubulina β -III, que é expressa em neurônios imaturos (Figura 8B). Em seguida, investigamos neste mesmo dia do protocolo a presença de células positivas para NeuN (marcador de neurônios maduros). A análise por imunocitoquímica mostrou a presença de células positivas para NeuN principalmente na periferia dos explantes (Figura 9A). Verificamos então se com nosso protocolo de tratamento também seria possível observar a presença de células positivas para GFAP (marcador de astrócitos). Através de nossas análises observamos a presença destas células tanto na periferia dos explantes, em contato com células positivas para NeuN, como fora dos explantes (Figura 9B). Embora tenhamos observado células positivas para GFAP, a quantidade encontrada foi reduzida e em alguns explantes de EBs não foram detectadas. Também foi investigada a presença de células positivas para MBP (do inglês *myelin basic protein* - marcador de oligodendrócitos). Em nenhum dia do protocolo foram detectadas células positivas para este marcador.

Para verificar se o tratamento com 5 μ M de AR induzia um aumento na diferenciação de mESCs em células com fenótipo de neurônios maduros, analisamos o número de células NeuN positivas nos explantes de EBs no décimo quarto dia do protocolo de tratamento. O resultado de nossas análises mostrou que

o tratamento com 5 μ M de AR (0,65 \pm 0,26 células NeuN+/células DAPI+) levou a um aumento de 126,5% no número de células positivas para NeuN em relação ao grupo Ctrl (0,29 \pm 0,16 - células NeuN+/células DAPI+). A diferença no número de células positivas para NeuN foi significativa ($p < 0,01$; Teste t – Mann Whitney) quando comparamos os grupos tratados com AR e o grupo Ctrl (Figura 9E).

4.2.3 – Caracterização eletrofisiológica de mESCs após o tratamento com AR.

No 24^o dia do protocolo de diferenciação foram realizados registros eletrofisiológicos das células submetidas ao protocolo de diferenciação com AR. Através destas análises, observamos registros de corrente de entrada de Na⁺ sob *voltage-clamp* (Figura 10A). Para comprovar a presença de corrente de Na⁺, adicionamos 0,1 μ M de TTX (tetrodotoxina; bloqueador do canal de sódio), levando a uma completa ausência da corrente de entrada (Figura 10B). Para testar a presença de correntes de potássio, inibimos a de corrente saída com 5 mM de cloreto de bário, sugerindo assim a presença deste tipo de corrente (Figura 10C). Detectamos a presença de corrente retificadora de potássio em 60% (n=10) das células analisadas (Figura 10D)

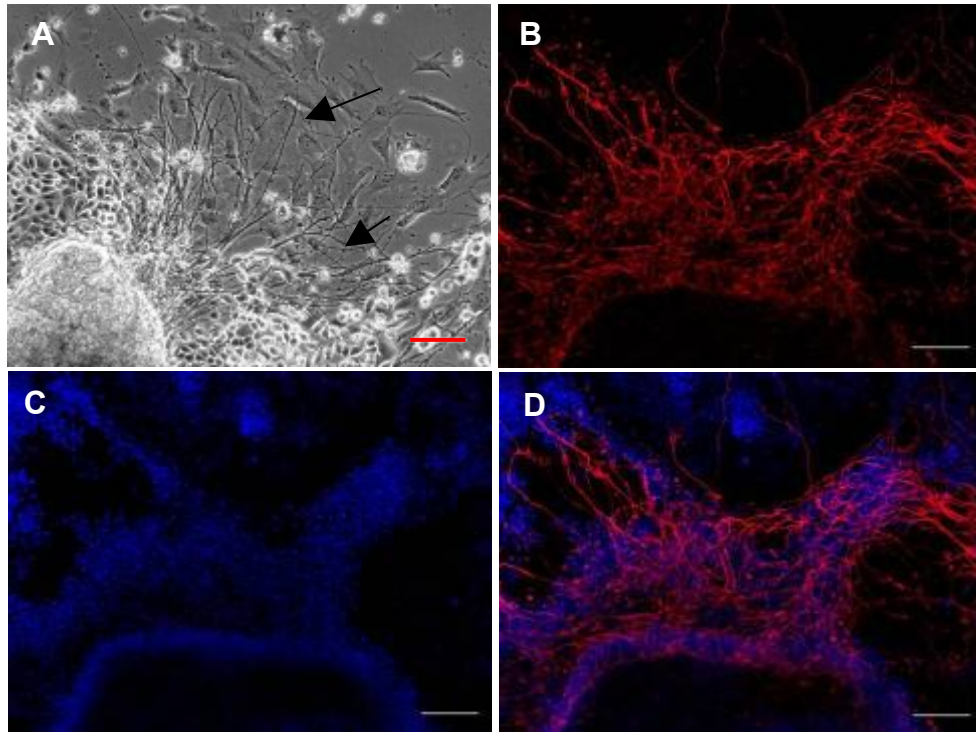


Figura 8. Tratamento com AR gerou células com prolongamentos celulares típicos de neurônios e positivos para tubulina β -III. Microscopia de contraste de fase mostrando prolongamentos delgados (setas) saindo do explante de um EB no dia 14 do protocolo de tratamento (A). Imunocitoquímica no dia 14 mostrando prolongamentos celulares positivos para tubulina β -III (B), núcleos corados com DAPI (C) e sobreposição de B e C (D). Barra de calibração de 50 μ m (A) e 100 μ m (B, C e D).

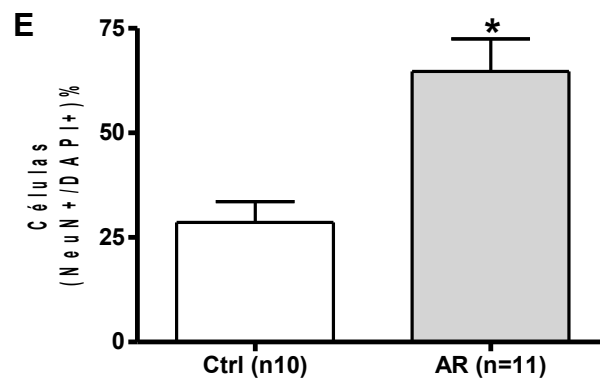
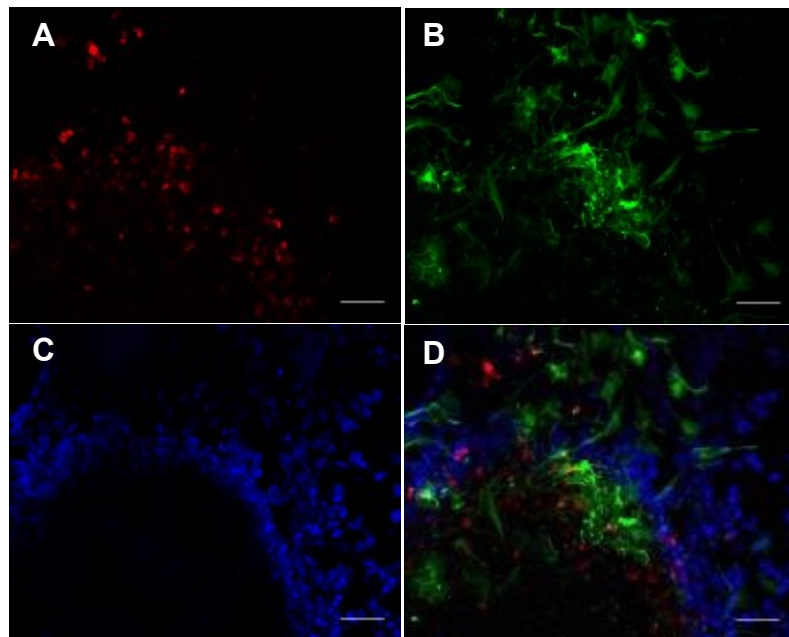


Figura 9. O tratamento com AR induziu mESC a se diferenciar em células que expressam marcadores de neurônios maduros e de astrócitos. Imunocitoquímica no dia 14 mostrando núcleos celulares positivos para NeuN (A), células positivas para GFAP (B), núcleos corados com DAPI (C) e sobreposição de A, B e C (D). As células positivas para NeuN foram quantificadas no grupo controle (Ctrl) e no grupo tratado com ácido retinóico (AR). Somente foram quantificadas as células localizadas dentro dos explantes dos EBs. O gráfico representa o número de células positivas para NeuN sobre o número de núcleos corados com DAPI. O tratamento com 5 μ M de AR aumentou significativamente (* $p < 0,01$; Teste t - Mann Whitney) o número de células positivas para NeuN. Foram realizados dois experimentos independentes. Barras representam os valores das médias \pm EPM. Barra de calibração de 20 μ m.

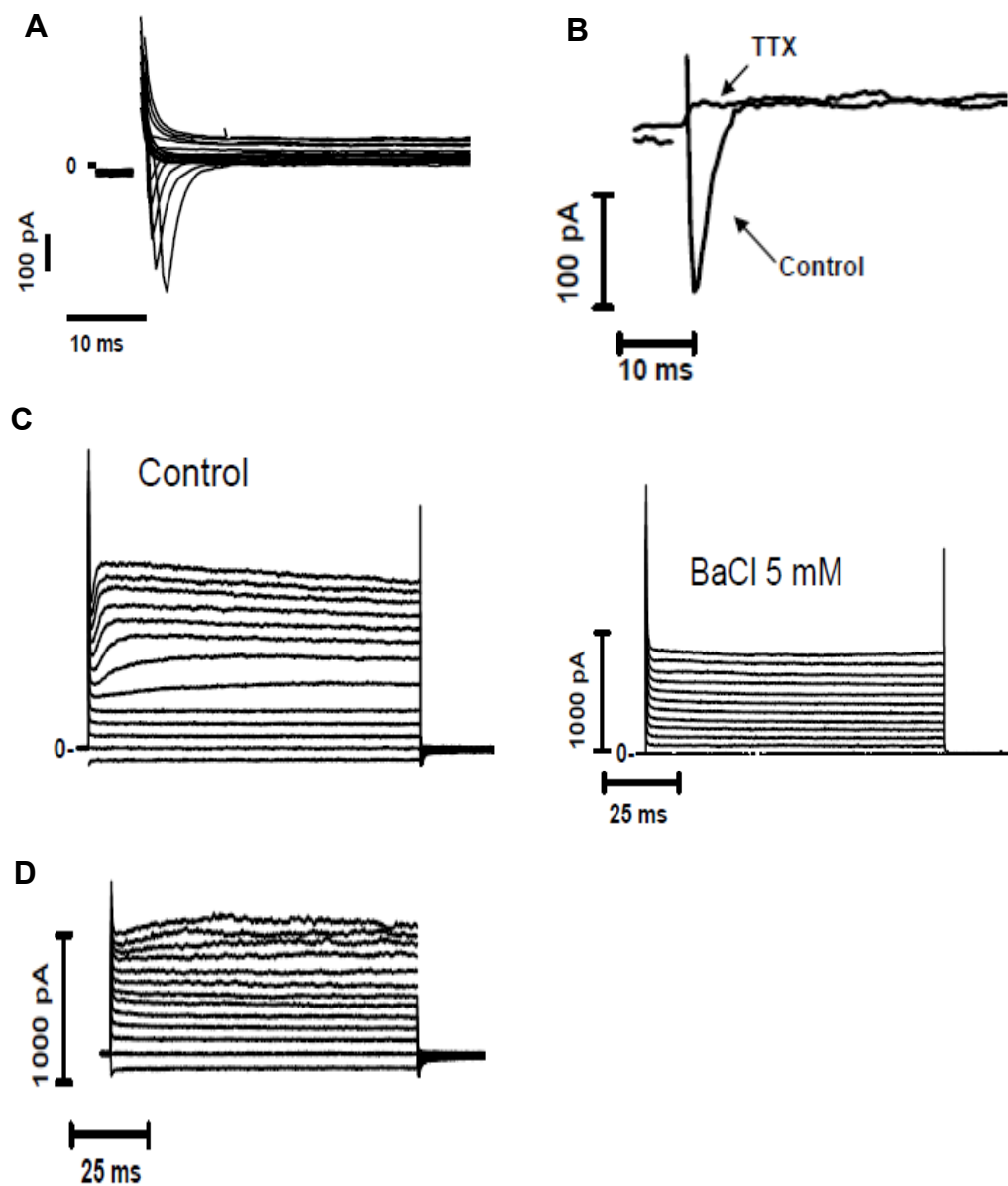


Figura 10. Perfil eletrofisiológico de mESC após o tratamento com AR. Potencial de membrana foi configurado a -70 mV. Registros de corrente de entrada sobre *voltage-clamp* para teste de potencial de membrana de -80 a +70 mV (A). Corrente de entrada foi bloqueada com TTX (1 μ M) (B). Inibição de componentes de corrente com cloreto de bário sugere a presença de corrente de potássio (C). Em algumas células (6 de 10) apenas uma corrente de saída retificadora foi observada (D).

4.3 – Avaliação do inibidor de cisteína protease, E64 na diferenciação de mESCs em células neurais

Com a definição de uma metodologia de diferenciação de mESCs em células neurais, partimos para uma segunda etapa, na qual avaliamos o inibidor de cisteína protease, E64, como agente indutor da diferenciação de mESCs em células neurais.

4.3.1 – Curva dose-reposta do E64.

Para definir a melhor concentração de trabalho com o E64, cinco diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 μ M) foram analisadas, juntamente com o grupo sem tratamento (Ctrl). A melhor concentração foi avaliada em função da expressão de Pax6, fator de transcrição presente no início da neurogênese durante o período embrionário. Para isso, os EBs foram coletados no primeiro dia do protocolo e os extratos protéicos foram obtidos para análises da expressão de Pax6 por *immunoblotting*. O resultado das análises das densidades ópticas das bandas obtidas em cada concentração mostrou que a expressão de Pax6 foi maior quando mESCs foram tratadas com 5,0 μ M de E64 (Figura 11). As concentrações de 5 μ m e 10 μ m de E64 mostraram diferenças significativas em relação ao grupo Ctrl e a concentração de 1 μ m de E64 ($p < 0,05$; ANOVA – Teste Tukey).

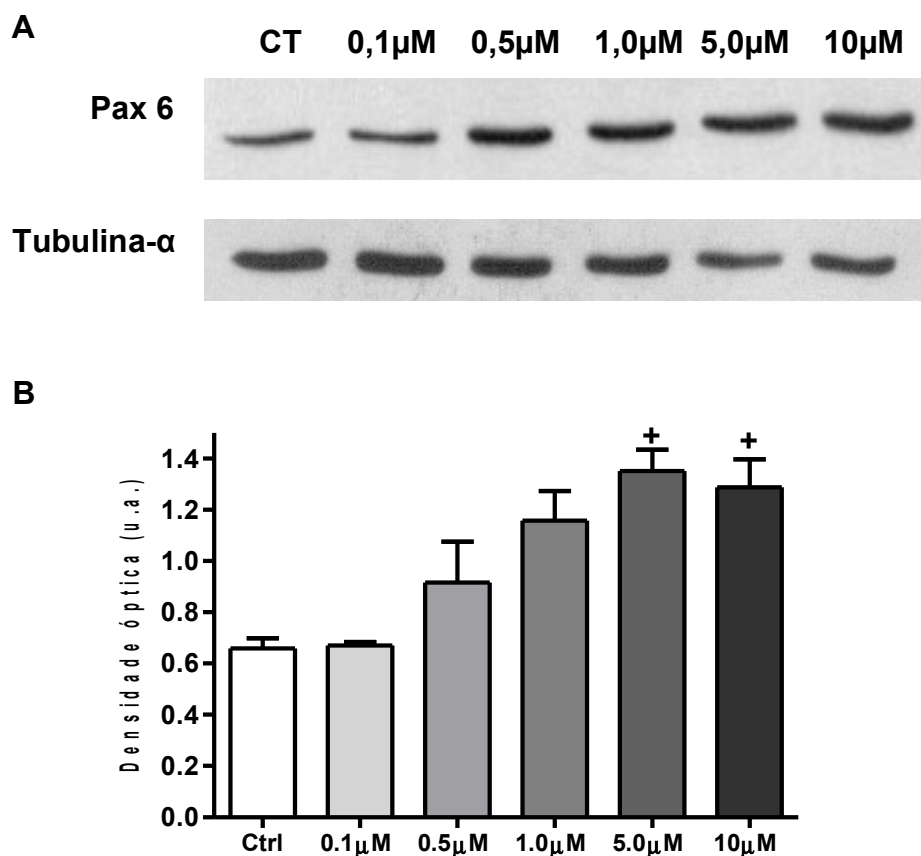


Figura 11. O tratamento com E64 aumentou de forma dose dependente a expressão de Pax6 em mESC. *Imunoblotting* para Pax6 foi realizado em extratos de EBs com 2 dias de tratamento com E64 em diferentes concentrações (A). Representação das densidades ópticas relativas da expressão de Pax6 em mESC sob o tratamento com E64 (B). Tubulina- α foi utilizada como controle endógeno de carregamento. O tratamento com E64 levou a um aumento estatisticamente significativo na expressão de Pax6 (+ $p < 0,05$; ANOVA - Turkey). A análise corresponde a dois experimentos independentes ($n=2$). Barras representam os valores das médias \pm EPM.

4.3.2 – O tratamento com E64 não interferiu na formação dos corpos embrióides (EBs)

Após definir a melhor concentração de E64, avaliamos se o tratamento com E64 tinha efeito tóxico em mESCs. Para isto, analisamos o número e os diâmetros dos EBs no primeiro dia do protocolo. Foram comparados os diferentes grupos entre si. Nossas análises não mostraram diferenças significativas no número dos EBs entre o tratamento com E64 e o Ctrl ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey; Figura 12A). Por outro lado, o tratamento com 5 μ M de AR levou a uma redução significativa no número de EBs em comparação com o grupo Ctrl e grupo tratado com 5 μ M de E64 ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente; ANOVA – Teste Tukey – Figura 12A). Quando comparamos os diâmetros dos EBs entre os grupos estudados, somente observamos diferença significativa entre os diâmetros dos EBs tratados com E64 e tratados com AR ($p < 0,05$; ANOVA – Teste Tukey – Figura 12B).

4.3.3 – O tratamento de mESCs com E64 aumentou o número de células positivas para nestina

Após definir a melhor concentração do E64 e verificar que esta concentração não tinha efeito tóxico durante a formação dos EBs, analisamos a presença de precursores neurais em substrato aderente. Assim como realizado com AR, de 3 a 5 EBs foram transferidos para lamínulas previamente tratadas com poli-D-lisina e laminina e então mantidos em meio Neurobasal. No terceiro dia do protocolo de tratamento, as células foram fixadas e foi realizado ensaio de imunocitoquímica para nestina. Foi possível detectar a presença do filamento de nestina em células localizadas no interior dos explantes de EBs (Figura 13A) e em células que migraram para fora dos explantes (Figura 13B). Em seguida analisamos o número

de células positivas para nestina que migraram para fora dos explantes de EBs. O tratamento com E64 ($0,86 \pm 0,03$ – células nestina+/células DAPI+) levou a um aumento de 118,5% de células positivas para nestina em relação ao grupo Ctrl ($0,39 \pm 0,043$ - células nestina+/células DAPI+). A diferença entre o número de células positivas para nestina no grupo tratado com $5\mu\text{M}$ de E64 e o grupo Ctrl foi significativa ($p < 0,001$; ANOVA – Teste Tukey). Nossas análises também revelaram que o grupo tratado com $5\mu\text{M}$ de E64 apresentou um aumento de 26,5% células positivas para nestina em comparação com o tratamento AR. Porém o aumento observado não foi significativo ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey; Figura 13E).

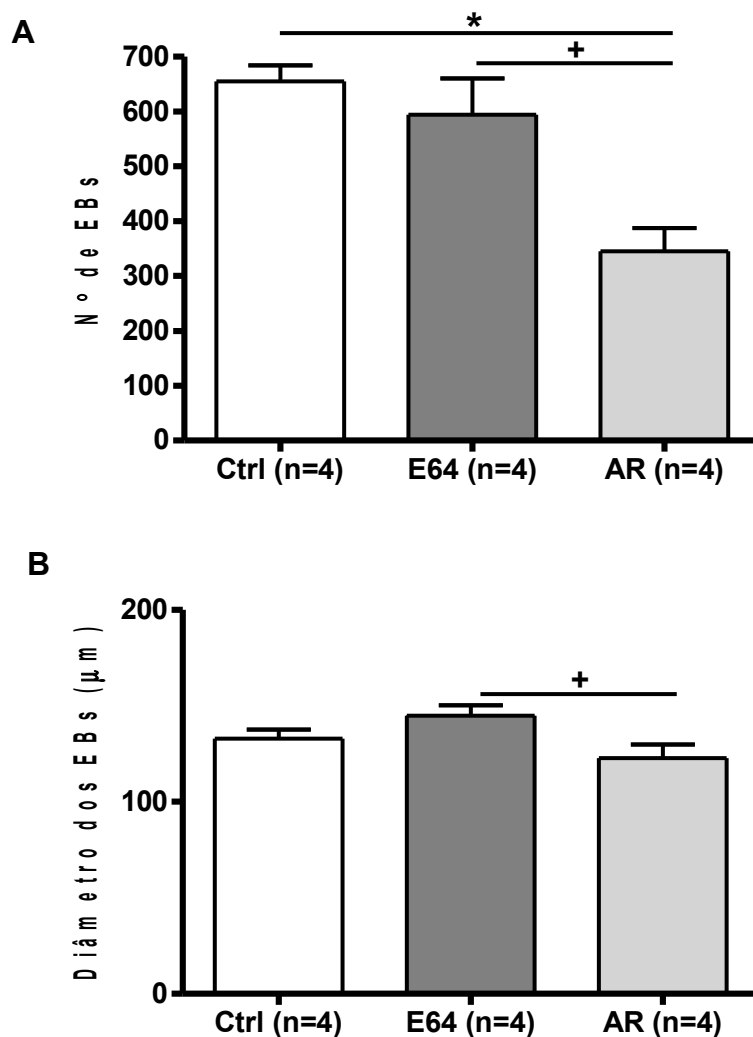


Figura 12. O tratamento com E64 não alterou o número e o tamanho dos EBs. mESC foram mantidas durante 2 dias em placas de cultura não aderentes para formação dos EBs. Durante este período as células não receberam nenhum tipo de tratamento ou foram tratadas com E64 ou AR. Em seguida comparamos a quantidade de EBs e os tamanhos (através do diâmetro) nos diferentes grupos estudados. A análise da quantificação dos EBs mostrou que o tratamento com AR reduziu significativamente o número de EBs (* $p < 0,01$ e + $p < 0,05$; ANOVA – Teste Tukey; A). Também houve diferença significativa entre os diâmetros dos EBs do grupo tratado com E64 e tratados com AR (+ $p < 0,05$; ANOVA – Teste Tukey; B). Foram realizados dois experimentos independentes. Barras representam os valores das médias \pm EPM.

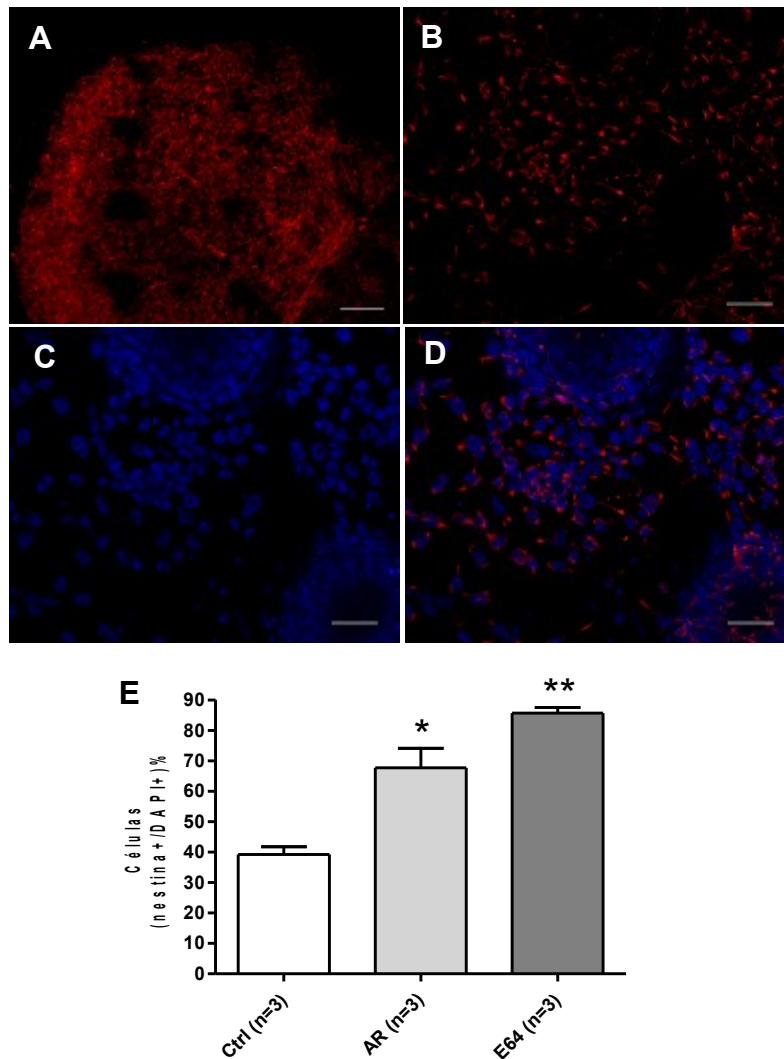


Figura 13. Diferenciação de mESC em células positivas para nestina após o tratamento com E64. Imunocitoquímica após três dias da transferência dos EBs para suporte com laminina/poli-D-lisina mostrando um explante de EB com células positivas para nestina (A). Em maior aumento células positivas para nestina migrando de um explante de EB (B). Núcleos foram corados com DAPI (C) e sobreposição de B e C (D). As células positivas para nestina foram contadas no grupo controle (Ctrl) e nos grupos tratados com 5 μ M de E64 ou 5 μ M de AR após 3 dias em laminina. O gráfico representa o número de células positivas para nestina sobre o número de núcleos corados com DAPI. Foram contadas somente as células que migraram dos explantes dos EBs. O tratamento com E64 ou AR levou a um aumento estatisticamente significativo no número de células positivas para nestina (* $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$, respectivamente; ANOVA - Turkey). Barras representam os valores das médias \pm EPM. Barra de calibração de 100 μ m (A) e 20 μ m (B, C e D).

4.3.4 – Análise fenotípica e quantitativa das células neurais geradas após o tratamento de mESCs com E64

Após verificar que 5 μ M de E64 induziu a diferenciação de mESCs em progenitores neurais, caracterizamos por imunocitoquímica e *immunoblotting* a presença de marcadores neurais nos diferentes dias do protocolo de tratamento. No terceiro dia do protocolo investigamos a presença de células que expressam marcadores de progenitores neurais. Detectamos, além da presença de células positivas para nestina, tanto no interior dos explantes como fora deles, células que expressam Pax6 na periferia dos explantes (Figura 14D). Neste ponto do nosso protocolo não foi possível detectar a expressão de tubulina β -III e nem GFAP, marcadores de neurônios imaturos e astrócitos respectivamente (Figura 14E).

No décimo quarto dia do protocolo, analisamos a presença de neurônios imaturos com perfil migratório por imunocitoquímica para CD60b e DCX (do inglês *doublecortin*), um gangliosídeo de superfície e uma proteína associada aos microtúbulos, respectivamente. Ambos os marcadores foram expressos em mESCs tratadas com 5 μ M de E64 no 14^o dia, mostrando a presença de células com fenótipo de neurônios migratórios principalmente em áreas fora dos explantes de EBs (Figura 15). Ainda no 14^o dia detectamos prolongamentos delgados típicos de neurônios e, por imunocitoquímica, observamos no interior dos explantes a presença de células positivas para NeuN e GFAP (Figura 16). Observamos ainda que os prolongamentos celulares destas células positivas para NeuN marcavam para NF-200, um neurofilamento expresso em neurônios e também característico de neurônios maduros (Figura 17D). Em seguida, quantificamos o número de células positivas para NeuN. O resultado da quantificação revelou que o tratamento com 5 μ M de E64 ($0,44 \pm 0,21$ – células NeuN+/células DAPI+) aumentou em 53,9% o número de

células positivas para NeuN em relação ao o grupo Ctrl ($0,29 \pm 0,16$ - células NeuN+/células DAPI+). Entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey; Figura 17E).

Alguns prolongamentos celulares também foram positivos para GAP-43 (do inglês *growth associated protein 43*), uma proteína envolvida no crescimento axonal durante o desenvolvimento e na regeneração do sistema nervoso (Figura 18B). Também detectamos a presença desta proteína por *imunoblotting* no mesmo dia do protocolo (Figura 18E). A análise das bandas dos *imunoblottings* obtidas por densitometria óptica revelou aumento de 64,0% na expressão de GAP-43 em culturas tratadas com E64 ($0,23 \pm 0,14$) em comparação com as culturas Ctrl ($0,14 \pm 0,10$, Figura 18F). Embora tivéssemos observado este aumento, ele não foi estatisticamente significativo ($p < 0,20$, Teste t – Mann Whitney). Também por *imunoblotting* detectamos a presença de tubulina β -III em mESCs tratadas com E64 no 14º dia do protocolo de tratamento (Figura 19A). As análises das bandas dos *imunoblottings* obtidas por densitometria óptica revelaram que em comparação com o Ctrl ($2,85 \pm 1,47$), o tratamento com E64 ($3,82 \pm 1,17$) aumentou em média 34,1% a expressão de tubulina β -III em culturas de mESCs. (Figura 19B).

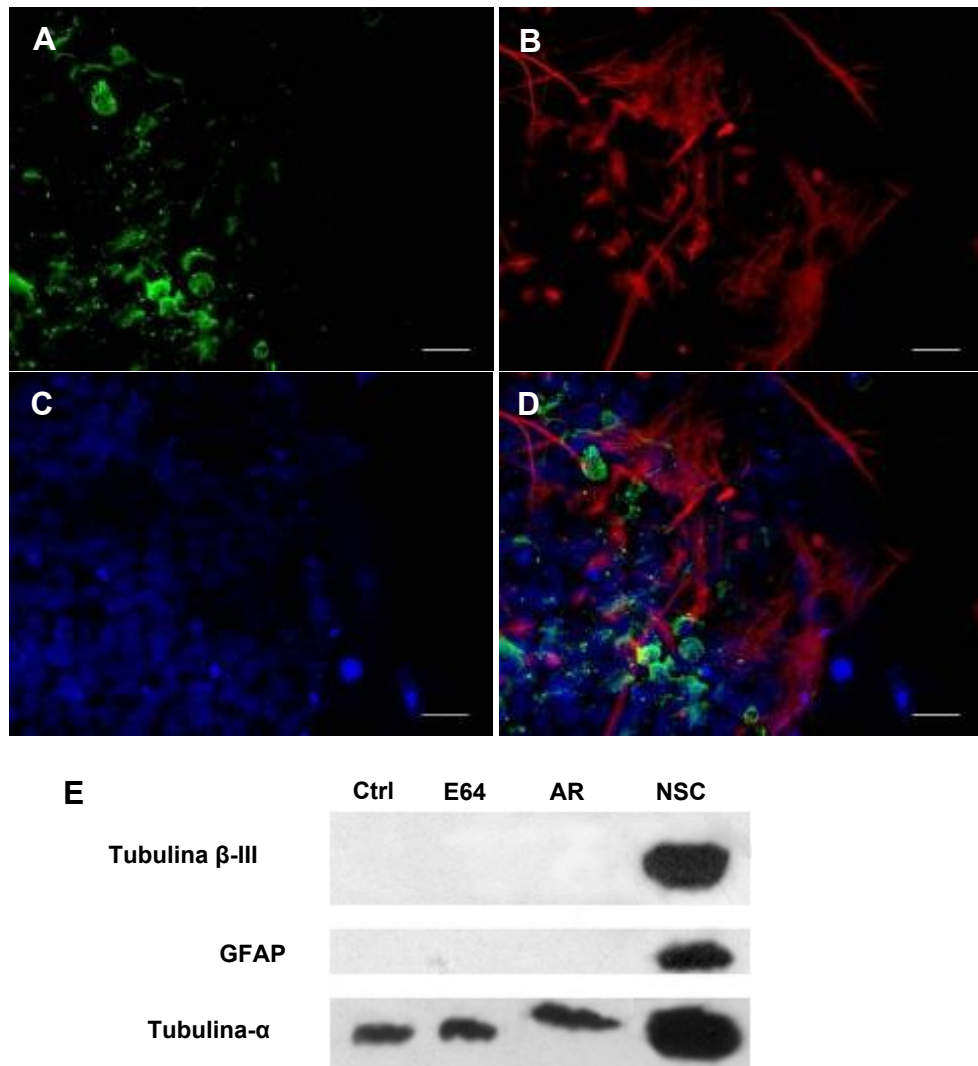


Figura 14. Caracterização de mESC tratadas com E64 no dia 3 do protocolo de tratamento. Imunocitoquímica mostrando células positivas para Pax6 (A) e nestina (B). Os núcleos foram corados com DAPI (C). Sobreposição de A, B e C (D). *Imunoblotting* para tubulina β -III e GFAP mostrando ausência destes marcadores no grupo controle (Ctrl), no grupo tratado com 5 μ M de E64 (E64) e no grupo tratado com ácido retinóico (AR). Tubulina- α foi utilizada como controle endógeno de carregamento. Células-tronco neurais de camundongo E-14 (NSC) foram utilizadas como controle positivo (E). Barra de calibração de 10 μ m.

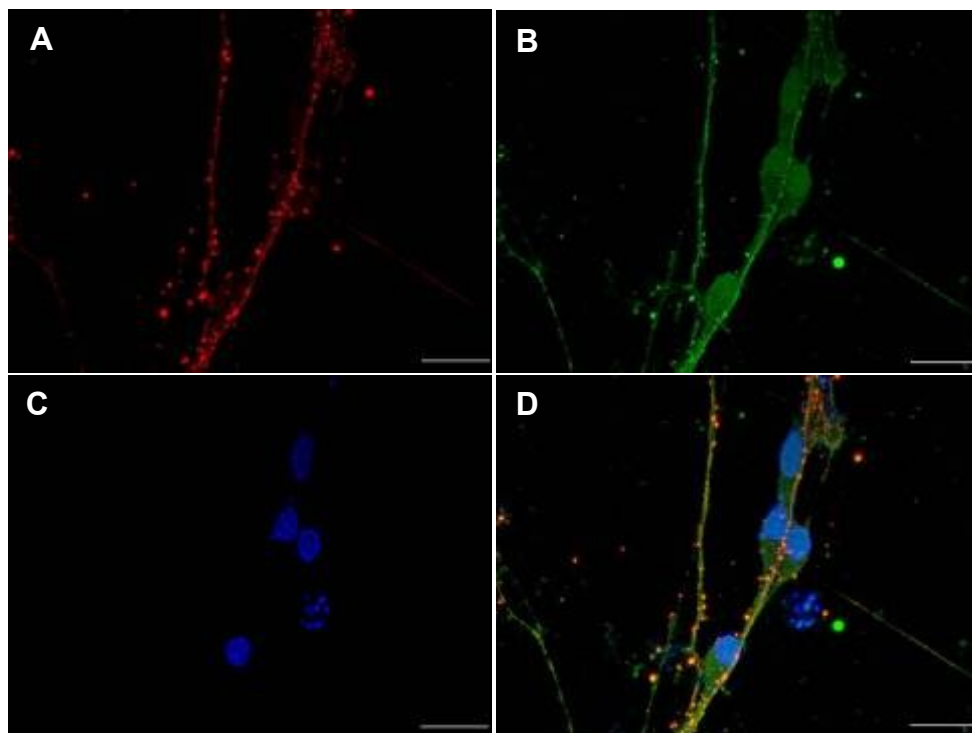


Figura 15. Tratamento com E64 gerou células com características de neurônios migratórios. Imunocitoquímica no dia 14 do protocolo de tratamento mostrando células positivas para CD60b (A) e para Doublecortin (DCX) (B). Núcleos corados com DAPI (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra de calibração de 10 μ m.

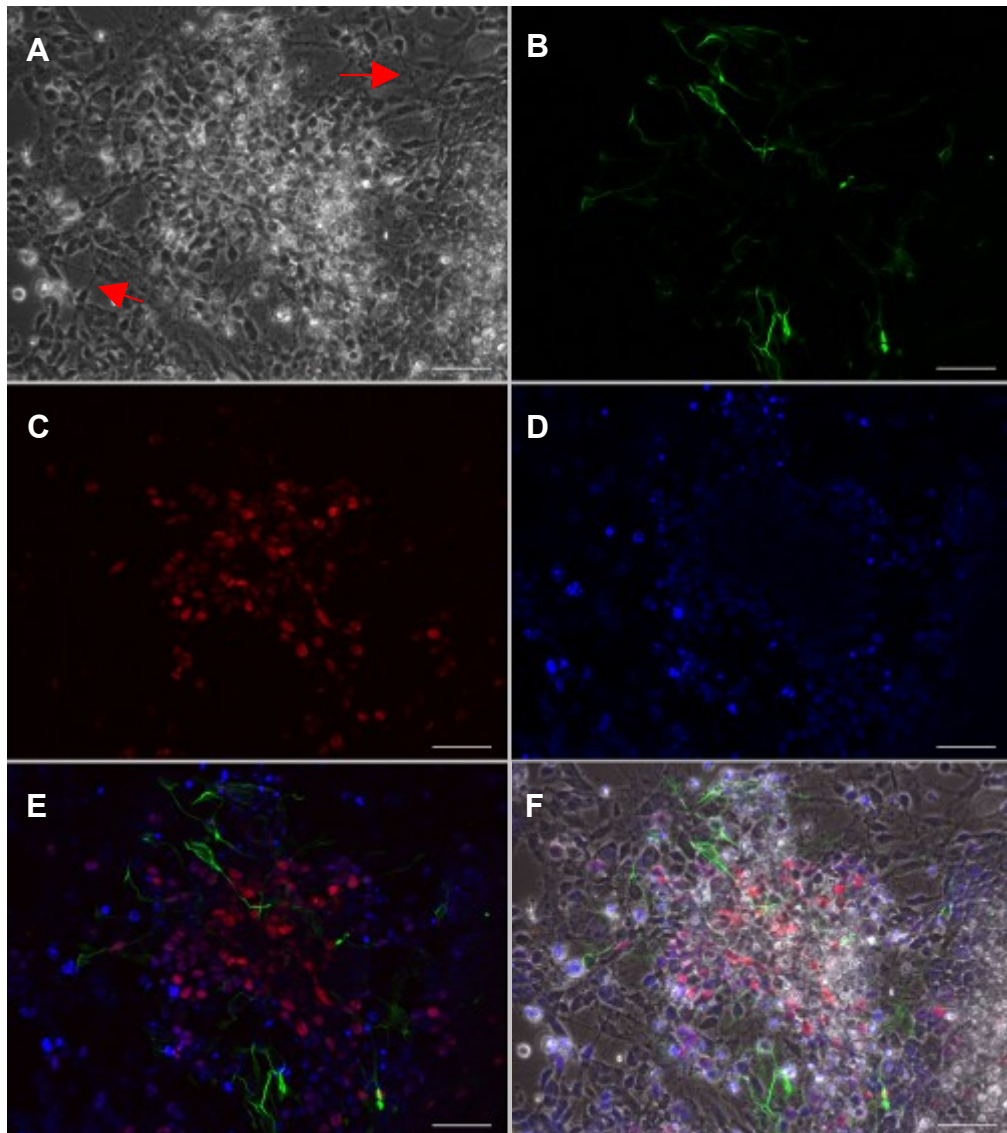


Figura 16. Tratamento com E64 gerou células com características de astrócitos e neurônios. A presença de marcadores de astrócitos (GFAP) e neurônios (NeuN) foi avaliada em mESC no dia 14 do protocolo de tratamento com 5 μ M de E64. Micrografia de fase mostrando prolongamentos celulares delgados (setas) típicos de neurônios (A). Imunocitoquímica mostrando células positivas para GFAP (B), para NeuN (C). Núcleos corados com DAPI (D). Sobreposição de B, C e D (E) e sobreposição de A e E (F). Barra de calibração de 50 μ m.

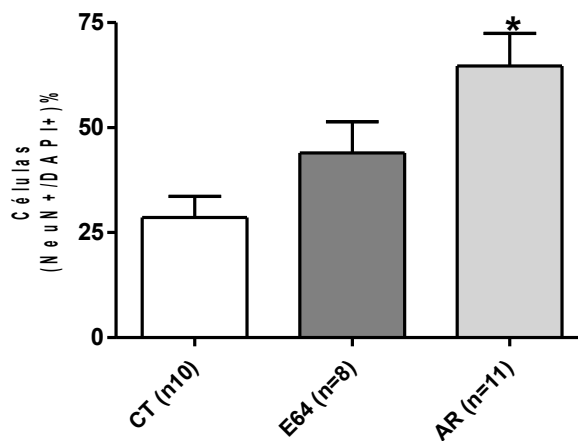
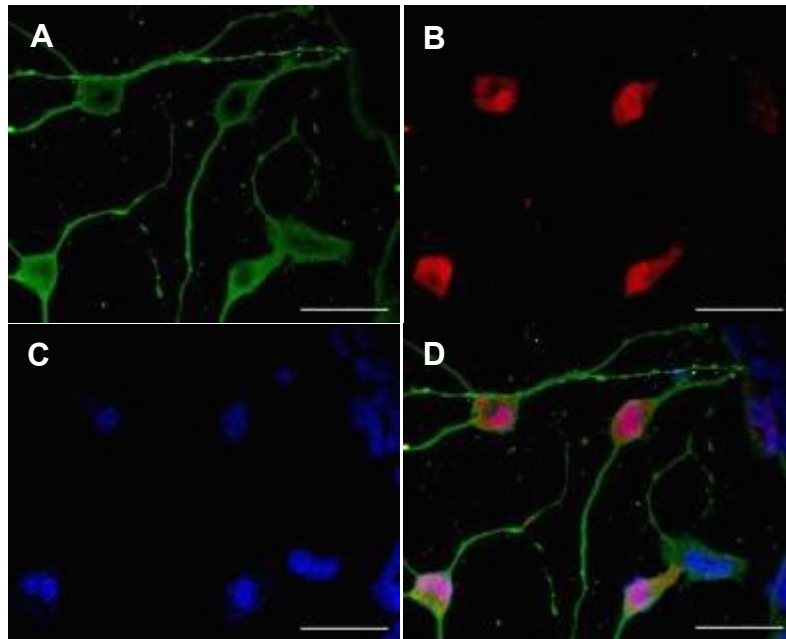


Figura 17. Expressão de marcadores de neurônios maduros em mESC após o tratamento com E64. Imunocitoquímica realizada no dia 14 mostrando células positivas para NF-200 (A) e NeuN (B). Núcleos foram corados com DAPI (C). Sobreposição de A, B e C (D). As células positivas para NeuN foram quantificadas no grupo controle (Ctrl) e nos grupos tratados com 5 μ M de E64 ou 5 μ M de AR. O gráfico representa o número de células positivas para NeuN sobre o número de núcleos corados com DAPI. Foram quantificadas somente as células localizadas dentro dos explantes dos EBs. Somente foi encontrada diferenças entre o grupo Ctrl e o grupo tratado com 5 μ M de AR (* p <0,01; ANOVA - Turkey). Análises obtidas de dois experimentos independentes. Barras representam os valores das médias \pm EPM. Barra de calibração de 10 μ m.

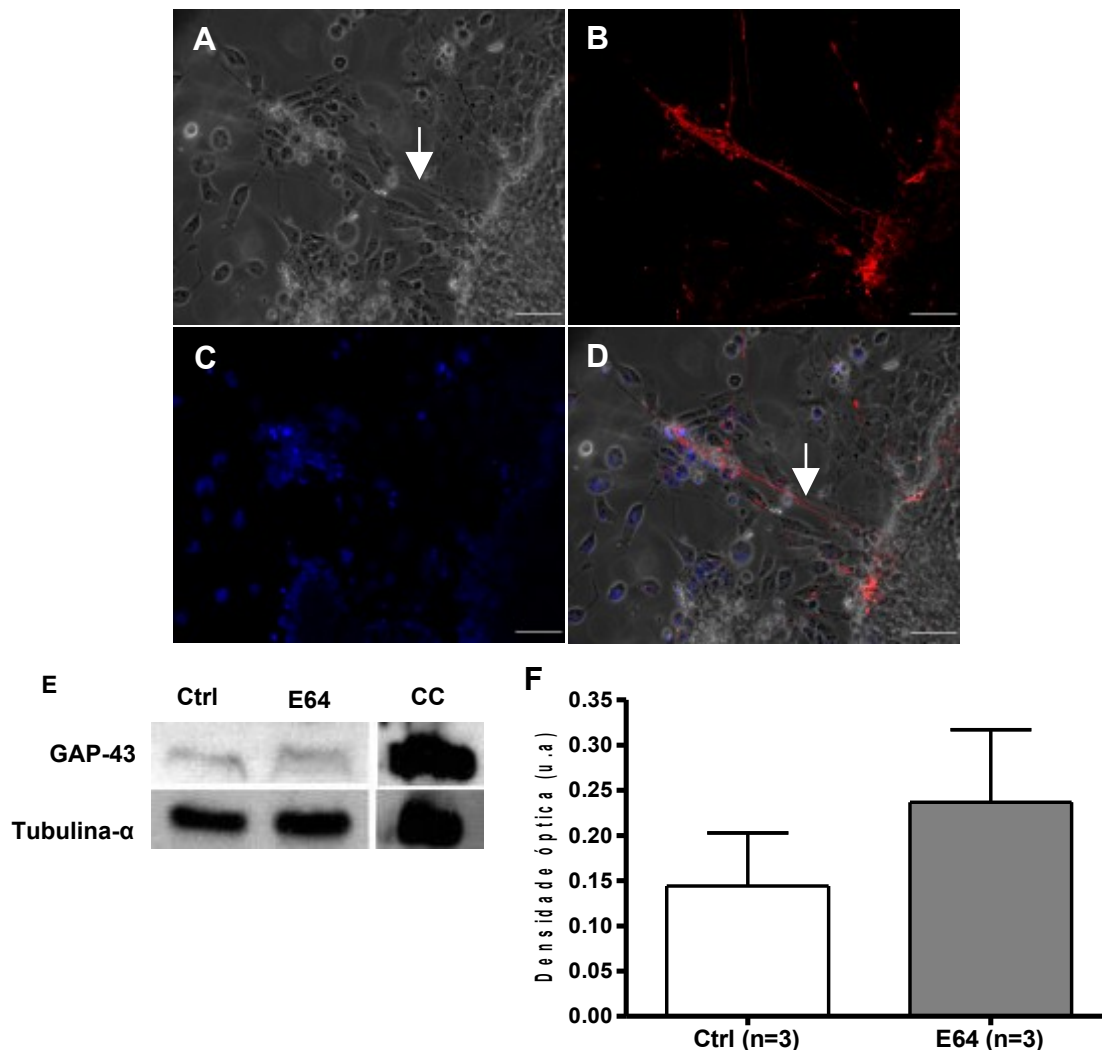


Figura 18. Tratamento com E64 gerou células que expressam GAP-43. Microscopia de fase mostrando prolongamentos celulares delgados (setas) típicos de neurônios no dia 14 do protocolo de tratamento(A). Imunocitoquímica mostrando que alguns prolongamentos celulares foram positivos para GAP-43 (B). Núcleos foram corados com DAPI (C). Sobreposição de A, B e C (D). *Imunoblotting* para GAP-43 foi realizado em extratos celulares do dia 14 do protocolo de tratamento (E). Representação das densidades ópticas relativas da expressão de GAP-43 em mESC no grupo controle (Ctrl) e no grupo tratado com 5 μ M de E64 (F). Tubulina- α foi utilizada como controle endógeno de carregamento. Como controle positivo para o *imunoblotting* foi utilizado cérebro de camundongo adulto (CC). Não houve diferença significativa entre o grupo Ctrl e o tratamento com E64 ($p > 0,05$; Teste t - Mann Whitney). Análises obtidas de três experimentos independentes. Barras representam os valores das médias \pm EPM. Barra de calibração de 20 μ m.

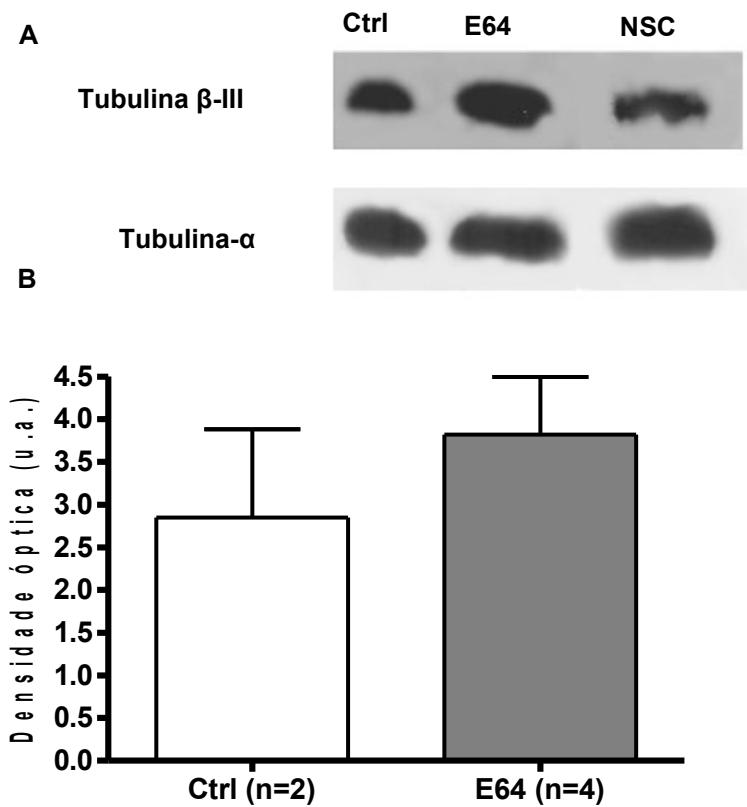


Figura 19. Quantificação da expressão de tubulina β-III em mESCs tratadas com E64. Imunoblotting para tubulina β-III foi realizado em extratos celulares do dia 14 do protocolo de tratamento (A). Representação das densidades ópticas relativas da expressão de tubulina β-III em mESC no grupo controle (Ctrl) e no grupo tratado com 5μM de E64 (B). Tubulina-α foi utilizada como controle endógeno de carregamento. Não houve diferença significativa entre no Ctrl e o grupo tratado com 5μM de E64 ($p > 0,05$; Teste *t* - Mann Whitney). Análises obtidas de dois experimentos independentes. Como controle positivo para o imunoblotting foram utilizadas células-tronco neurais (NSC). Barras representam os valores das médias \pm EPM.

No 24º dia do protocolo de tratamento com E64, investigamos a presença de neurônios maduros e comprometidos com síntese de neurotransmissores. Foram identificadas por imunocitoquímica células positivas para TH (tirosina hidroxilase) e para GABA, expressos em neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos, respectivamente (Figura 20). Neste mesmo ponto do protocolo, detectamos a presença de canais de sódio (marcados com anticorpo anti-Nav 1.5) distribuídos nos corpos e nos prolongamentos celulares (Figura 21). Assim, como visto com o tratamento com AR, não detectamos a presença de células positivas para MBP em nenhum dos dias analisados do protocolo.

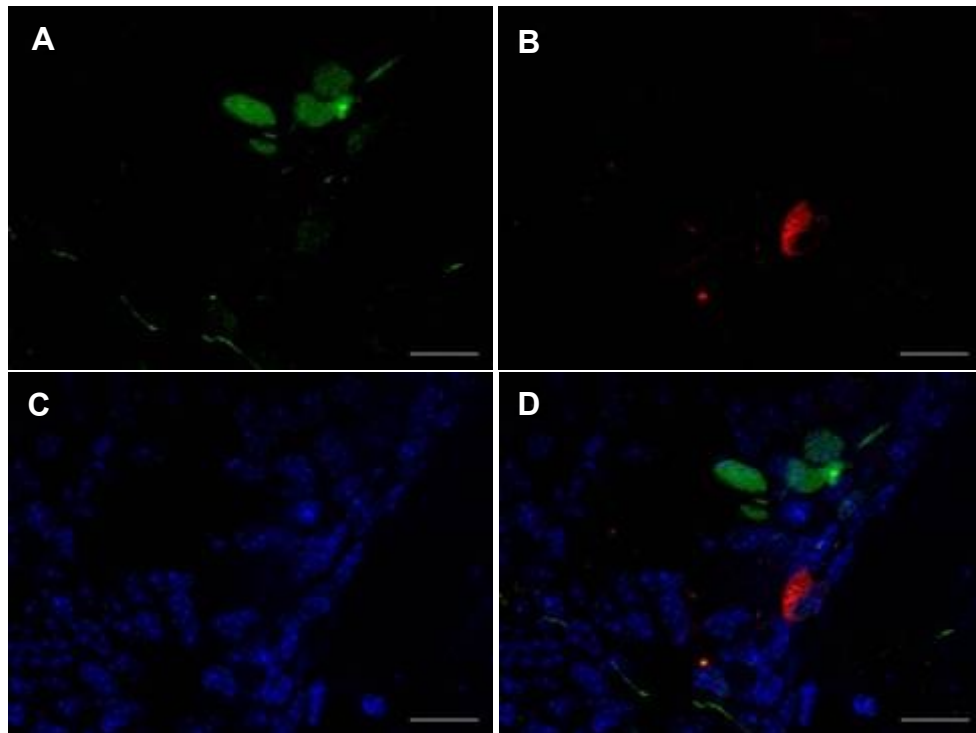


Figura 20. Detecção de neurônios com fenótipos GABAérgicos e dopaminérgicos em mESCs após o tratamento com E64. Imunocitoquímica no dia 24 do protocolo de tratamento com E64 mostrando células positivas para GABA (A) e uma célula positiva para tirosina hidroxilase (B). Os núcleos foram corados com DAPI (C). Sobreposição de A, B e C (D). Barra de calibração de 10 μ m.

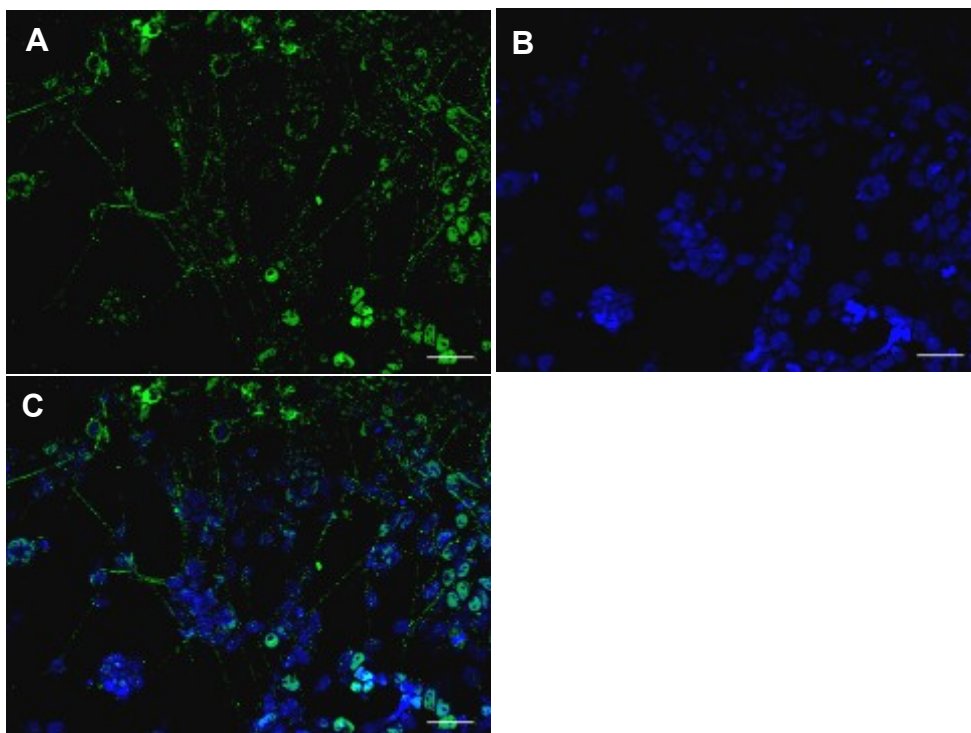


Figura 21. Detecção de canais de sódio em prolongamentos celulares típicos de neurônios em mESC após o tratamento com E64. Imunocitoquímica no dia 24 do protocolo de tratamento mostrando células positivas para Nav 1.5 (A). Os núcleos foram corados com DAPI (B). Sobreposição de A e B (C). Barra de calibração de 20 μ m.

4.3.5 – Análise da expressão de marcadores de pluripotência em culturas de mESCs tratadas com E64

Após avaliar a presença de células neurais obtidas a partir de mESCs tratadas com E64, investigamos o comportamento de marcadores de pluripotência sob este tratamento. Utilizamos qRT-PCR para investigar os níveis relativos de mRNA de Oct-3/4, Sox2 e Nanog. Nossas análises revelaram que os níveis de mRNA de Oct-3/4, Nanog e Sox2 em mESCs foram reguladas negativamente em todos os grupos analisados (Figura 22). A diferença na regulação de cada gene foi avaliada comparando as mESCs indiferenciadas (Indif) com os grupos estudados (Ctrl, E64 e AR), cujos respectivos níveis médios de mRNA para cada gene estão representados na Tabela 3. A diferença dos níveis de Oct-3/4 e Nanog entre Indif e os grupos estudados foi significativa ($p < 0,001$; ANOVA – Teste Tukey). Quando comparamos os níveis de Sox2 entre os grupos estudados e Indif, somente o Ctrl e AR tiveram diferenças significativas ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente; ANOVA – Teste Tukey). Além disso, as diferenças dos níveis de mRNA de Sox2 entre os grupos estudados, foram somente diferentes estatisticamente entre o grupo Ctrl e o grupo tratado com E64 ($p < 0,05$; ANOVA – Teste Tukey).

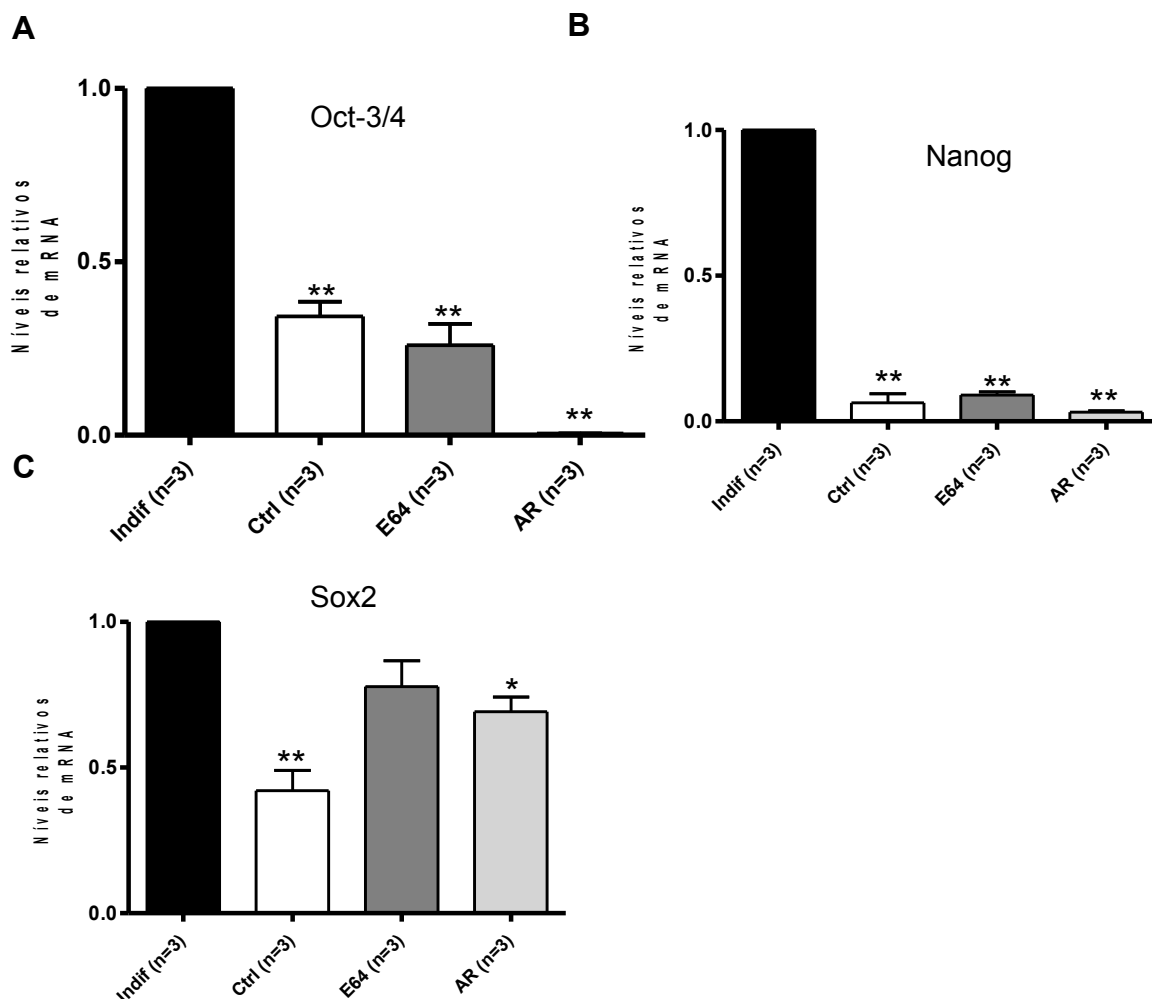


Figura 22. Análise de marcadores relacionados com células indiferenciadas/pluripotentes nas diferentes condições analisadas. qRT-PCRs foram realizados no dia 14 do protocolo de tratamento. As diferenças entre os níveis relativos de mRNA de Oct-3/4, Nanog e Sox2 foram avaliadas entre mESCs indiferenciadas (Indif) e os grupos estudados (Ctrl, E64 e AR). Os níveis relativos de mRNA de Oct-3/4, Nanog e Sox2 foram regulados negativamente em todos os grupo estudados (A, B e C respectivamente). A diferença dos níveis relativos de Oct-3/4 e Nanog entre mESCs Indif e os grupos analisados foi estatisticamente significativa (** $p < 0,001$; A e B). O grupo Ctrl e o tratamento com AR tiveram diferenças significativas (** $p < 0,001$ e + $p < 0,05$; respectivamente) na regulação de Sox2 em comparação com Indif (C). Todas as análises foram realizadas com o teste ANOVA (Turkey) a partir de três experimentos independentes. Barras representam os valores das médias \pm EPM.

Tabela 3 – Níveis relativos de mRNA de genes relacionados com a pluripotência em mESCs sob as diferentes condições estudadas.

Grupos	<i>Níveis relativos de mRNA</i>		
	<i>Oct-3/4</i>	<i>Sox2</i>	<i>Nanog</i>
Ctrl	0,342±0,073	0,420±0,120	0,063±0,542
E64	0,259±0,107	0,779±0,154	0,089±0,020
AR	0,005±0,001	0,691±0,089	0,031±0,008

Média ± desvio padrão; n=3

4.2.3 – O tratamento de mESCs com E64 gerou neurônios com corrente de entrada.

No vigésimo quarto dia do protocolo de tratamento, foram realizados registros eletrofisiológicos das células tratadas com 5 μ M de E64. Através destes registros detectamos a presença de corrente de entrada de Na⁺ usando a técnica de *voltage-clamp* para teste do potencial de membrana de -80 a +70 mV. Para comprovar a presença da corrente de Na⁺, utilizamos um protocolo em que aplicamos um pré-pulso de voltagem a -40 mV, tornando os canais de Na⁺ inativos, como demonstrado na Figura 23.

Assim, o protocolo de tratamento com E64 durante 2 dias de formação dos EBs, mostrou ser eficaz em induzir a diferenciação da linhagem USP-1 de mESCs em células neurais, obtendo-se principalmente neurônios.

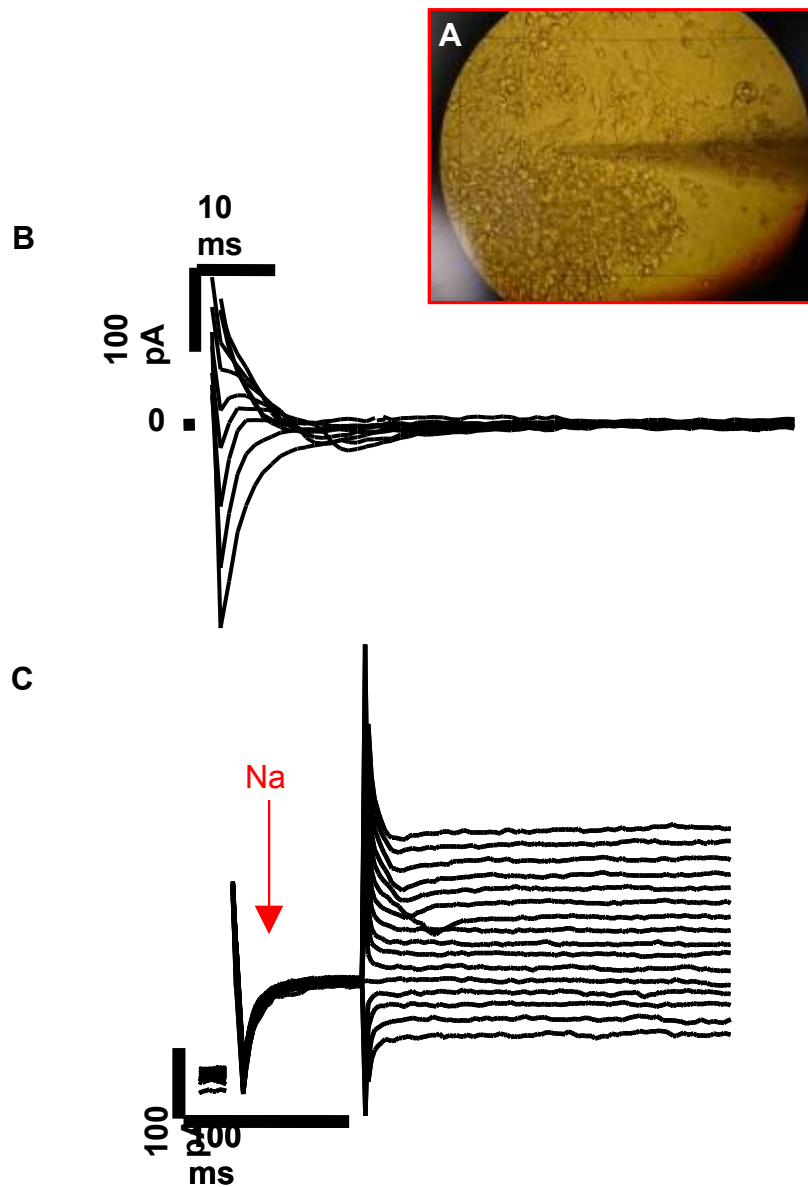


Figura 23. Perfil eletrofisiológico de mESC após o tratamento com E64. Os registros eletrofisiológicos foram realizados em mESC tratadas com $5\mu\text{M}$ de E64 no dia 24 do protocolo de tratamento. O potencial de membrana foi configurado a -70mV . Fotomicrografia mostrando a área dos explantes de EBs onde foram realizados os registros eletrofisiológicos (A). Registros de corrente de entrada sobre *voltage-clamp* para teste do potencial de membrana de -80 a $+70\text{mV}$ (B). Inibição da corrente de entrada com pré-pulso de -40mV mostrando a presença de corrente de entrada (C).

4.4 – Avaliação de inibidores de cisteína protease na diferenciação de hESC

Nesta etapa do trabalho, avaliamos se os inibidores de cisteína protease teriam efeitos similares aos observados em mESC em hESCs. Utilizamos os inibidores: E64 e a cistatina C. Este último foi descrito como um potente agente indutor da diferenciação de mESCs em células neurais (Kato et al., 2006), porém até hoje sua ação não havia sido investigada em hESCs.

Em um primeiro momento, assim como feito nas mESCs, avaliamos a manutenção do estado indiferenciado nas linhagens de hESCs. Em seguida investigamos os efeitos dos inibidores de protease na diferenciação de hESCs.

4.4.1 – Cultura de hESC

A linhagem celular H1 de hESC foi descongelada na passagem p47 sobre γ MEF em mantida em meio hESC. O crescimento das colônias foi então monitorado durante 7 dias (Figura 24A). Observamos que as colônias tiveram um crescimento em relação a sua área de 5,52 vezes nos 3 primeiros dias; seguido de 2,68 vezes do terceiro ao quinto dia e 2,4 vezes do quinto ao sétimo dia (Figura 24B).

As colônias de hESC-H1, tanto em coculturas com γ MEF como sobre Matrigel®, apresentaram características morfológicas indiferenciadas, com colônias planas, bordas delimitadas e células com núcleos grandes e pouco citoplasma (Figura 25A e B). Em placas de cultura com baixa aderência foram gerados EBs (Figura 25C). Células positivas para Oct-3/4 foram detectadas por imunocitoquímica em colônias de hESC após 4 dias sob lamínula e γ MEF (Figura 25F).

A

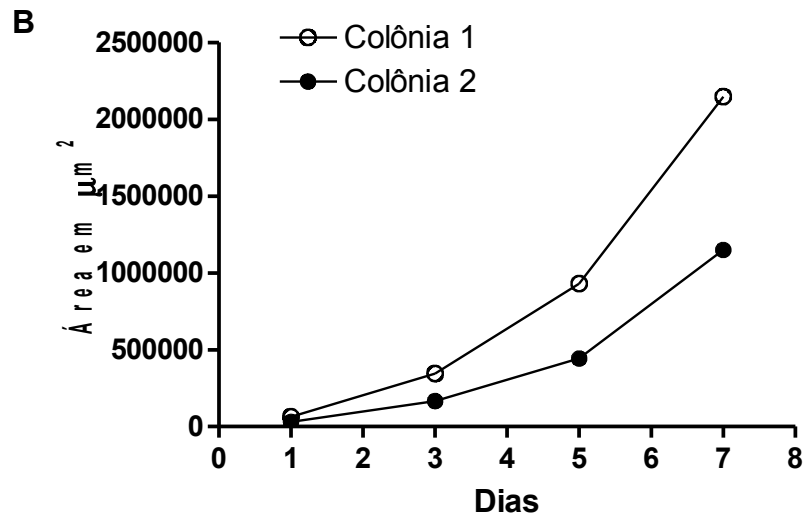
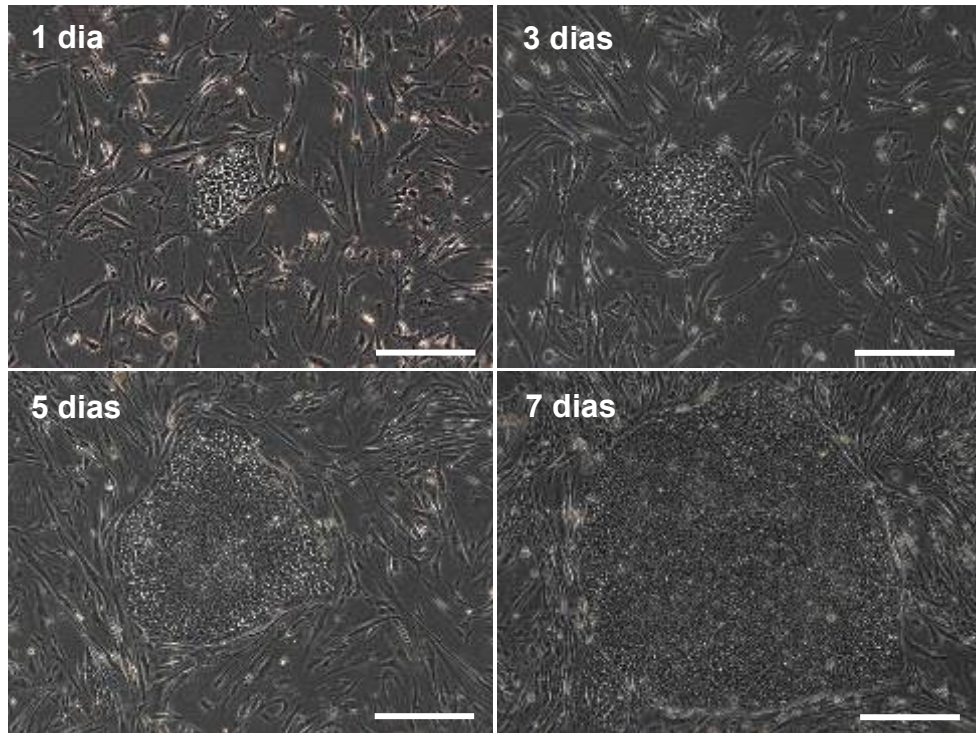


Figura 24. Cultura de hESC linhagem H1. Micrografias de contraste de fase mostrando o crescimento de uma colônia de hESC-H1 1, 3, 5 e 7 dias após passagem enzimática. O crescimento de duas colônias foi avaliado medindo-se as áreas durante sete dias de cultura (B).

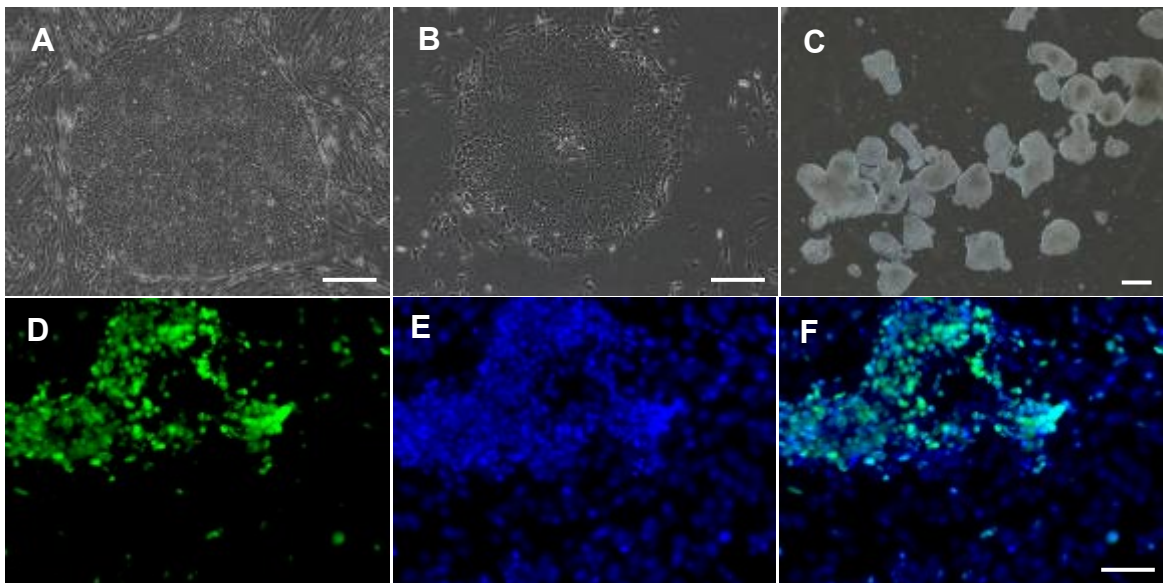


Figura 25. Características de hESC-H1 indiferenciada. Micrografias de contraste de fase mostrando uma colônia de hESC-H1 sobre γ MEF (A) e Matrigel® (B). Em ambas as condições as colônias apresentaram morfologia plana, bordas delimitadas e células com pouco citoplasma e núcleos grandes que são características de ESC indiferenciadas. Em placas de cultura de baixa aderência celular foram formados EBs (C). Imunocitoquímica mostrando marcação para Oct-3/4 (D). Núcleos foram corados com DAPI (E). Sobreposição de D e E (F). Barra de calibração de 100 μ m (A, B e C) e 50 μ m (F).

4.4.2 – Análise da formação de corpos embrióides de hESC-H1 após o tratamento com inibidores de cisteína proteases

Para avaliar se o tratamento com inibidores de cisteína proteases influenciava a formação de EBs, hESC-H1 foram mantidas durante 14 dias em placas de cultura com baixa aderência sob tratamento com E64 ou CysC. O tratamento com E64 ou CysC reduziu o número de EBs (33,7% e 32,0% respectivamente) em comparação com o grupo sem tratamento (Ctrl; Figura 26A). A diferença no número de EBs formados entre o Ctrl e os diferentes tratamentos não foi significativa ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey). Em relação às áreas dos EBs, encontramos no grupo tratado com E64 áreas 18,7% maiores e no grupo tratado com CysC áreas 2,7% menores, quando comparados com o grupo Ctrl (Figura 26B). Assim como o número de EBs, a diferença das áreas entre o Ctrl e os diferentes tratamentos não foi significativa ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey).

4.4.3 – O tratamento com inibidores de cisteína proteases não induziu o aumento dos níveis de mRNA de progenitores neurais em hESC-H1

Para avaliar se os inibidores E64 e CysC poderiam induzir a diferenciação hESC-H1 em células neurais, utilizamos qPT-PCR para verificar os níveis de mRNA de Pax6 e, como marcador de pluripotência, Sox2. Os níveis de mRNA foram analisados comparando os diferentes grupos estudados (Ctrl, E64 e CysC) e as hESC-H1 indiferenciadas (Indif). Os valores estão representados nas Tabelas 4 e 5 respectivamente. Nossas análises revelaram que os níveis de mRNA de Pax6 foram regulados positivamente em todos os grupos estudados em comparação com Indif, tanto no sétimo dia, como no décimo quarto dia do protocolo de tratamento (Figura 27A e B, Tabela 4). Quando comparamos os grupos que tiveram tratamento com o

grupo Ctrl, não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados em nenhum dos dias avaliados ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey).

Em relação aos níveis de mRNA de Sox2, nossas análises mostraram que em todos os grupos estudados houve regulação negativa em comparação com Indif (Figura 28A e B, Tabela 5). Em comparação com o grupo Ctrl, observamos que nenhum dos dois tratamentos mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA – Teste Tukey).

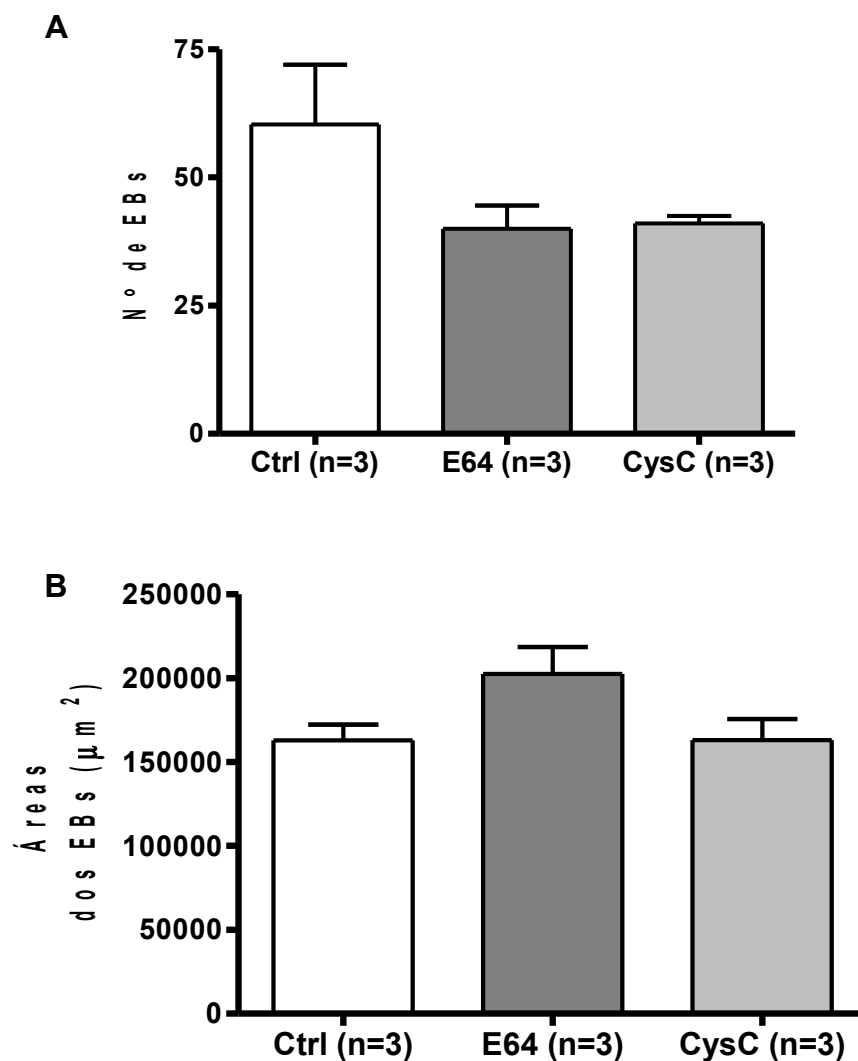


Figura 26. Análise do número e das áreas dos EBs formados sob os diferentes tratamentos com inibidores de cisteína proteases. hESC-H1 foram mantidas durante 4 dias em placas não aderentes sob o tratamento de E64 ou CysC. Os EBs formados foram quantificados nas diferentes condições estudadas (A). Também foram avaliadas as áreas dos EBs formados nas diferentes condições analisadas (B). Grupo controle (Ctrl), grupo tratado com E64 (E64) e grupo tratado com CysC (CysC). Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados em nenhuma das duas análises ($p > 0,05$; ANOVA – Tukey). Barras representam os valores das médias \pm EPM.

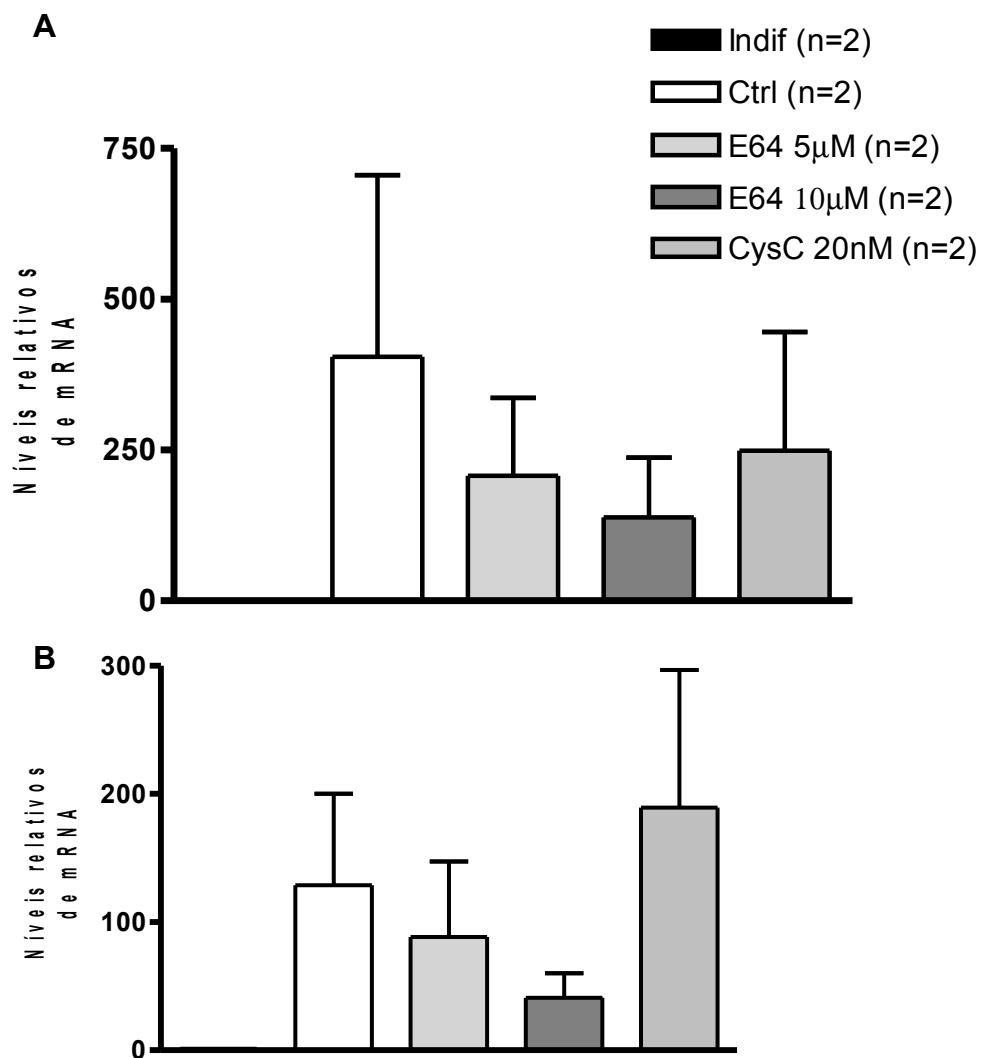


Figura 27. Níveis relativos de mRNA de Pax6 em hESC-H1 nas diferentes condições de tratamento. qRT-PCR foram realizados no dia 7 e 14 do protocolo de tratamento com E64 ou com CysC (A e B; respectivamente). A expressão de Pax6 foi analisada através da razão da expressão de Pax6 entre os grupos tratados e as células indiferenciadas (Indif). Barras representam os valores das médias \pm EPM. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

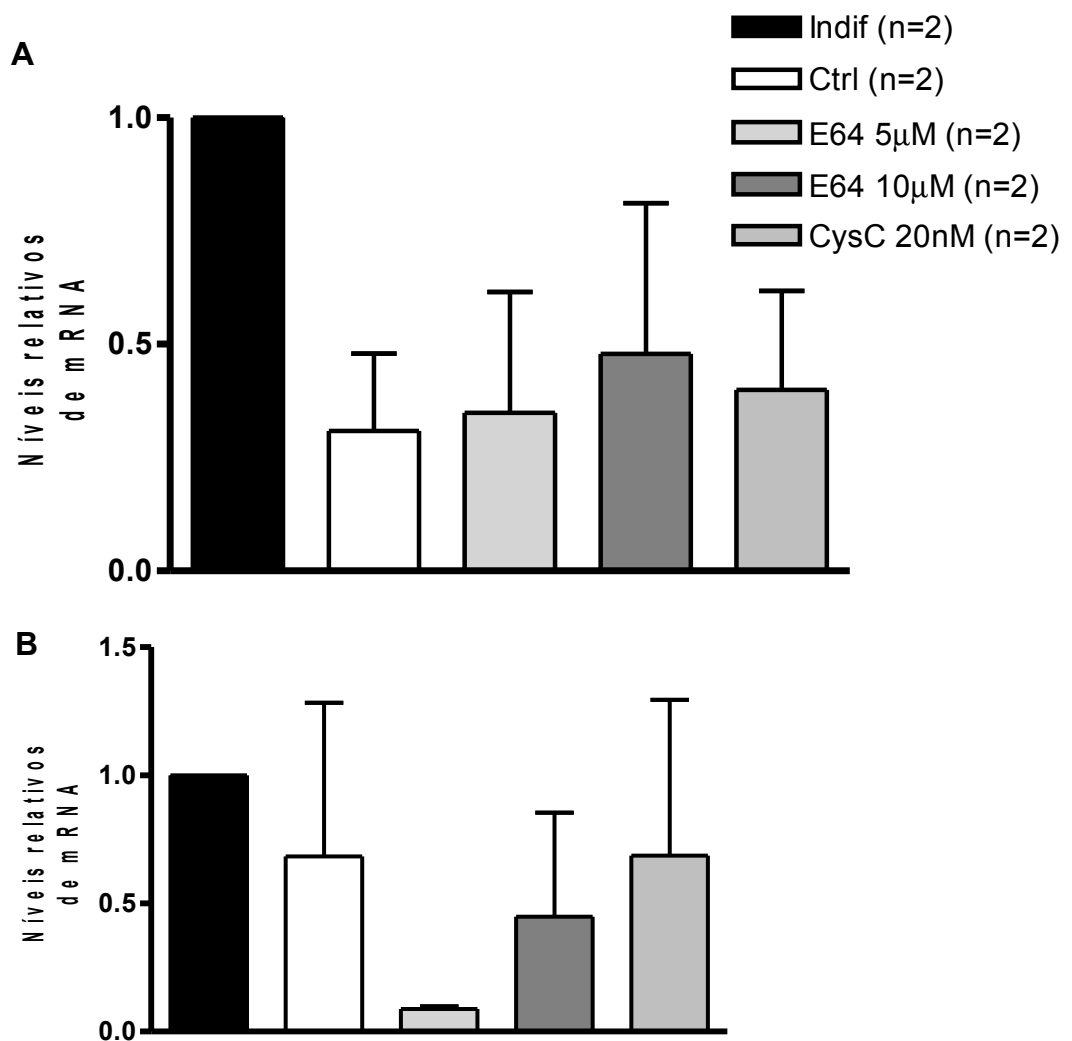


Figura 28. Níveis relativos de mRNA de Sox2 em hESC-H1 nas diferentes condições de tratamento. qRT-PCR foram realizados no dia 7 e 14 do protocolo de tratamento com E64 ou com CysC (A e B; respectivamente). A expressão de Sox2 foi analisada através da razão da expressão de Sox2 entre os grupos tratados e as células indiferenciadas (Indif). Barras representam os valores das médias \pm EPM. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

Tabela 4 – Níveis relativos de mRNA de Pax6 em hESC-H1 sob as diferentes condições estudadas

Grupos	Níveis relativos de mRNA de Pax6	
	Pax6 no dia 7 do tratamento	<i>Pax6 no dia 14 do tratamento</i>
Ctrl	404,7±426,4	128,0±100,5
E64 5µM	207,4±182,7	88,5±83,4
E64 10µM	138,2±139±5	40,8±27,5
CysC 20 nM	249,0±278,6	189,5±152,9

Média ± desvio padrão; n=2

Tabela 5 – Níveis relativos de mRNA de Sox2 em hESC-H1 sob as diferentes condições estudadas

Grupos	Níveis relativos de mRNA de Sox2	
	Sox2 no dia 7 do tratamento	<i>Sox2 no dia 14 do tratamento</i>
Ctrl	0,309±0,243	0,682±0,849
E64 5µM	0,348±0,377	0,089±0,013
E64 10µM	0,479±0,470	0,448±0,574
CysC 20nM	0,400±0,309	0,687±0,860

Média ± desvio padrão; n=2

4.4.4 – Culturas de hESC-H1 diferenciaram-se em células positivas para tubulina β -III independente do tratamento com inibidores de cisteína proteases.

Para verificar se o tratamento com os diferentes inibidores de proteases induzia a expressão de marcadores neuronais em hESC-H1, realizamos imunocitoquímica para tubulina β -III no 21º dia do protocolo de tratamento. Nossas análises revelaram a presença de tubulina β -III em todos os grupos estudados (Ctrl, E64 5 μ M e CysC), não havendo diferença no tratamento com inibidores de cisteína proteases na diferenciação de hESC-H1 em células positivas para tubulina β -III (Figura 29).

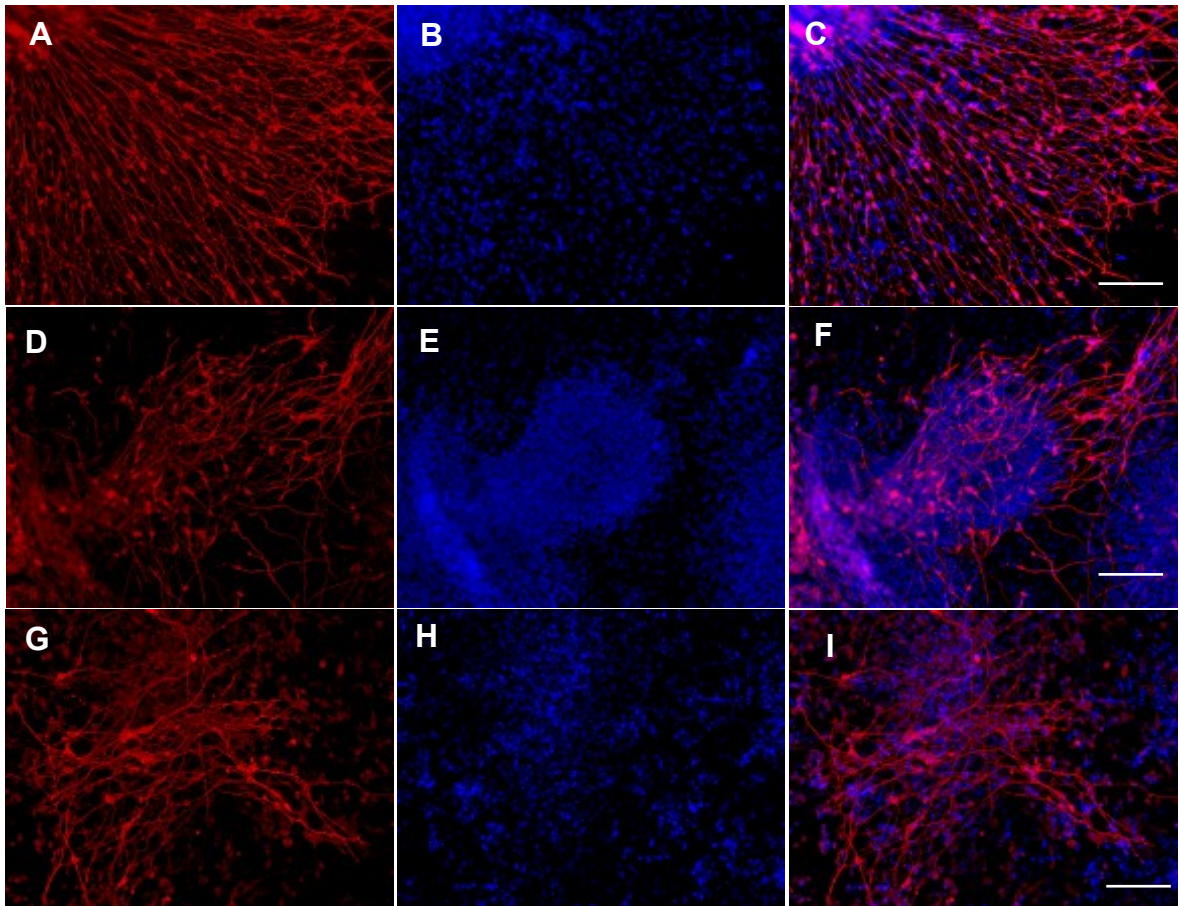


Figura 29. Diferenciação de hESC-H1 em células positivas para tubulina β -III. hESC-H1 foram tratadas com E64 (5 μ M) ou CysC (20nM) e no dia 21 do protocolo de tratamento foram detectadas células com características de neurônios. Imunocitoquímica mostrando células positivas para tubulina β -III em células do grupo controle (A), do grupo tratado com E64 (D) e do grupo tratado com CysC (G). Os núcleos foram corados com DAPI (B, E e H). Sobreposição das imagens (C, F e I). Barra de calibração de 50 μ m.

5 – DISCUSSÃO

Células-tronco embrionárias possuem capacidade de autorenovação ilimitada e plasticidade celular. Devido a estas características tornaram-se um importante instrumento no estudo do desenvolvimento do organismo. Isoladas em 1981, somente na metade da década de 90 iniciaram-se os estudos de diferenciação *in vitro* com o emprego do AR para induzir ao fenótipo neural (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981; Bain *et al.*, 1995).

Embora o uso do AR tenha demonstrado ser um fator indutor da diferenciação de ESCs em células neurais, diferenças entre protocolos e linhagens de ESCs podem resultar em rendimentos variados na obtenção de células neurais (Bain *et al.*, 1995; Fraichard *et al.*, 1995). Isolada em 2002 por Pereira *et al.*, a linhagem USP-1 de mESCs ainda não possui protocolo de diferenciação com AR descrito na literatura. Neste sentido, estabelecemos um protocolo rápido e eficaz, utilizando AR e o meio Neurobasal® suplementado com B27 para diferenciar a linhagem USP-1 de mESCs em células neurais, privilegiando a geração de neurônios.

Em uma primeira etapa, mantivemos a linhagem USP-1 indiferenciada em nosso laboratório por mais de 20 passagens. Os ensaios de *imunoblotting*, imunocitoquímica e RT-PCR mostraram que estas células expressavam marcadores de células pluripotentes como Oct-3/4, Nanog, SSEA-1, Sox2 e fosfatase alcalina. Uma vez confirmada às características de ESCs da linhagem USP-1, induzimos estas células a diferenciarem-se em células neurais com AR. Nosso protocolo mostrou ser eficaz gerando aproximadamente 72% de células positivas para nestina, marcador de progenitores neurais (Gilyarov, 2008) e onze dias após, quantificamos 64,7% de células positivas para NeuN, marcador de neurônios maduros (Mullen *et al.*, 1992), os quais dez dias após apresentaram propriedades eletrofisiológicas

típicas de neurônios. Além disso, observamos inúmeros prolongamentos celulares, que eram positivos para tubulina β -III, uma proteína do microtúbulo expressa em neurônios imaturos (Menezes e Luskin, 1994). Assim, nosso protocolo mostrou um incremento no número de neurônios semelhante aos protocolos descritos anteriormente (Bain *et al.*, 1995; Fraichard *et al.*, 1995), podendo ser utilizado para comparar os efeitos de outras drogas na diferenciação de mESC (USP-1) em células neurais e especificamente neurônios.

Embora o protocolo utilizado neste estudo seja semelhante ao descrito por Fraichard *et al.* (1995), o qual obteve astrócitos e oligodendrócitos, adotamos um meio de cultura diferente, o Neurobasal™ com suplemento B27 e sem SFB. Esta combinação privilegia principalmente a diferenciação e amadurecimento neuronal. Isto poderia explicar o reduzido número de células positivas para marcadores de astrócitos (GFAP) e a ausência de células positivas para marcadores de oligodendrócitos (MBP) em todos os dias analisados do protocolo. Por outro lado, o AR é conhecido por induzir a diferenciação neuronal, prevenindo a gênese prematura de astrócitos e oligodendrócitos (Hadinger *et al.*, 2009). Neste sentido, nossas análises de células positivas para GFAP e MBP podem ter sido realizadas antes do período de diferenciação destas células, já que em alguns protocolos estas células são vistas mais tardiamente (Nat *et al.*, 2007). Além disso, a obtenção de oligodendrócitos a partir de culturas de ESCs requer protocolos específicos, utilizando-se fatores e sistemas de culturas próprios a fim de enriquecer estas células *in vitro* (Nistor *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2009).

Uma vez estabelecido um protocolo de diferenciação de mESCs em células neurais, analisamos se outra droga poderia ter efeito semelhante ao observado com AR. Cistatina C, um inibidor de cisteína proteases endógeno e secretado por

diferentes tipos celulares do organismo, inclusive neuroesferas, mostrou induzir a diferenciação de mESCs em células neurais (Kato *et al.*, 2006). Embora CysC seja um inibidor de cisteína protease, o mecanismo pelo qual induz a diferenciação ainda não está claro. Kato *et al.* (2006) sugerem um mecanismo independente de atividade enzimática, estando relacionado a porção N-glicosilada desta molécula e em cooperação com FGF β . Entretanto, devido a CysC inibir somente a família das catepsinas em mamíferos, ainda não está claro se outras cisteína proteases poderiam estar envolvidas no processo de diferenciação. Neste sentido avaliamos se o E64, um inibidor sintético, irreversível e específico das cisteína proteases (em mamíferos catepsinas e calpaínas) poderia ter um papel na indução da diferenciação de mESCs em células neurais.

Utilizando o mesmo protocolo adotado com AR, tratamos mESCs com E64 em diferentes concentrações e avaliamos a expressão do Pax6 por *imunoblotting*. Pax6 é um fator de transcrição importante no desenvolvimento dos olhos e do sistema nervoso central, sendo expresso em células-tronco/progenitores neurais (Callaerts *et al.*, 1997). Nossos resultados mostraram que a expressão de Pax6 foi regulada positivamente e de forma dose dependente, elevando-se os níveis de expressão de Pax6 significativamente nos EBs sob tratamento com E64. Adicionalmente, quantificamos o número de células positivas para nestina após o tratamento com E64. O tratamento aumentou significativamente o número de células positivas para nestina fora dos explantes do EBs. Diferente da CysC, que tem sua ação relacionada com a glicosilação quando em cooperação com FGF β , nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que o tratamento com E64 e, portanto a inibição da atividade de cisteína proteases, estaria induzindo mESCs a expressarem marcadores de progenitores neurais.

Taupin *et al.* (2000) mostraram que CysC é secretada por células-tronco/progenitores neurais do hipocampo e agindo de forma autócrina e parácrina promovem *in vivo* e *in vitro* a proliferação destas células. O mecanismo envolvido nesta ação também está relacionado com N-glicosilação da CysC em cooperação com FGF β e não pela inibição da atividade de cisteína proteases. Porém, ainda não está claro se a O-glicosilação ou formas não glicosiladas também teriam o mesmo efeito (Dahl *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2007). Perguntamos então, se a inibição da atividade de cisteína protease com E64 poderia influenciar na proliferação celular de mESCs. Avaliamos o número e o tamanho (através do diâmetro) dos EBs após tratamento com E64. Assim, como mostrado nos estudos de Taupin *et al.* (2000) e Hasegawa *et al.* (2007) a inibição da atividade enzimática de cisteína proteases não induziu a proliferação celular. Todavia, estes resultados ainda precisam ser melhor investigados, sendo necessários ensaios mais precisos para verificação da proliferação celular. Por outro lado, o tratamento com E64 não mostrou efeito tóxico como observado com AR, o qual reduziu significativamente o número de EBs após dois dias de tratamento. Além de induzir a diferenciação neuronal, o AR também causa a morte celular por apoptose, diminuindo o rendimento no número de neurônios *in vitro* (Herget *et al.*, 1998). Assim, o tratamento de mESCs com E64, poderia ser um alternativa para gerar um maior número de progenitores neurais a partir de mESCs.

Em seguida avaliamos as características das culturas tratadas com E64 através da análise fenotípica. Nossas análises mostraram que no dia 3 do protocolo de diferenciação, além do elevado número de células positivas para nestina no interior e fora dos explantes de EBs, também detectamos células positivas para Pax6, porém em menor número. A expressão de Pax6 é rapidamente regulada de

forma negativa quando as células são transferidas para suporte aderente com poli-D-lisina/laminina reduzindo em cerca de 50% a sua expressão em três dias (Bibel *et al.*, 2004). Além disso, em modelo proposto de neurogênese inicial, Pax6 inibe a manutenção do estágio neuroepitelial induzindo estas células a diferenciarem-se em glia radial, a qual tem uma maior expressão de nestina (Suter *et al.*, 2009).

Ainda no dia 3 do protocolo, investigamos se já seria possível observar a presença de células positivas para GFAP e tubulina β -III. Em nenhuma das nossas análises, tanto com imunocitoquímica (dado não mostrado) como com *imunoblotting*, detectamos a presença destes marcadores no dia 3 do nosso protocolo. Estes resultados estão em concordância com os achados de Fraichard *et al.* (1995), no qual somente foram detectados astrócitos 6 dias e neurônios 5 dias após a indução com AR, necessitando assim de um maior tempo para amadurecimento dos progenitores neurais.

Analisamos no dia 14 do protocolo o perfil celular das culturas tratadas com E64. Detectamos células positivas para marcadores de neurônios imaturos com perfil migratório (células positivas para DCX e CD60b), neurônios maduros (células positivas para NeuN e NF200) e dez dias após, neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos (células positivas para GABA e tirosina hidroxilase). Porém o tratamento com E64 mostrou apenas uma tendência ao incremento de células positivas para NeuN. Quantificamos então, a expressão de marcadores de neurônios imaturos, através da tubulina β -III e da GAP-43. Esta última é uma proteína neuronal presente no desenvolvimento do sistema nervoso e tem sua expressão aumentada nos axônios após lesão (Benowitz e Routtenberg, 1997). Através da análise por densidade óptica obtida das bandas dos *imunoblotting* para tubulina β -III e da GAP-43 observamos novamente uma tendência no aumento da expressão de ambos os

marcadores. Neste sentido, a inibição das cisteínas proteases não estaria influenciando na maturação de neurônios, somente sendo observado o aumento de progenitores neurais gerados de mESCs nos primeiros dias do protocolo de diferenciação.

Uma possibilidade para não termos obtidos números significativos de neurônios em nossa cultura, seria a presença de outras células neurais. Avaliamos então se os progenitores neurais observados nos primeiros dias após o tratamento com E64 teriam se diferenciado em células da glia. Assim como observado com AR, encontramos poucas células positivas para GFAP e não detectamos células positivas para MBP. Perguntamos então, se haviam ainda células com características indiferenciadas no dia 14 do nosso protocolo de tratamento com E64. Investigamos através da análise por qRT-PCR a presença de genes relacionados com a pluripotência. Os níveis de mRNA de Oct-3/4 e Nanog foram regulados negativamente em todos grupos analisados quando comparados com as células indiferenciadas. Porém, somente em células tratadas com E64 os níveis de mRNA de Sox2 não mostraram diferença significativa em comparação com as células indiferenciadas. Embora Sox2 seja um fator de transcrição relacionado com a pluripotência, ele também é expresso em altos níveis em células-tronco neurais (Li *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2008). Neste sentido, sugerimos que a inibição da atividade de cisteína protease pelo E64, estaria guiando as mESCs a um primeiro estágio da diferenciação neural, porém sem participação no amadurecimento neuronal.

A expressão de marcadores neuronais após diferenciação *in vitro*, nem sempre indica a real presença de neurônios funcionais. Em estudo recente mostrou-se que células mesenquimais sob indução química assumem morfologia e expressam marcadores neuronais, mas não possuem propriedades eletrofisiológicas

de neurônios (Barnabe *et al.*, 2009). Este trabalho sugere que o estresse celular poderia alterar a morfologia celular e regular os genes das células mesenquimais levando a expressão de proteínas neuronais. Portanto, a análise das propriedades eletrofisiológicas torna-se de real importância em protocolos de diferenciação em neurônios. Neste sentido, realizamos registros eletrofisiológicos das células tratadas com E64 no dia 24 do protocolo de diferenciação. Nossas análises mostraram células com corrente de entrada de Na⁺, as quais foram bloqueadas com TTX, indicando a presença de neurônios com propriedades eletrofisiológicas. Além disso, detectamos por imunomarcação a presença de células positivas para Nav 1.5, um antígeno relacionado a uma subunidade de canais de sódio. Também observamos canais de potássio, e a presença de corrente retificadora em 60% das células analisadas, mostrando pela primeira vez que a inibição da atividade das cisteínas protease com E64 gera neurônios eletricamente funcionais *in vitro* a partir de mESCs.

Em uma terceira etapa avaliamos se a inibição da atividade de cisteína proteases com E64 e o recombinante humano da CysC (hCysC) poderiam induzir hESCs em fenótipo neural. Nossas análises, ainda que preliminares, não mostraram diferenças nos níveis de Pax6 e de Sox2 quando estes compostos foram adicionados em culturas de hESCs. Diferenças entre mESCs e hESCs, tanto na manutenção do estado indiferenciado como entre mecanismos de diferenciação, já foram descritas em estudos anteriores (Darr e Benvenisty, 2006), sugerindo assim que a inibição das cisteínas proteases não participaria em eventos de diferenciação neural a partir de hESCs. Entretanto, hCysC é uma forma não glicosilada deste inibidor endógeno, diferente dos encontrados em rato e em camundongo, os quais induzem a proliferação de precursores neurais e a diferenciação de mESCs

respectivamente (Taupin *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2006). Neste sentido, nossos resultados obtidos com hCysC estariam corroborando a hipótese de que somente a forma glicosilada deste inibidor induziria a diferenciação de ESCs, embora ainda não tenha sido demonstrado que a forma glicosilada da CysC teria esse papel em hESCs.

O mecanismo pelo qual a inibição da atividade de cisteína protease pelo E64 participaria na regulação de genes a favor da diferenciação neuronal ainda precisa ser esclarecido. No entanto, o mecanismo proposto para a CysC deve ser diferente do E64, já que este não possui porção glicosilada. Em mamíferos duas cisteína proteases são descritas: catepsinas e calpaínas. Cistatinas apenas inibem catepsinas, enquanto E64 inibe ambas as famílias de cisteína proteases (Katunuma e Kominami, 1995). A forma não-glicosilada da CysC inibe a atividade das cisteína proteases, no caso as catepsinas, porém o efeito proliferativo observado em progenitores neurais é independente de atividade enzimática (Taupin *et al.*, 2000). Além disso, somente um estudo com células tumorais demonstrou a internalização da CysC, mostrando colocalização com os lisossomos, onde há grande concentração de catepsinas (Ekstrom *et al.*, 2008), sugerindo portanto, que a CysC teria uma maior ação no meio extracelular (Katunuma e Kominami, 1995). Por outro lado, quando as células multipotentes mesenquimais foram induzidas com BMP a se diferenciar em células osteoblásticas, os genes das calpaínas foram regulados positivamente de forma expressiva, mostrando uma correlação entre a via de sinalização de BMP e as calpaínas (Murray *et al.*, 1997). É interessante que a inibição do sinal de BMP está diretamente envolvida na formação do neuroectoderma e têm sido utilizada em protocolos de diferenciação neural (Lamb *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 2002; Lamba *et al.*, 2006). Assim, sugerimos que a

inibição da atividade de calpaínas pelo E64 poderia estar envolvida na sinalização de BMP e, portanto, regulando a expressão de genes da diferenciação neural primordial.

Nesta tese de doutorado, nós mostramos que a inibição de cisteína proteases pelo E64 induziu o aumento de marcadores neuronais precoce em mESCs. Além disso, mostramos que os efeitos observado para mESCs não foi reproduzido em hESCs, ainda que preliminarmente e que CysC não-glicosilada não induz a diferenciação em células neurais. Por último, sugerimos a participação das calpaínas durante os eventos celulares do desenvolvimento do sistema nervoso.

6 – CONCLUSÕES

- Estabelecemos um protocolo rápido e eficaz de diferenciação da linhagem USP-1 de mESCs em células neurais com AR e Neurobasal, enriquecendo em 72,7% o número de células progenitoras neurais (células positivas para nestina) e 126,5% o número de células com fenótipo de neurônios maduros (células positivas para NeuN).
- O tratamento com AR induziu a diferenciação de mESCs em neurônios com propriedades eletrofisiológicas após 24 dias *in vitro*.
- A inibição das cisteína proteases de mESCs com E64 levou a um enriquecimento de: 118,5% de células progenitoras neurais (células positivas para nestina); 53,9% de células com fenótipo de neurônios maduros (células positivas para NeuN); e 64,0% de células que expressam GAP-43.
- Embora não tivéssemos realizados ensaios de proliferação celular, os resultados quantitativos e morfológicos dos EBs sugerem, que a inibição das cisteína proteases de mESCs com E64 não aumentou a proliferação celular, corroborando com os dados de Taupin *et al.*; (2000). Todavia, este tratamento não apresentou citotoxicidade como visto com o tratamento com AR.
- O tratamento de mESCs com E64 induziu a diferenciação de neurônios com propriedades eletrofisiológicas após 24 dias *in vitro*.
- O protocolo de diferenciação de mESC em células neurais utilizado durante o desenvolvimento desta tese de doutorado privilegiou a diferenciação de células com características de neurônios, não sendo útil para diferenciação de células da glia.
- A inibição das cisteína proteases de mESCs com E64 elevou significativamente o número de células progenitoras neurais, porém não levou

a um amadurecimento significativo destas células, mantendo-se altos níveis de mRNA de marcadores de células progenitoras neurais após 14 dias *in vitro*.

- Nossos resultados preliminares mostraram que a inibição da cisteína proteases de hESCs com E64 não induz a diferenciação em células neurais
- O tratamento de hESCs com o recombinante humano da CysC não induziu a diferenciação destas células em células neurais, indicando que a ausência de glicosilação da CysC não tem o mesmo efeito que a forma glicosilada.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, S., ROMAGNANO, L. e BABIARZ, B. **The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation.** Development, v.124, n.17, p.3415-25. 1997.

AFONSO, S., TOVAR, C., ROMAGNANO, L. e BABIARZ, B. **Control and expression of cystatin C by mouse decidual cultures.** Mol Reprod Dev, v.61, n.2, p.155-63. 2002.

AHUJA, S., AHUJA-JENSEN, P., JOHNSON, L. E., CAFFE, A. R., ABRAHAMSON, M., EKSTROM, P. A. e VAN VEEN, T. **rd1 Mouse retina shows an imbalance in the activity of cysteine protease cathepsins and their endogenous inhibitor cystatin C.** Invest Ophthalmol Vis Sci, v.49, n.3, p.1089-96. 2008.

ALENINA, N., BASHAMMAKH, S. e BADER, M. **Specification and differentiation of serotonergic neurons.** Stem Cell Rev, v.2, n.1, p.5-10. 2006.

ALIZADEH, P., SMIT-MCBRIDE, Z., OLTJEN, S. L. e HJELMELAND, L. M. **Regulation of cysteine cathepsin expression by oxidative stress in the retinal pigment epithelium/choroid of the mouse.** Exp Eye Res, v.83, n.3, p.679-87. 2006.

AMBROSETTI, D. C., BASILICO, C. e DAILEY, L. **Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites.** Mol Cell Biol, v.17, n.11, p.6321-9. 1997.

AMIT, M., CARPENTER, M. K., INOKUMA, M. S., CHIU, C. P., HARRIS, C. P., WAKNITZ, M. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J. e THOMSON, J. A. **Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.** Dev Biol, v.227, n.2, p.271-8. 2000.

ANDERSON, R. M., LAWRENCE, A. R., STOTTMANN, R. W., BACHILLER, D. e KLINGENSMITH, J. **Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse.** Development, v.129, n.21, p.4975-87. 2002.

ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A., LEKER, R. R., SOLDNER, F., HOEPPNER, D. J., RAVIN, R., POSER, S. W., RUEGER, M. A., BAE, S. K., KITTAPPA, R. e MCKAY, R. D. **Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo*.** Nature, v.442, n.7104, p.823-6. 2006.

AOKI, H., HARA, A., NAKAGAWA, S., MOTOHASHI, T., HIRANO, M., TAKAHASHI, Y. e KUNISADA, T. **Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors *in vitro* develop into RPE cell monolayers *in vivo***. *Exp Eye Res*, v.82, n.2, p.265-74. 2006.

AOKI, H., HARA, A., NIWA, M., MOTOHASHI, T., SUZUKI, T. e KUNISADA, T. **An *in vitro* mouse model for retinal ganglion cell replacement therapy using eye-like structures differentiated from ES cells**. *Exp Eye Res*, v.84, n.5, p.868-75. 2007.

AOKI, H., HARA, A., NIWA, M., MOTOHASHI, T., SUZUKI, T. e KUNISADA, T. **Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo* regeneration of retinal ganglion-like cells**. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, v.246, n.2, p.255-65. 2008.

AVILION, A. A., NICOLIS, S. K., PEVNY, L. H., PEREZ, L., VIVIAN, N. e LOVELL-BADGE, R. **Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function**. *Genes Dev*, v.17, n.1, p.126-40. 2003.

BAIN, G. e GOTTLIEB, D. I. **Expression of retinoid X receptors in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells**. *Biochem Biophys Res Commun*, v.200, n.3, p.1252-6. 1994.

BAIN, G., KITCHENS, D., YAO, M., HUETTNER, J. E. e GOTTLIEB, D. I. **Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro***. *Dev Biol*, v.168, n.2, p.342-57. 1995.

BAIN, G., RAY, W. J., YAO, M. e GOTTLIEB, D. I. **Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture**. *Biochem Biophys Res Commun*, v.223, n.3, p.691-4. 1996.

BARNABE, G. F., SCHWINDT, T. T., CALCAGNOTTO, M. E., MOTTA, F. L., MARTINEZ, G., JR., DE OLIVEIRA, A. C., KEIM, L. M., D'ALMEIDA, V., MENDEZ-OTERO, R. e MELLO, L. E. **Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties**. *PLoS One*, v.4, n.4, p.e5222. 2009.

BARRETT, A. J., KEMHAVI, A. A., BROWN, M. A., KIRSCHKE, H., KNIGHT, C. G., TAMAI, M. e HANADA, K. **L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L**. *Biochem J*, v.201, n.1, p.189-98. 1982.

BECKER, A. J., MC, C. E. e TILL, J. E. **Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.** Nature, v.197, p.452-4. 1963.

BELTRAMI, A. P., BARLUCCHI, L., TORELLA, D., BAKER, M., LIMANA, F., CHIMENTI, S., KASAHARA, H., ROTA, M., MUSSO, E., URBANEK, K., LERI, A., KAJSTURA, J., NADAL-GINARD, B. e ANVERSA, P. **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** Cell, v.114, n.6, p.763-76. 2003.

BENOWITZ, L. I. e ROUTTENBERG, A. **GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity.** Trends Neurosci, v.20, n.2, p.84-91. 1997.

BENUSSI, L., GHIDONI, R., STEINHOFF, T., ALBERICI, A., VILLA, A., MAZZOLI, F., NICOSIA, F., BARBIERO, L., BROGLIO, L., FEUDATARI, E., SIGNORINI, S., FINCKH, U., NITSCH, R. M. e BINETTI, G. **Alzheimer disease-associated cystatin C variant undergoes impaired secretion.** Neurobiol Dis, v.13, n.1, p.15-21. 2003.

BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S. e ROBEY, P. G. **Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.** Stem Cells, v.19, n.3, p.180-92. 2001.

BIBEL, M., RICHTER, J., SCHRENK, K., TUCKER, K. L., STAIGER, V., KORTE, M., GOETZ, M. e BARDE, Y. A. **Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage.** Nat Neurosci, v.7, n.9, p.1003-9. 2004.

BONGSO, A., FONG, C. Y., NG, S. C. e RATNAM, S. **Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts.** Hum Reprod, v.9, n.11, p.2110-7. 1994.

BOTTENSTEIN, J. E. e SATO, G. H. **Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.1, p.514-7. 1979.

BRAAM, S. R., DENNING, C., MATSA, E., YOUNG, L. E., PASSIER, R. e MUMMERY, C. L. **Feeder-free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification.** Nat Protoc, v.3, n.9, p.1435-43. 2008.

BRADLEY, A., EVANS, M., KAUFMAN, M. H. e ROBERTSON, E. **Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines.** Nature, v.309, n.5965, p.255-6. 1984.

BRANNVALL, K., HJELM, H., KORHONEN, L., LAHTINEN, U., LEHESJOKI, A. E. e LINDHOLM, D. **Cystatin-B is expressed by neural stem cells and by differentiated neurons and astrocytes**. *Biochem Biophys Res Commun*, v.308, n.2, p.369-74. 2003.

BREDERLAU, A., CORREIA, A. S., ANISIMOV, S. V., ELMI, M., PAUL, G., ROYBON, L., MORIZANE, A., BERGQUIST, F., RIEBE, I., NANNMARK, U., CARTA, M., HANSE, E., TAKAHASHI, J., SASAI, Y., FUNA, K., BRUNDIN, P., ERIKSSON, P. S. e LI, J. Y. **Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of *in vitro* differentiation on graft survival and teratoma formation**. *Stem Cells*, v.24, n.6, p.1433-40. 2006.

BURDON, T., STRACEY, C., CHAMBERS, I., NICHOLS, J. e SMITH, A. **Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells**. *Dev Biol*, v.210, n.1, p.30-43. 1999.

BUYTAERT-HOEFEN, K. A., ALVAREZ, E. e FREED, C. R. **Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF**. *Stem Cells*, v.22, n.5, p.669-74. 2004.

CAI, J., XUE, H., ZHAN, M. e RAO, M. S. **Characterization of progenitor-cell-specific genes identified by subtractive suppression hybridization**. *Dev Neurosci*, v.26, n.2-4, p.131-47. 2004.

CALLAERTS, P., HALDER, G. e GEHRING, W. J. **PAX-6 in development and evolution**. *Annu Rev Neurosci*, v.20, p.483-532. 1997.

CAMARASA, M., BRISON, D., KIMBER, S. J. e HANDYSIDE, A. H. **Naturally Immortalised Mouse Embryonic Fibroblast Lines Support Human Embryonic Stem Cell Growth**. *Cloning Stem Cells*, Jul 13. 2009.

CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., NICHOLS, J., LEE, S., TWEEDIE, S. e SMITH, A. **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells**. *Cell*, v.113, n.5, p.643-55. 2003.

CHATZI, C., SCOTT, R. H., PU, J., LANG, B., NAKAMOTO, C., MCCAIG, C. D. e SHEN, S. **Derivation of homogeneous GABAergic neurons from mouse embryonic stem cells**. *Exp Neurol*, v.217, n.2, p.407-16. 2009.

CHIBA, S., LEE, Y. M., ZHOU, W. e FREED, C. R. **Noggin enhances dopamine neuron production from human embryonic stem cells and improves behavioral**

outcome after transplantation into Parkinsonian rats. Stem Cells, v.26, n.11, p.2810-20. 2008.

CHO, M. S., HWANG, D. Y. e KIM, D. W. **Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale.** Nat Protoc, v.3, n.12, p.1888-94. 2008a.

CHO, M. S., LEE, Y. E., KIM, J. Y., CHUNG, S., CHO, Y. H., KIM, D. S., KANG, S. M., LEE, H., KIM, M. H., KIM, J. H., LEEM, J. W., OH, S. K., CHOI, Y. M., HWANG, D. Y., CHANG, J. W. e KIM, D. W. **Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.9, p.3392-7. 2008b.

COWAN, C. A., KLIMANSKAYA, I., MCMAHON, J., ATIENZA, J., WITMYER, J., ZUCKER, J. P., WANG, S., MORTON, C. C., MCMAHON, A. P., POWERS, D. e MELTON, D. A. **Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts.** N Engl J Med, v.350, n.13, p.1353-6. 2004.

DAHERON, L., OPITZ, S. L., ZAEHRES, H., LENSCH, W. M., ANDREWS, P. W., ITSKOVITZ-ELDOR, J. e DALEY, G. Q. **LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells.** Stem Cells, v.22, n.5, p.770-8. 2004.

DAHL, A., ERIKSSON, P. S., DAVIDSSON, P., PERSSON, A. I., EKMAN, R. e WESTMAN-BRINKMALM, A. **Demonstration of multiple novel glycoforms of the stem cell survival factor CCg.** J Neurosci Res, v.77, n.1, p.9-14. 2004.

DARR, H. e BENVENISTY, N. **Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation.** Regen Med, v.1, n.3, p.317-25. 2006.

DOETSCH, F., CAILLE, I., LIM, D. A., GARCIA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.** Cell, v.97, n.6, p.703-16. 1999.

DVASH, T., MAYSHAR, Y., DARR, H., MCELHANEY, M., BARKER, D., YANUKA, O., KOTKOW, K. J., RUBIN, L. L., BENVENISTY, N. e EIGES, R. **Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies.** Hum Reprod, v.19, n.12, p.2875-83. 2004.

EISELLEOVA, L., PETERKOVA, I., NERADIL, J., SLANINOVA, I., HAMPL, A. e DVORAK, P. **Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells.** Int J Dev Biol, v.52, n.4, p.353-63. 2008.

EKSTROM, U., WALLIN, H., LORENZO, J., HOLMQVIST, B., ABRAHAMSON, M. e AVILES, F. X. **Internalization of cystatin C in human cell lines**. *Febs J*, v.275, n.18, p.4571-82. 2008.

ELSTNER, A., DAMASCHUN, A., KURTZ, A., STACEY, G., ARAN, B., VEIGA, A. e BORSTLAP, J. **The changing landscape of European and international regulation on embryonic stem cell research**. *Stem Cell Res*, v.2, n.2, p.101-7. 2009.

EVANS, M. J. e KAUFMAN, M. H. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos**. *Nature*, v.292, n.5819, p.154-6. 1981.

FEINSTEIN-ROTKOPF, Y. e ARAMA, E. **Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes**. *Apoptosis*, v.14, n.8, p.980-95. 2009.

FERNANDES, A. M., MARINHO, P. A., SARTORE, R. C., PAULSEN, B. S., MARIANTE, R. M., CASTILHO, L. R. e REHEN, S. K. **Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system**. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.6, p.515-22. 2009.

FRAICHARD, A., CHASSANDE, O., BILBAUT, G., DEHAY, C., SAVATIER, P. e SAMARUT, J. **In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons**. *J Cell Sci*, v.108 (Pt 10), p.3181-8. 1995.

FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K. e LALYKINA, K. S. **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells**. *Cell Tissue Kinet*, v.3, n.4, p.393-403. 1970.

FRIEDENSTEIN, A. J., PIATETZKY, S., II e PETRAKOVA, K. V. **Osteogenesis in transplants of bone marrow cells**. *J Embryol Exp Morphol*, v.16, n.3, p.381-90. 1966.

GAGE, F. H., RAY, J. e FISHER, L. J. **Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS**. *Annu Rev Neurosci*, v.18, p.159-92. 1995.

GAJOVIC, S., ST-ONGE, L., YOKOTA, Y. e GRUSS, P. **Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells**. *Differentiation*, v.62, n.4, p.187-92. 1997.

GHAZIZADEH, S. e TAICHMAN, L. B. **Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin.** *Embo J*, v.20, n.6, p.1215-22. 2001.

GHIDONI, R., BENUSSI, L., PATERLINI, A., MISSALE, C., USARDI, A., ROSSI, R., BARBIERO, L., SPANO, P. e BINETTI, G. **Presenilin 2 mutations alter cystatin C trafficking in mouse primary neurons.** *Neurobiol Aging*, v.28, n.3, p.371-6. 2007.

GIEHL, K. M. **Neuronal development.** *Prog Exp Tumor Res*, v.39, p.1-29. 2007.

GIL, J. E., WOO, D. H., SHIM, J. H., KIM, S. E., YOU, H. J., PARK, S. H., PAEK, S. H., KIM, S. K. e KIM, J. H. **Vitronectin promotes oligodendrocyte differentiation during neurogenesis of human embryonic stem cells.** *FEBS Lett*, v.583, n.3, p.561-7. 2009.

GILYAROV, A. V. **Nestin in central nervous system cells.** *Neurosci Behav Physiol*, v.38, n.2, p.165-9. 2008.

GLASER, T. e BRUSTLE, O. **Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection.** *Trends Neurosci*, v.28, n.8, p.397-400. 2005.

GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W. e CONG, J. **The calpain system.** *Physiol Rev*, v.83, n.3, p.731-801. 2003.

HADINGER, N., VARGA, B. V., BERZSENYI, S., KORNYEI, Z., MADARASZ, E. e HERBERTH, B. **Astroglia genesis *in vitro*: distinct effects of retinoic acid in different phases of neural stem cell differentiation.** *Int J Dev Neurosci*, v.27, n.4, p.365-75. 2009.

HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. e SIGWORTH, F. J. **Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.** *Pflugers Arch*, v.391, n.2, p.85-100. 1981.

HASEGAWA, A., NARUSE, M., HITOSHI, S., IWASAKI, Y., TAKEBAYASHI, H. e IKENAKA, K. **Regulation of glial development by cystatin C.** *J Neurochem*, v.100, n.1, p.12-22. 2007.

HASHIDA, S., KOMINAMI, E. e KATUNUMA, N. **Inhibitions of cathepsin B and cathepsin L by E-64 *in vivo*. II. Incorporation of [3H]E-64 into rat liver lysosomes *in vivo*.** *J Biochem*, v.91, n.4, p.1373-80. 1982.

HEISKANEN, A., SATOMAA, T., TIITINEN, S., LAITINEN, A., MANNELIN, S., IMPOLA, U., MIKKOLA, M., OLSSON, C., MILLER-PODRAZA, H., BLOMQVIST, M., OLONEN, A., SALO, H., LEHENKARI, P., TUURI, T., OTONKOSKI, T., NATUNEN, J., SAARINEN, J. e LAINE, J. **N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible.** Stem Cells, v.25, n.1, p.197-202. 2007.

HERGET, T., SPECHT, H., ESDAR, C., OEHRLEIN, S. A. e MAELICKE, A. **Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line.** J Neurochem, v.70, n.1, p.47-58. 1998.

HISAMATSU-SAKAMOTO, M., SAKAMOTO, N. e ROSENBERG, A. S. **Embryonic stem cells cultured in serum-free medium acquire bovine apolipoprotein B-100 from feeder cell layers and serum replacement medium.** Stem Cells, v.26, n.1, p.72-8. 2008.

HONDA, A., HIROSE, M., INOUE, K., Ogonuki, N., MIKI, H., SHIMOZAWA, N., HATORI, M., SHIMIZU, N., MURATA, T., HIROSE, M., KATAYAMA, K., WAKISAKA, N., MIYOSHI, H., YOKOYAMA, K. K., SANKAI, T. e OGURA, A. **Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research.** Reprod Biomed Online, v.17, n.5, p.706-15. 2008.

HU, B. Y. e ZHANG, S. C. **Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells.** Nat Protoc, v.4, n.9, p.1295-304. 2009.

HU, Z., LI, T., ZHANG, X. e CHEN, Y. **Hepatocyte growth factor enhances the generation of high-purity oligodendrocytes from human embryonic stem cells.** Differentiation, 2009.

HUMPHREY, R. K., BEATTIE, G. M., LOPEZ, A. D., BUCAY, N., KING, C. C., FIRPO, M. T., ROSE-JOHN, S. e HAYEK, A. **Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent.** Stem Cells, v.22, n.4, p.522-30. 2004.

IKEDA, H., OSAKADA, F., WATANABE, K., MIZUSEKI, K., HARAGUCHI, T., MIYOSHI, H., KAMIYA, D., HONDA, Y., SASAI, N., YOSHIMURA, N., TAKAHASHI, M. e SASAI, Y. **Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.32, p.11331-6. 2005.

ILIC, D., KAPIDZIC, M. e GENBACEV, O. **Isolation of human placental fibroblasts.** Curr Protoc Stem Cell Biol, v.Chapter 1, p.Unit 1C 6. 2008.

INTAWICHA, P., OU, Y. W., LO, N. W., ZHANG, S. C., CHEN, Y. Z., LIN, T. A., SU, H. L., GUU, H. F., CHEN, M. J., LEE, K. H., CHIU, Y. T. e JU, J. C. **Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos.** Cloning Stem Cells, v.11, n.1, p.27-38. 2009.

JAGATHA, B., DIVYA, M. S., SANALKUMAR, R., INDULEKHA, C. L., VIDYANAND, S., DIVYA, T. S., DAS, A. V. e JAMES, J. **In vitro differentiation of retinal ganglion-like cells from embryonic stem cell derived neural progenitors.** Biochem Biophys Res Commun, v.380, n.2, p.230-5. 2009.

JOHANSSON, C. B., MOMMA, S., CLARKE, D. L., RISLING, M., LENDAHL, U. e FRISEN, J. **Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.** Cell, v.96, n.1, p.25-34. 1999.

JONES-VILLENEUVE, E. M., MCBURNEY, M. W., ROGERS, K. A. e KALNINS, V. I. **Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells.** J Cell Biol, v.94, n.2, p.253-62. 1982.

KANG, H. B., KIM, J. S., KWON, H. J., NAM, K. H., YOUN, H. S., SOK, D. E. e LEE, Y. **Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1.** Stem Cells Dev, v.14, n.4, p.395-401. 2005.

KANG, S. M., CHO, M. S., SEO, H., YOON, C. J., OH, S. K., CHOI, Y. M. e KIM, D. W. **Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells.** Stem Cells, v.25, n.2, p.419-24. 2007.

KATO, T., HEIKE, T., OKAWA, K., HARUYAMA, M., SHIRAISHI, K., YOSHIMOTO, M., NAGATO, M., SHIBATA, M., KUMADA, T., YAMANAKA, Y., HATTORI, H. e NAKAHATA, T. **A neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.15, p.6019-24. 2006.

KATUNUMA, N. e KOMINAMI, E. **Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives.** Methods Enzymol, v.251, p.382-97. 1995.

KAWAHARA, Y., MANABE, T., MATSUMOTO, M., KAJIUME, T., MATSUMOTO, M. e YUGE, L. **LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity.** PLoS One, v.4, n.7, p.e6343. 2009.

KIM, D., KIM, C. H., MOON, J. I., CHUNG, Y. G., CHANG, M. Y., HAN, B. S., KO, S., YANG, E., CHA, K. Y., LANZA, R. e KIM, K. S. **Generation of human induced**

pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell, v.4, n.6, p.472-6. 2009.

KIM, J. B., GREBER, B., ARAUZO-BRAVO, M. J., MEYER, J., PARK, K. I., ZAEHRES, H. e SCHOLER, H. R. **Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4.** Nature, 2009.

KLIMANSKAYA, I., CHUNG, Y., BECKER, S., LU, S. J. e LANZA, R. **Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres.** Nat Protoc, v.2, n.8, p.1963-72. 2007.

KOBAYASHI, N. **Cell therapy for diabetes mellitus.** Cell Transplant, v.15, n.10, p.849-54. 2006.

KOBLAS, T., ZACHAROVANOVA, K., BERKOVA, Z., MINDLOVA, M., GIRMAN, P., DOVOLILOVA, E., KARASOVA, L. e SAUDEK, F. **Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells.** Folia Biol (Praha), v.53, n.1, p.13-22. 2007.

KUBIKOVA, I., KONECNA, H., SEDO, O., ZDRAHAL, Z., REHULKA, P., HRIBKOVA, H., REHULKOVA, H., HAMPL, A., CHMELIK, J. e DVORAK, P. **Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin.** Cytotherapy, v.11, n.3, p.330-40, 2009.

KUCIA, M., MACHALINSKI, B. e RATAJCZAK, M. Z. **The developmental deposition of epiblast/germ cell-line derived cells in various organs as a hypothetical explanation of stem cell plasticity?** Acta Neurobiol Exp (Wars), v.66, n.4, p.331-41. 2006.

KUMADA, T., HASEGAWA, A., IWASAKI, Y., BABA, H. e IKENAKA, K. **Isolation of cystatin C via functional cloning of astrocyte differentiation factors.** Dev Neurosci, v.26, n.1, p.68-76. 2004.

KUMAR, M., KAUSHALYA, S. K., GRESSENS, P., MAITI, S. e MANI, S. **Optimized derivation and functional characterization of 5-HT neurons from human embryonic stem cells.** Stem Cells Dev, v.18, n.4, p.615-27. 2009.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v.227, n.5259, p.680-5. 1970.

LAMB, T. M., KNECHT, A. K., SMITH, W. C., STACHEL, S. E., ECONOMIDES, A. N., STAHL, N., YANCOPOLOUS, G. D. e HARLAND, R. M. **Neural induction by the secreted polypeptide noggin.** Science, v.262, n.5134, p.713-8. 1993.

LAMBA, D. A., KARL, M. O., WARE, C. B. e REH, T. A. **Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.34, p.12769-74. 2006.

LARDELLI, M., WILLIAMS, R., MITSIADIS, T. e LENDAHL, U. **Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development.** Mech Dev, v.59, n.2, p.177-90. 1996.

LECAILLE, F., KALETA, J. e BROMME, D. **Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design.** Chem Rev, v.102, n.12, p.4459-88. 2002.

LEE, S. H., LUMELSKY, N., STUDER, L., AUERBACH, J. M. e MCKAY, R. D. **Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells.** Nat Biotechnol, v.18, n.6, p.675-9. 2000.

LI, M., PEVNY, L., LOVELL-BADGE, R. e SMITH, A. **Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection.** Curr Biol, v.8, n.17, p.971-4. 1998.

LI, X. J., DU, Z. W., ZARNOWSKA, E. D., PANKRATZ, M., HANSEN, L. O., PEARCE, R. A. e ZHANG, S. C. **Specification of motoneurons from human embryonic stem cells.** Nat Biotechnol, v.23, n.2, p.215-21. 2005.

LIU, S., QU, Y., STEWART, T. J., HOWARD, M. J., CHAKRABORTTY, S., HOLEKAMP, T. F. e MCDONALD, J. W. **Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.11, p.6126-31. 2000.

LYON, A. e HARDING, S. **The potential of cardiac stem cell therapy for heart failure.** Curr Opin Pharmacol, v.7, n.2, p.164-70. 2007.

MARTIN, G. R. **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.78, n.12, p.7634-8. 1981.

MARTIN, M. J., MUOTRI, A., GAGE, F. e VARKI, A. **Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid.** Nat Med, v.11, n.2, p.228-32. 2005.

MAYE, P., BECKER, S., SIEMEN, H., THORNE, J., BYRD, N., CARPENTINO, J. e GRABEL, L. **Hedgehog signaling is required for the differentiation of ES cells into neurectoderm.** Dev Biol, v.265, n.1, p.276-90. 2004.

MENDEZ-OTERO, R., MELLO, L. E. A., VALLE, C. Z. e CARVALHO, A. C. C. **Introducao as Celulas Tronco.** In: M. M. MORALES (Ed.). Terapias Avancadas. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2007. Introducao as Celulas Tronco

MENEZES, J. R. e LUSKIN, M. B. **Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon.** J Neurosci, v.14, n.9, p.5399-416. 1994.

MITSUI, K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., SEGAWA, K., MURAKAMI, M., TAKAHASHI, K., MARUYAMA, M., MAEDA, M. e YAMANAKA, S. **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.** Cell, v.113, n.5, p.631-42. 2003.

MORRISON, S. J., WANDYDZ, A. M., HEMMATI, H. D., WRIGHT, D. E. e WEISSMAN, I. L. **Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors.** Development, v.124, n.10, p.1929-39. 1997.

MULLEN, R. J., BUCK, C. R. e SMITH, A. M. **NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.** Development, v.116, n.1, p.201-11. 1992.

MURRAY, S. S., GRISANTI, M. S., BENTLEY, G. V., KAHN, A. J., URIST, M. R. e MURRAY, E. J. **The calpain-calpastatin system and cellular proliferation and differentiation in rodent osteoblastic cells.** Exp Cell Res, v.233, n.2, p.297-309. 1997.

NAT, R., NILBRATT, M., NARKILAHTI, S., WINBLAD, B., HOVATTA, O. e NORDBERG, A. **Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures.** Glia, v.55, n.4, p.385-99. 2007.

NAVARRO-ALVAREZ, N., SOTO-GUTIERREZ, A., YUASA, T., YAMATSUJI, T., SHIRAKAWA, Y., NAGASAKA, T., SUN, S. D., JAVED, M. S., TANAKA, N. e KOBAYASHI, N. **Long-term culture of Japanese human embryonic stem cells in feeder-free conditions.** Cell Transplant, v.17, n.1-2, p.27-33. 2008.

NISTOR, G. I., TOTOIU, M. O., HAQUE, N., CARPENTER, M. K. e KEIRSTEAD, H. S. **Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation.** *Glia*, v.49, n.3, p.385-96. 2005.

NUSSE, R. **Wnt signaling and stem cell control.** *Cell Res*, v.18, n.5, p.523-7. 2008.

ODORICO, J. S., KAUFMAN, D. S. e THOMSON, J. A. **Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines.** *Stem Cells*, v.19, n.3, p.193-204. 2001.

OKITA, K., NAKAGAWA, M., HYENJONG, H., ICHISAKA, T. e YAMANAKA, S. **Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.** *Science*, v.322, n.5903, p.949-53. 2008.

OKUMURA-NAKANISHI, S., SAITO, M., NIWA, H. e ISHIKAWA, F. **Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells.** *J Biol Chem*, v.280, n.7, p.5307-17. 2005.

OLIVIER, E. N., QIU, C., VELHO, M., HIRSCH, R. E. e BOUHASSIRA, E. E. **Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells.** *Exp Hematol*, v.34, n.12, p.1635-42. 2006.

OSAKADA, F., IKEDA, H., MANDAI, M., WATAYA, T., WATANABE, K., YOSHIMURA, N., AKAIKE, A., SASAI, Y. e TAKAHASHI, M. **Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol*, v.26, n.2, p.215-24. 2008.

PAREDES, M., PLEASURE, S. J. e BARABAN, S. C. **Embryonic and early postnatal abnormalities contributing to the development of hippocampal malformations in a rodent model of dysplasia.** *J Comp Neurol*, v.495, n.1, p.133-48. 2006.

PARK, I. H., ZHAO, R., WEST, J. A., YABUUCHI, A., HUO, H., INCE, T. A., LEROU, P. H., LENSCH, M. W. e DALEY, G. Q. **Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors.** *Nature*, v.451, n.7175, p.141-6. 2008.

PARK, S., LEE, K. S., LEE, Y. J., SHIN, H. A., CHO, H. Y., WANG, K. C., KIM, Y. S., LEE, H. T., CHUNG, K. S., KIM, E. Y. e LIM, J. **Generation of dopaminergic neurons *in vitro* from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors.** *Neurosci Lett*, v.359, n.1-2, p.99-103. 2004.

PERRIER, A. L., TABAR, V., BARBERI, T., RUBIO, M. E., BRUSES, J., TOPF, N., HARRISON, N. L. e STUDER, L. **Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.34, p.12543-8. 2004.

PHILLIPS, B. W., HORNE, R., LAY, T. S., RUST, W. L., TECK, T. T. e CROOK, J. M. **Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers.** J Biotechnol, v.138, n.1-2, p.24-32. 2008.

PROWSE, A. B., MCQUADE, L. R., BRYANT, K. J., MARCAL, H. e GRAY, P. P. **Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media.** J Proteome Res, v.6, n.9, p.3796-807. 2007.

REUBINOFF, B. E., PERA, M. F., FONG, C. Y., TROUNSON, A. e BONGSO, A. **Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*.** Nat Biotechnol, v.18, n.4, p.399-404. 2000.

REYNOLDS, B. A., TETZLAFF, W. e WEISS, S. **A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes.** J Neurosci, v.12, n.11, p.4565-74. 1992.

ROBERTSON, E., BRADLEY, A., KUEHN, M. e EVANS, M. **Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector.** Nature, v.323, n.6087, p.445-8. 1986.

SAIDO, T. C., SHIBATA, M., TAKENAWA, T., MUROFUSHI, H. e SUZUKI, K. **Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides.** J Biol Chem, v.267, n.34, p.24585-90. 1992.

SANO, C., MATSUMOTO, A., SATO, E., FUKUI, E., YOSHIZAWA, M. e MATSUMOTO, H. **Establishment of rat embryonic stem-like cells from the morula using a combination of feeder layers.** Zygote, v.17, n.3, p.229-37. 2009.

SCHMITTGEN, T. D., LEE, E. J., JIANG, J., SARKAR, A., YANG, L., ELTON, T. S. e CHEN, C. **Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA.** Methods, v.44, n.1, p.31-8. 2008.

SCHULDINER, M., EIGES, R., EDEN, A., YANUKA, O., ITSKOVITZ-ELDOR, J., GOLDSTEIN, R. S. e BENVENISTY, N. **Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells.** Brain Res, v.913, n.2, p.201-5. 2001.

SEALE, P. e RUDNICKI, M. A. **A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells.** Dev Biol, v.218, n.2, p.115-24. 2000.

SHI, Y., DESPONTS, C., DO, J. T., HAHM, H. S., SCHOLER, H. R. e DING, S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds.** Cell Stem Cell, v.3, n.5, p.568-74. 2008.

SIRICA, A. E., MATHIS, G. A., SANO, N. e ELMORE, L. W. **Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells.** Pathobiology, v.58, n.1, p.44-64. 1990.

SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M. e ROGERS, D. **Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.** Nature, v.336, n.6200, p.688-90. 1988.

SONNTAG, K. C., PRUSZAK, J., YOSHIZAKI, T., VAN ARENSBERGEN, J., SANCHEZ-PERNAUTE, R. e ISACSON, O. **Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin.** Stem Cells, v.25, n.2, p.411-8. 2007.

STADTFELD, M., NAGAYA, M., UTIKAL, J., WEIR, G. e HOCHEDLINGER, K. **Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.** Science, v.322, n.5903, p.945-9. 2008.

SUKOYAN, M. A., KERKIS, A. Y., MELLO, M. R., KERKIS, I. E., VISINTIN, J. A. e PEREIRA, L. V. **Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases.** Braz J Med Biol Res, v.35, n.5, p.535-42. 2002.

SUTER, D. M., TIREFORT, D., JULIEN, S. e KRAUSE, K. H. **A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells.** Stem Cells, v.27, n.1, p.49-58. 2009.

TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. e YAMANAKA, S. **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** Cell, v.131, n.5, p.861-72. 2007.

TAKAHASHI, K. e YAMANAKA, S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** Cell, v.126, n.4, p.663-76. 2006.

TANG, Y., YASUHARA, T., HARA, K., MATSUKAWA, N., MAKI, M., YU, G., XU, L., HESS, D. C. e BORLONGAN, C. V. **Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke.** Cell Transplant, v.16, n.2, p.159-69. 2007.

TAO, O., SHIMAZAKI, T., OKADA, Y., NAKA, H., KOHDA, K., YUZAKI, M., MIZUSAWA, H. e OKANO, H. **Efficient generation of mature cerebellar Purkinje cells from mouse embryonic stem cells.** J Neurosci Res, 2009.

TAUPIN, P., RAY, J., FISCHER, W. H., SUHR, S. T., HAKANSSON, K., GRUBB, A. e GAGE, F. H. **FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor.** Neuron, v.28, n.2, p.385-97. 2000.

THOMAS, T., SCHREIBER, G. e JAWOROWSKI, A. **Developmental patterns of gene expression of secreted proteins in brain and choroid plexus.** Dev Biol, v.134, n.1, p.38-47. 1989.

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. e JONES, J. M. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** Science, v.282, n.5391, p.1145-7. 1998.

THOMSON, J. A., KALISHMAN, J., GOLOS, T. G., DURNING, M., HARRIS, C. P., BECKER, R. A. e HEARN, J. P. **Isolation of a primate embryonic stem cell line.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.17, p.7844-8. 1995.

THOMSON, J. A., KALISHMAN, J., GOLOS, T. G., DURNING, M., HARRIS, C. P. e HEARN, J. P. **Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts.** Biol Reprod, v.55, n.2, p.254-9. 1996.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. e GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, p.4350-4. 1979.

UNGER, C., FELLIDIN, U., NORDENSKJOLD, A., DILBER, M. S. e HOVATTA, O. **Derivation of human skin fibroblast lines for feeder cells of human embryonic stem cells.** Curr Protoc Stem Cell Biol, p.7. 2008.

UNGER, C., GAO, S., COHEN, M., JACONI, M., BERGSTROM, R., HOLM, F., GALAN, A., SANCHEZ, E., IRION, O., DUBUISSON, J. B., GIRY-LATERRIERE, M., SALMON, P., SIMON, C., HOVATTA, O. e FEKI, A. **Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells.** Hum Reprod, 2009.

VAAGS, A. K., ROSIC-KABLAR, S., GARTLEY, C. J., ZHENG, Y. Z., CHESNEY, A., VILLAGOMEZ, D. A., KRUTH, S. A. e HOUGH, M. R. **Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with *in vitro* and *in vivo* differentiation potential.** Stem Cells, v.27, n.2, p.329-40. 2009.

VAZIN, T., BECKER, K. G., CHEN, J., SPIVAK, C. E., LUPICA, C. R., ZHANG, Y., WORDEN, L. e FREED, W. J. **A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells.** PLoS One, v.4, n.8, p.e6606. 2009.

VILLA-DIAZ, L. G., PACUT, C., SLAWNY, N. A., DING, J., O'SHEA, K. S. e SMITH, G. D. **Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells.** Stem Cells Dev, v.18, n.4, p.641-51. 2009.

WAKAYAMA, S., HIKICHI, T., SUETSUGU, R., SAKAIDE, Y., BUI, H. T., MIZUTANI, E. e WAKAYAMA, T. **Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies.** Stem Cells, v.25, n.4, p.986-93. 2007.

WILLIAMS, R. L., HILTON, D. J., PEASE, S., WILLSON, T. A., STEWART, C. L., GEARING, D. P., WAGNER, E. F., METCALF, D., NICOLA, N. A. e GOUGH, N. M. **Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.** Nature, v.336, n.6200, p.684-7. 1988.

YASUHARA, O., HANAI, K., OHKUBO, I., SASAKI, M., MCGEER, P. L. e KIMURA, H. **Expression of cystatin C in rat, monkey and human brains.** Brain Res, v.628, n.1-2, p.85-92. 1993.

YEOM, Y. I., FUHRMANN, G., OVITT, C. E., BREHM, A., OHBO, K., GROSS, M., HUBNER, K. e SCHOLER, H. R. **Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells.** Development, v.122, n.3, p.881-94. 1996.

YU, J., HU, K., SMUGA-OTTO, K., TIAN, S., STEWART, R., SLUKVIN, II e THOMSON, J. A. **Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences.** Science, v.324, n.5928, p.797-801. 2009.

YU, J., VODYANIK, M. A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J. L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G. A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, I. e THOMSON, J. A. **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells**. Science, v.318, n.5858, p.1917-20. 2007.

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. e FREED, W. J. **Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells**. Stem Cells, v.22, n.6, p.925-40. 2004.

ZHAN, X., HILL, C., BRAYTON, C. F. e SHAMBLOTT, M. J. **Cells derived from human umbilical cord blood support the long-term growth of undifferentiated human embryonic stem cells**. Cloning Stem Cells, v.10, n.4, p.513-22. 2008.

ZHANG, P., CHEBATH, J., LONAI, P. e REVEL, M. **Enhancement of oligodendrocyte differentiation from murine embryonic stem cells by an activator of gp130 signaling**. Stem Cells, v.22, n.3, p.344-54. 2004.

ZHANG, S. C., WERNIG, M., DUNCAN, I. D., BRUSTLE, O. e THOMSON, J. A. **In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells**. Nat Biotechnol, v.19, n.12, p.1129-33. 2001.

ZULEWSKI, H., ABRAHAM, E. J., GERLACH, M. J., DANIEL, P. B., MORITZ, W., MULLER, B., VALLEJO, M., THOMAS, M. K. e HABENER, J. F. **Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes**. Diabetes, v.50, n.3, p.521-33. 2001.

8 – ANEXO

8.1 – Anexo 1

Este trabalho foi realizado durante esta Tese de Doutorado e o artigo aceito para publicação em outubro de 2009 na revista “Arquivos de Neuro-Psiquiatria”.

ISOLATION OF NEUROSPHERE-LIKE BODIES FROM AN ADULT PATIENT WITH REFRACTORY TEMPORAL LOBE EPILEPSY.

Ricardo Luiz Azevedo-Pereira¹, Emiliano Medei¹, Rosália Mendez Otero¹, Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza², Soniza Vieira Alves-Leon²

1. Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro RJ - Brazil.
2. University Hospital Clementino Fraga Filho, Neurology and Neurosurgery Department, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro RJ – Brazil.

Dra Soniza Vieira Alves-Leon- Neurology Department/Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco 255/10º andar/sala 10C2 - Cidade Universitária 21941-913 - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro RJ – Brasil. E-mail: sonizavleon@globo.com
Phone 55 21 25622712.

ISOLAMENTO DE CORPOS NEUROSFERA-LIKE DE PACIENTE ADULTO COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL REFRACTÁRIA

Received 1 June 2009, received in final form 14 October 2009. Accepted 29 October 2009.

Epilepsy affects approximately 0.8% of the world population and is most common among those with chronic neurological diseases¹. Some patients are refractory to antiepileptic drugs and they develop refractory epilepsy². This kind of epilepsy presents a higher frequency of sudden death³; surgical treatment is indicated and has shown significantly higher efficacy compared to antiepileptic drug treatment⁴.

Neurosurgery opens the possibility of isolating neural stem cells (NSCs) *in vivo*. These cells are present in the subventricular zone (SVZ), around the lateral ventricles and in the sub-granular layer in the hippocampus (SGZ), and they give rise to neurons

and glial cells during adulthood⁵⁻⁶. The isolation of these cells could lead to a future source of autologous transplants for neurodegenerative diseases, as well as serve as research materials for basic science studies of NSCs. However, only a few studies describe the isolation of NSCs from human brain *in vivo*⁷⁻⁹, and no such study has been performed in Brazil.

Here, we showed for the first time in Brazil the possibility of isolating neural progenitor cells from a woman with refractory epilepsy during interventional surgery.

CASE

A 50-year-old woman with a 15 year history of epilepsy was reported. The surgery was carried out after the concordance of electrophysiological clinical analysis, MRI and ictal single photon emission computed tomography (SPECT) findings showed an ictal onset zone in the right temporal lobe, atrophy and loss of volume in the right hippocampus (Fig 1A, B) and increased perfusion in the same side (Fig 1C).

The patient was subjected to an anterior temporal lobectomy and amigdalohippocampectomy, and in approaching the temporal horn of the lateral ventricle, subventricular sampling was done for tissue culture. The protocol was approved by the Ethical Committee from the Hospital Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, and the patient gave written informed consent.

The tissue was immediately transferred to DMEM-F12 at 4° C. The pia mater and associated blood vessels were removed, and the tissue was dissociated with papain following the manufacturer's recommended procedures (Worthington Biochemical Corp). After dissociation, the single cells were cultured in neurosphere medium¹. The cells were cultured in 10-cm non-adherent culture plates. The culture was supplemented with 20ng/mL epidermal growth factor (EGF), 10ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) and B27 supplement twice a week. Additional neurosphere medium was administered once every week.

After 14 days *in vitro*, we observed, at least, 26 cellular aggregates similar to neurospheres. These neurosphere-like bodies had different diameters, ranging between 57µm and 290µm (Fig 2A). Individual neurospheres (n=10) were then transferred to glass coverslips previously incubated with 10µg/mL poly-L-lysine followed by 20µg/mL laminin. The growth factors were removed from the culture

medium and the neurosphere-like aggregates adhered to the coverslips and showed different patterns of differentiation in the following days. In one pattern, lamellipodia-like projections were observed soon after plating (Figure 2B, 1 day *in vitro*) and in the following days, on top of these, many slender filopodia-like projections were present (Fig 2C, 30 days *in vitro*). The cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 37° C. The coverslips were incubated with normal goat serum followed by primary and secondary antibodies for immunocytochemistry. The lamellipodia-like processes were positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP), suggesting differentiation into astrocytes and/or radial glial cells from the neurosphere-like bodies. In addition, we showed that on top of these processes, several β -III tubulin positive processes were present, suggesting neuronal differentiation (Fig 2D). A different pattern was observed in other neurospheres, in which only a few projections were present emanating from the neurospheres (Fig 2E, 5 days *in vitro*). One of the neurospheres detached from the substrate, leaving behind 3 attached cells that were used for the recording experiments (Fig 2F, 17 days *in vitro*). After recording, the coverslip with the cells was fixed and immunocytochemistry for GFAP and β -III tubulin was performed. In Figure 2G, it is possible to notice neurites (β -III tubulin positive), some of them closely associated with glial processes (GFAP positive).

To probe the electrical activity of the differentiated cells, depolarizing pulses were applied from -90 to +60 mV in 10 mV steps (holding potential = -70 mV). With this approach, an outward rectifier current was observed typical of glial cells (Figure 2H).

DISCUSSION

Mammalian NSCs are isolated from the SVZ around the lateral ventricle and the SGZ⁵⁻⁶. These cells are self-renewable as cell aggregates called neurospheres, and they can give rise to all the cells of the nervous system. These neural progenitor cells can generate neurons and astrocytes, but they have lower plasticity than neural stem cells¹⁰. Here, we isolated neural progenitor cells which formed neurosphere-like bodies that gave rise to β -III tubulin-positive neurons and GFAP-positive astrocytes. After differentiation, electrical properties were recorded from these cells showing functionality *in vitro*. In our study, the cells did not differentiate into

oligodendrocytes and were not self-renewable (data not shown). Therefore, they are not neural stem cells.

Up to now, few studies have reported the isolation of human neural stem/progenitor cells *in vivo*⁷⁻⁹. Although we did not obtain NSCs, we isolated neural progenitor cells from the SVZ for the first time in Brazil. These cells were isolated during a common and safe surgery on an adult patient with refractory epilepsy, and these results can be reproduced by other groups.

It is important that many studies report methods for the isolation and characterization of these cells in order for these cells to be better understood. Additionally, these cells can be differentiated *in vitro* into all cells of the nervous system, which could be useful in the screening of drugs and, in the future, these cells could be expanded in culture as a source for cellular transplants for neurological diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS - We would like to thank Felipe Marins for technical support and Andrew McUsic for English review.

REFERENCES

1. Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? *Lancet Neurol* 2002;1:173-181
2. Rouvel-Tallec A. New antiepileptic drugs. *Rev Med Interne* 2009;30:335-339.
3. Tomson T, Nashef L, Ryvlin P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *Lancet Neurol* 2008;7:1021-1031.
4. Wiebe S, Warren T, Girvin JP, Eliaszw M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal lobe epilepsy. *N Eng J Med* 2001;342:311-318
5. Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97:703-716.
6. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96:25-34.
7. Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004;427:740-744.
8. Moe MC, Varghese M, Danilov AI, et al. Multipotent progenitor cells from the adult human brain: neurophysiological differentiation to mature neurons. *Brain* 2005;128:2189-2199.
9. Moe MC, Westerlund U, Varghese M, et al. Development of neuronal networks from single stem cells harvested from the adult human brain. *Neurosurgery* 2005;56:1182-1190.
10. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 1999; 156:333-344.

Fig 1: Imaging investigation before surgery. [A]: MRI Flair sequence showing the high signal of the atrophic right side of the hippocampus. [B]: MRI T2 sequence depicting loss of volume of the right hippocampus. [C]: The ictal SPECT shows the increase of perfusion in the right temporal lobe. 209x297mm (300 x 300 DPI)

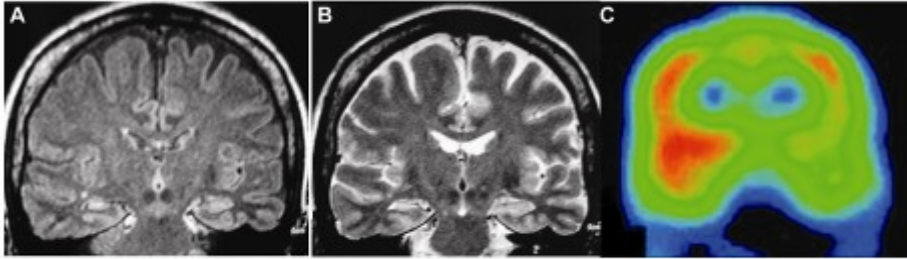
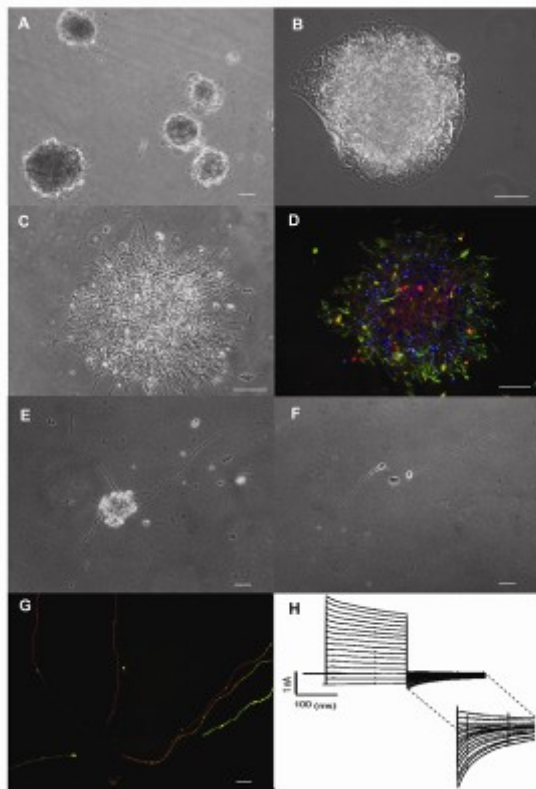


Fig 2. Cells isolated from the SVZ of adult human brain form neurosphere-like bodies and differentiate into neurons and astrocytes. [A]: Phase contrast image of neurosphere-like bodies formed 13 days after plating of the dissociated cells in non-adherent culture conditions and in the presence of growth factors. [B – C]: Phase contrast images of the same neurosphere-like aggregate 1 day [B] and 30 days [C] after plating in adherent culture conditions and in the absence of growth factors. [D]: Photomicrograph of the neurosphere-like aggregate shown in [B-C] immunolabeled for GFAP (green) and β -III tubulin (red). Nuclei are labeled with DAPI (blue). [E]: Phase contrast image of a small neurosphere-like body 1 day after plating in adherent culture conditions. [F]: Phase contrast image of the cells that remained attached to the plate after detachment of the neurosphere-like aggregate and before electrophysiological recordings. [G]: Photomicrograph of cells shown in [F] immunolabeled for GFAP (green) and β -III tubulin (red). [H]: Electrophysiological recording from one of the cells shown in [F] showing an outward rectifier current. Scale bars: 504m.209x297mm (300 x 300 DPI)



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](#)