

Tereza Cristina Barbosa

Estabelecimento de metodologia de diferenciação de células tronco embrionárias de camundongo em células precursoras de oligodendrócitos: uma plataforma para triagem de novas drogas remielinizantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Mestra em Ciências.

São Paulo

2019

Tereza Cristina Barbosa

Estabelecimento de metodologia de diferenciação de células tronco embrionárias de camundongo em células precursoras de oligodendrócitos: uma plataforma para triagem de novas drogas remielinizantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Orientadora: Vanessa Olzon Zambelli

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Barbosa, Tereza Cristina

Estabelecimento de metodologia de diferenciação de células tronco embrionárias de camundongo em células precursoras de oligodendrócitos: uma plataforma para triagem de novas drogas remielinizantes / Tereza Cristina Barbosa; orientadora Vanessa Olzon Zambelli. – São Paulo, 2019.

69f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção e desenvolvimento.

1. Oligodendroglia. 2. Células Precursoras de Oligodendrócitos. 3. Células-Tronco Embrionárias. 4. Diferenciação Celular. 5. Bainha de Mielina. 6. Bioprospecção e desenvolvimento. I. Zambelli, Vanessa Olzon. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Tereza Cristina Barbosa, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação após a data da defesa:

- () Imediato
() 06 meses
(x) 12 meses
() Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 29 de outubro de 2019



.....
Aluna:

De acordo:
Orientadora: **Vanessa Oizon Zambelli**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN**

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DA ALUNA: TEREZA CRISTINA BARBOSA

DATA DO EXAME: 29/10/2019

BANCA EXAMINADORA: Profas. Dras.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Vanessa Olzon Zambelli (Presidente)		(X)	()
Irina Kerkis		(X)	()
Silvy Stuchi Maria-Engler		(X)	()
DECISÃO FINAL: APROVADA (X)		REPROVADA ()	

Comentários da Banca (opcional):

São Paulo, 07 de setembro de 2019
CEUAx N 7109050919

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Vanessa Zambelli

Área: Lab. Especial De Dor E Sinalização

Equipe envolvida: Tereza Cristina Barbosa - **executor** (Instituto Butantan); Vanessa Olzon Zambelli (orientador)

Título do projeto: "Estabelecimento de metodologia de células precursoras de oligodendrócitos: Uma plataforma para triagem de novas drogas remielinizantes."

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 06/09/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Muito obrigada,

Aos meus pais Ana Cristina Barbosa e Renato Taveira Barbosa, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria muito de agradecer:

À Deus por me dar forças na luta para superar meus desafios e fé para ainda continuar sonhando.

À Dra Vanessa Olzon Zambelli, pela orientação, paciência e motivação.

À Dra Gisele Picolo, pela grande oportunidade, a mim concedida, de conduzir este estudo.

À Dra Irina Kerkis, pela importante colaboração, por ter aberto as portas do Laboratório de Genética, para que eu pudesse executar meus experimentos, por acreditar em minha capacidade.

Ao Mestre Eduardo Osório Frare, pela valiosa ajuda, pelos ensinamentos e pelas boas sugestões.

Ao Dr Murilo Sena Amaral, pelo auxílio em experimentos de Biologia Molecular.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório de Genética, pela gentil acolhida e por todo apoio técnico.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS), que souberam compreender e apoiar minha dupla jornada como aluna e Assistente de Pesquisa.

Ao técnico de Citometria Dr. Luiz Roberto Sardinha pelos ensaios de citometria.

Aos técnicos de Microscopia Confocal, Alexander S. de Souza e Marcelo Medina de Souza, por imagens tão preciosas.

À minha família, especialmente aos meus queridos pais Ana Cristina e Renato por compreenderem minha ausência, por apoiarem meus caminhos e sonhos e por todo amor que sempre me deram. Aos meus irmãos Renato e Marcelo por dividirem comigo os cuidados com nossos pais.

Ao suporte financeiro da Fundação Butantan, FAPESP (Processo:- CETICS 2013/07467-1) e CAPES.

Ao programa de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan.

RESUMO

BARBOSA, Tereza Cristina. **Estabelecimento de metodologia de diferenciação de células tronco embrionárias de camundongo em células precursoras de oligodendrócitos**: uma plataforma para triagem de novas drogas remielinizantes 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

A bainha de mielina desempenha um papel crucial nas funções nervosas. No sistema nervoso central, a bainha de mielina é produzida por oligodendrócitos (OLs), os quais são diferenciados a partir de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs). Em várias desordens neurológicas, entre elas, a Esclerose Múltipla, a bainha de mielina é danificada e a remielinização deixa de acontecer. Desse modo, a busca por novos compostos que atuem na diferenciação de OPCs a OLs, é um caminho promissor na terapia de doenças desmielinizantes. Neste estudo, estabelecemos uma metodologia que permitiu gerar OPCs a partir de duas linhagens de células tronco embrionárias de camundongos (mESCs – linhagens USP-1 e HM-1). Inicialmente, as mESCs foram induzidas a diferenciar em precursores neurais e, posteriormente, a OPCs, pela adição de fatores de crescimento como FGFb, EGF e PDGF-AA. A expressão característica e predominante de Olig2, Sox10, PDGFR α e NG2 observada por imunofluorescência e a dupla marcação de PDGFR α e NG2 por citometria de fluxo (com rendimentos de 88,3-87,3%) confirmaram a obtenção de OPCs a partir de mESCs. Estas células podem ser expandidas por 5 passagens adicionais e ainda serem capazes de gerar bilhões de OPC puros. Portanto, o estudo apresenta uma metodologia eficiente e reprodutível que permite a geração de um modelo a ser empregado em triagem de novas drogas ou no estudo da biologia da linhagem de OLs.

Palavras-chave: Oligodendrócitos. Células Precursoras de Oligodendrócitos. Células-Tronco Embrionárias. Diferenciação Celular. Bainha de Mielina.

ABSTRACT

BARBOSA, Tereza Cristina. **Establishment of a mouse embryonic stem cell line differentiation methodology into oligodendrocyte precursor cells**: a platform for remyelinating drug screening. 2019. 69 p. Master's dissertation (Master's degree/ in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

The myelin sheath plays a crucial role in nerve function. In the Central Nervous System, the myelin sheath is produced by oligodendrocytes (OL), which are differentiated from oligodendrocyte precursor cells (OPC). Several neurological disorders, including multiple sclerosis, display damage in the myelin sheath and failure in the remyelination. Therefore, researching for new compounds that act in the OPCs differentiation to OLs is a promising strategy to treat demyelinating diseases. In this study, we established a methodology that allows the generation of OPCs in large quantities from two lineages of mouse embryonic stem cells (mESCs; lineages HM-1 and USP-1). Initially, mESCs were induced to differentiate into neural precursors and, later, to OPCs by adding growth factors such as FGF, EGF and PDGF. The characteristic and predominant expression of Olig2, Sox-10, PDGFR α and NG2 observed by immunofluorescence, and the double labeling of PDGFR α and NG2 by flow cytometry, confirmed the OPCs generation from mESCs. Therefore, this study shows an efficient and reproducible methodology for generating OPCs capable of being used in screening assays or in OLs lineage biology studies.

Keywords: Oligodendrocytes. Oligodendrocytes precursor cells. Embryonic stem cells. Cell differentiation. Myelin sheath.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A2B5** - (gangliosídeo de superfície A2B5; do inglês *ganglioside antigen*)
- ADEM** - (encefalomielite disseminada aguda; do inglês *acute disseminated encephalomyelitis*)
- Ascl1/Mash1** - (do inglês *Achaete-scute homolog 1/mammalian achaete scute homolog-1*)
- BDNF** - (fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *Brain derived neurotrophic factor*)
- BMP** - (proteína morfogenética óssea, do inglês *Bone Morphogenetic Protein*)
- BSA** - (albumina sérica bovina; do inglês *bovine serum albumin*)
- cDNA** - (DNA complementar)
- CNPase** - (2',3' nucleotídeo cíclico 3-fosfodiesterase ; do inglês *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*)
- CSPG** - (proteoglicano de sulfato de condroitina 4, do inglês *chondroitin sulfate proteoglycan 4*)
- DAPI** - (4', 6'-diamino-2-fenil indol)
- DMEM** - (*Dulbecco's Modified Eagle Media*)
- DMSO** - (dimetilsufóxido)
- dNTP** - (desoxinucleotídeos trifosfato; do inglês *deoxynucleotide triphosphate*)
- EAE** - (encefalite autoimune experimental; do inglês *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)
- EBs** - (corpos embrióides; do inglês *embryoid bodies*)
- EBV** - (Vírus Epstein-Barr)
- EDTA** - (ácido etilenodiamino tetra-acético; do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EGF** - (fator de crescimento de epiderme; do inglês *epidermal growth factor*)
- EM** - (esclerose múltipla)
- ESCs** - (células-tronco embrionárias; do inglês *embryonic stem cells*)
- FGF** - (fator de crescimento de fibroblasto; do inglês *fibroblast growth factor*)
- FGFR-1** - (receptor de fator de crescimento de fibroblasto; do inglês *fibroblast growth factor receptor 1*)

GAPDH - (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

IGF-1 - (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, do inglês *Insulin-like growth factor*)

iPSC - (células tronco pluripotentes induzidas, do inglês *induced pluripotent stem cells*)

ITS - (insulina, transferrina, selenito de sódio)

LIF - (fator inibitório de leucemia; do inglês *leukemia inhibitory factor*)

MAG - (glicoproteína associada à mielina; do inglês *Myelin Associated Glycoprotein*)

MBP - (proteína básica da mielina; do inglês *myelin basic protein*)

MCT1 - (transportador de monocarboxilato 1; do inglês *monocarboxylate transporter 1*)

MEF- (fibroblasto embrionário de camundongo; do inglês *mouse embryonic fibroblasts*)

mESCs - (células-tronco embrionárias de camundongo; do inglês *mouse embryonic stem cells*)

MOG - (glicoproteína da mielina de oligodendrócito; do inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*)

Msi1 - (do inglês, *Musashi-1*)

Myt1 - (fator de transcrição de mielina; do inglês *Myelin transcription factor 1*)

NEAA - (aminoácido não essenciais; do inglês *non-essential amino acid*)

NG2 - (antígeno 2 nervo/glial; do inglês *Nerve/glia antigen 2*)

NGF - (Fator de crescimento nervoso; do inglês *Nerve growth factor*)

Nkx2.2 - (do inglês *Homeobox protein Nkx-2.2*)

NNO - (neuromielite óptica; do inglês *neuromyelitis óptica*)

NP - (células-precursoras neurais; do inglês *neural precursor cells*)

NT-3 - (neurotrofina-3; do inglês *Neurotrophin-3*)

O4 - (marcador de oligodendrócito 4; do inglês *Oligodendrocyte Marker O4*)

Oct4 - (fator de transcrição ligante do octamero 4; do inglês *octamer-binding transcription factor 4*)

OL - (Oligodendrócito; do inglês *Oligodendrocyte*)

Olig2 - (fator de transcrição de oligodendrócitos 2; do inglês *Oligodendrocyte transcription factor 2*)

OPC - (célula precursora de oligodendrócitos; do inglês *Oligodendrocyte Precursor Cell*)

Pax6 - (fator de transcrição Pax6: do inglês *paired-box protein 6*)

PBS - (solução tampão fosfato; do inglês *phosphate Buffer Solution*)

PCR - (reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*)

PDGF - (fator de crescimento derivado de plaqueta; do inglês *platelet derived growth factor*)

PDGFR α - receptor alfa de fator de crescimento derivado de plaqueta; do inglês *platelet-derived growth factor receptor α*)

PLP - (proteína proteolipídica; do inglês *Proteolipid Protein*)

PSC - (células tronco pluripotente, do inglês *pluripotent stem cells*)

RT-PCR - (reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa; do inglês *reverse transcriptase – polymerase chain reaction*)

SFB - (soro fetal bovino)

Shh - (do inglês *Sonic Hedgehog*)

SNC - (Sistema nervoso central)

Sox1 - (fator de transcrição Sox1; do inglês *Sex determining region Y-box 1*)

Sox10 - (fator de transcrição Sox10: do inglês *Sex determining region Y-box 10*)

Sox17 - (fator de transcrição Sox17; do inglês *Sex determining region Y-box 17*)

Sox2 - (fator de transcrição Sox2; do inglês *Sex determining region Y-box 2*)

SSEA-1 - (antígeno embrionário estágio específico-1; do inglês *Stage-specific embryonic antigen-1*)

SVZ - (zona subventricular; do inglês *subventricular zone*)

Tcf4 - (fator de transcrição 4; do inglês *Transcription factor 4*)

TGF- α - (fator de crescimento transformante α ; do inglês *transforming growth factor α*)

Wnt - (sítio de integração *Wingless*; do inglês "*Wingless-related integration site*")

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Oligodendrócitos e a Bainha de Mielina	15
1.2 Desordens da mielina:	17
1.2.1 <i>Esclerose múltipla (EM)</i>	18
1.3 Células precursoras de Oligodendrócitos (OPCs) e a remielinização	19
1.4 Origem das Células Precursoras de Oligodendrócitos (OPCs) durante o desenvolvimento	20
1.5 Diferenciação de OPCs a OLs mielinizantes	21
1.6 Oligodendrócitos	23
1.7 Falência na remielinização endógena	24
1.8 Possíveis aplicações terapêuticas de toxinas na remielinização	25
1.9 Diferenciação de células tronco de camundongos (mESCs) em células precursoras de oligodendrócitos	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Manutenção e expansão de fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs)	30
3.2 Inativações mitótica das MEFs e plaqueamento como células alimentadoras	30
3.3 Expansão de células tronco embrionária de camundongo (Mouse Embryonic stem cells-mESCs) em estado indiferenciado	31
3.4 Protocolo de diferenciação de OPCs a partir de mESCs	32
3.5 Formação de Corpos Embrióides (EB)	32
3.6 Indução de linhagem neural	33
3.7 Indução de OPCs	33
3.8 Expansão de OPCs derivado de mESCs	34
3.9 Diferenciação mESC para oligodendrócitos	34
3.10 Imunofluorescência	35
3.11 Análise de células por citometria de fluxo	36
3.12 Extração de RNA e RT-PCR	36

4 RESULTADOS	38
4.1 RT-PCR e Imunofluorescência confirmaram estado indiferenciado de mESC	38
4.2 Avaliação da formação de EBs	42
4.3 O tratamento induziu a diferenciação de células com características neuroepiteliais	43
4.4 Os procedimentos empregados favoreceram a diferenciação de precursores neurais a OPCs	46
4.5 A análise de células por citometria de fluxo com dupla marcação confirmou a diferenciação de OPCs a partir de mESCs	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Os Oligodendrócitos (OLs) são células que formam a bainha de mielina do Sistema Nervoso Central (SNC) e são derivados de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs). Estas células estão envolvidas na fisiopatologia de uma variedade de desordens que resultam em deficiências neurológicas, sofrimento e morte. As terapias existentes para estas doenças, apesar de melhorarem alguns sintomas, falham na promoção de uma remielinização eficiente. A produção de OPCs, a partir de células tronco embrionárias de camundongo (mESCs), oferece uma estratégia útil e relevante para a triagem de novos fármacos com potencial remielinizante.

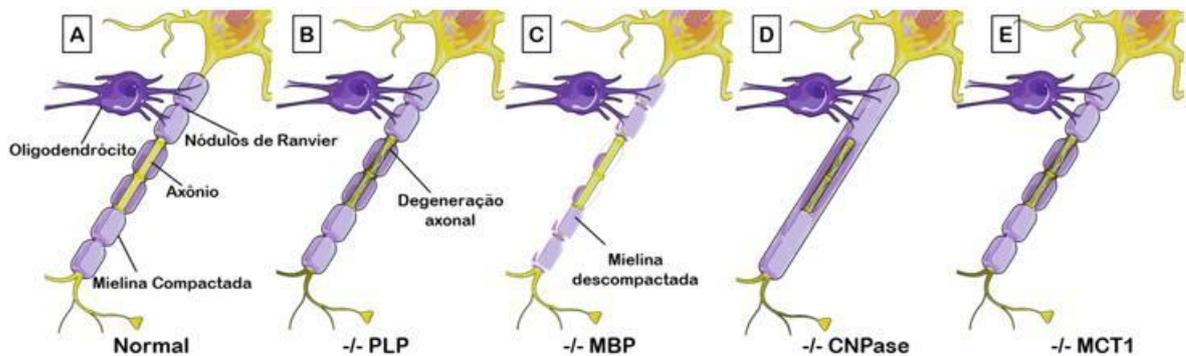
1.1 Oligodendrócitos e a Bainha de Mielina

A bainha de mielina do SNC é uma diferenciação multilamelar da membrana plasmática do OLs que envolve o segmento axonal dos neurônios. A mielinização de vertebrados é um avanço evolutivo essencial para a função cognitiva motora e sensitiva. Uma das principais funções da bainha de mielina é a facilitação da condução nervosa e isolamento elétrico dos axônios (Nave; Trapp, 2008; Simons; Nave, 2015). Ao restringir os potenciais de ação em curtos segmentos axonais não mielinizados (os nódulos de Ranvier), a mielina fornece a base estrutural para ação saltatória e propagação do potencial de ação. Essa estrutura acelera a condução nervosa de 10 a 100 vezes, em comparação com axônios não mielinizados do mesmo diâmetro (Hartline; Colman, 2007).

A mielinização é uma das interações célula-célula mais importantes para o desenvolvimento cerebral, por permitir ampla troca de informações entre OLs e axônios. Por exemplo, a mielina fornece fatores metabólicos aos axônios a fim de suprir sua alta demanda energética (Bercury; Macklin, 2015; Simons; Nave, 2015). Nesse sentido, estudos demonstraram que a mielina é a principal fornecedora metabólica de lactato para axônios, uma vez que, no axônio o acesso a outras fontes de energia é limitado (Lee *et al.*, 2012). Os OLs também podem regular a sobrevivência axonal pela produção de fatores neurotróficos como o fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento do nervo (NGF) e neurotrofina 3 (NT-3). Ainda, a bainha de mielina é crucial para a integridade axonal (Pan; Chan, 2017) e um prejuízo nas proteínas da mielina está relacionado com várias doenças neurológicas. Em 2010, Edgar e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes em proteína proteolipídica (PLP), uma importante proteína da mielina, apresentam transporte axonal funcionalmente prejudicado. A figura 1 exemplifica o suporte metabólico fornecido pela mielina aos neurônios e as consequências da deficiência de algumas proteínas (Philips; Rothstein, 2017).

Figura 1- OLs fornecem suporte metabólico aos neurônios



Fonte: Philips; Rothstein, 2017

Na figura, a mielina está representada em roxo e o axônio em amarelo. (A) representa a mielina normal compactada. (B) Em animais com deleção da proteína PLP, a mielina aparenta normalidade, porém há degeneração axonal. (C) Em animais com deleção da proteína MBP, a mielina apresenta-se descompactada. (D) Em animais com deleção da proteína CNPase, ocorre uma compactação exagerada e não há nódulos de Ranvier, levando à degeneração axonal. (E) Animais com deleção da proteína MCT1 (transportadora de lactato) apresentam degeneração axonal.

A bainha mielina é uma estrutura pouco hidratada, constituída por alto conteúdo de lipídeos e proteínas específicas (revisado por Chrast *et al.*, 2011). O alto conteúdo de lipídeos na membrana é importante para a diferenciação de células gliais, transporte de proteínas da mielina, isolamento eletrostático do axônio subjacente e para a compactação da mesma (Schmitt *et al.*, 2015).

1.2 Desordens da mielina

Os distúrbios da bainha de mielina incluem qualquer condição patológica do sistema nervoso em que a mielina é lesada em termos de composição, forma ou quantidade relativa. Estes distúrbios do SNC formam uma grande e crescente lista de doenças em seres humanos. As modernas técnicas de imagens e o sequenciamento genético têm ampliado o diagnóstico e a compreensão destas desordens (Duncan; Radcliff, 2016), contudo, novos compostos farmacológicos que previnam estes distúrbios são escassos ou inexistentes. Pacientes portadores de doenças desmielizantes podem apresentar sérios comprometimentos ou mesmo serem conduzidos à morte precoce (Duncan; Radcliff, 2016).

O comprometimento da bainha de mielina pode ser inato ou adquirido. Na primeira condição, estes distúrbios se manifestam no início de vida e são geneticamente determinados, como ocorre nas leucodistrofias que incluem a Doença de Pelizaeus-Merzbacher, Doença de Krabbe, Doença de Canavan, Doença de Alexander e adrenoleucodistrofias (Waldman, 2018; Barkovich; Deon, 2016; Mayer *et al.*, 2015; Berger *et al.*, 2014; Clarner *et al.*, 2014;; Messing *et al.*, 2012;).

Já as doenças desmielinizantes adquiridas são caracterizadas pela perda de uma bainha de mielina originalmente saudável. A etiologia da desmielinização adquirida pode ser atribuída a um evento externo, como episódios febris, traumatismo craniano, agentes infecciosos, acidente vascular cerebral ou exposição a produtos químicos tóxicos (Mc Murran *et al.*, 2016). A esclerose múltipla (EM), encefalite aguda disseminada (ADEM) e neuromielite óptica (NNO) são as desordens desmielinizantes, inflamatórias e adquiridas mais comuns do SNC. A ADEM, doença tipicamente monofásica, afeta principalmente crianças, é marcada por encefalite grave, geralmente associada a infecções virais e bacterianas e, raramente, à vacinação (Young *et al.*, 2010; Duncan; Raddiff *et al.*, 2016). A NNO, também conhecida como Doença de Devic, se caracteriza por neurite óptica severa e diferencia-se da EM principalmente pela presença de um anticorpo específico contra canais de aquaporina-4, bem como pela intensa infiltração de macrófagos e perda pronunciada de astrócitos (Lucchinetti *et al.*, 2014; Koudriavtseva *et al.*; 2015).

1.2.1 Esclerose múltipla (EM)

A EM é uma doença inflamatória do SNC e o protótipo de desordem desmielinizante. A doença acarreta deterioração funcional e incapacidade duradoura, especialmente entre adultos jovens de 20 a 40 anos, embora indivíduos de outras idades também possam ser acometidos pela EM. De acordo com o Atlas de EM, 2013, existem no mundo 2,3 milhões de pessoas afetadas pela doença e a EM é, em média, duas vezes mais comum entre mulheres do que entre homens (Comabella; Koury, 2012). A etiologia da EM não está totalmente elucidada. Porém, sabe-se, que o maior risco para EM é determinado por interações complexas entre fatores genéticos e ambientais (Segal *et al.*, 2018). Entre os fatores de maior risco, podemos citar o sexo, a genética, fatores ambientais como a dieta, deficiência de vitamina D, o tabagismo e a obesidade (Waubant *et al.*, 2019).

Uma característica patológica da EM é a presença de áreas endurecidas (cicatrices) nos locais onde a mielina é perdida. Estas cicatrizes aparecem em diferentes momentos e em diferentes áreas do SNC, por isso o termo esclerose múltipla significa 'muitas cicatrizes' (MISF-2016). Características histológicas da EM incluem desmielinização ativa, perda OLs e degeneração neuronal (Yong, 2014).

A EM é considerada uma doença autoimune. As lesões inflamatórias na fase aguda da doença são caracterizadas por um rompimento da barreira hematoencefálica e infiltração linfocitária maciça, principalmente por macrófagos, linfócitos T e linfócitos B (Comabella; Koury, 2012; Hemmer *et al.*, 2015). No SNC, linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados por células como microglia, macrófagos infiltrados e linfócitos B, desencadeando uma resposta imune com liberação de citocinas e quimiocinas, que recrutam mais células inflamatórias e ativam microglia e macrófagos. Níveis elevados de linfócitos Th1 e Th17 e de citocinas tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , e TNF- α desempenham um papel crucial na patogênese da EM. A inflamação local e a desmielinização resultante expõem mais os auto-antígenos e fornece alvos adicionais para linfócitos T (O'Connor *et al.*; 2001; Garg; Smith, 2015). Os linfócitos CD4⁺ mostram especificidade para proteínas da mielina tais como a proteína básica da mielina (MBP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) e proteína proteolipídica (PLP), levando à lesão tecidual e

contribuindo para a formação de múltiplas placas (Malluci *et al.*; 2015; Stern *et al.*; 2014). Linfócitos CD8+ reconhecem antígenos apresentados por OLs, astrócitos e neurônios. O dano neurológico pode resultar no espectro característico de sintomas incluindo: parestesia, dormência, fraqueza muscular, desequilíbrio da marcha, ataxia cerebelar, deficiência visual, tonturas, disfunção urinária, fadiga, depressão e alterações cognitivas (Giovannoni. *et al.*; 2016).

A EM é uma doença desmielinizante crônica, incurável e está associada à diminuição progressiva da remielinização. A falência no processo de regeneração conduz a uma cascata de eventos que levam à degeneração axonal (Pan; Chan, 2017; Dutta; Trapp, 2011). Tratamentos atuais com imunomoduladores, imunossupressores ou anticorpos monoclonais apresentam eficácia limitada na doença. Idealmente, um tratamento para EM deveria inibir a inflamação e reparar a bainha mielina pelo recrutamento de OPCs endógenos residentes ou pela proteção dos OLs (Harlow *et al.*; 2015).

Estudos recentes relatam que em outras doenças neurológicas, historicamente centradas no neurônio, também há anormalidades na bainha de mielina e perda de OL. Estas doenças incluem a doença de Alzheimer (Bartzokis, 2011), doença de Huntington (Huang *et al.*; 2015), fenilcetonúria (MacKay; Laule, 2016), Síndrome de Down (Olmos-Serrano *et al.*; 2016), autismo (Pacey *et al.*; 2013), hipóxia neonatal (Buser *et al.*; 2012), esquizofrenia (Herring; Konradi, 2011) e esclerose lateral amiotrófica (Barton *et al.*; 2019). À medida que a interdependência de OL e neurônios se torna melhor definida, em nível molecular, a contribuição da disfunção dos OL e o potencial de terapias direcionadas aos OL para doenças neurológicas se tornam cada vez mais evidentes (Cole *et al.*, 2017; Tognatta; Miller, 2016)

1.3 Células Precursoras de oligodendrócitos (OPCs) e a remielinização

O SNC adulto conserva a habilidade de regenerar a bainha de mielina que foi perdida por diversos mecanismos patológicos (Franklin; Ffrench-Constant, 2008). Este processo regenerativo (remielinização) pode ser comprovado em modelos animais como o de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e modelos não inflamatórios como os da cuprizona e da lisolecitina (Bove; Green, 2017). A

remielinização acontece devido à presença de OPCs no cérebro e na medula espinal do adulto. Estas OPCs adultas foram caracterizadas pela primeira vez no início dos anos 80 (Ffrench-Constant; Raff, 1986; Raff; Miller, 1983) em nervo óptico de rato. Elas podem gerar OLs maduros em cultura e *in vivo*. As OPCs representam a quarta maior população de células gliais (aproximadamente 6%) no SNC de mamíferos (Dawson *et al.*, 2003). Estas células são definidas como células gliais, não vasculares do parênquima do SNC que expressam o antígeno NG2 (conhecido também como proteoglicano de sulfato de condroitina tipo 4 - CSPG) e o receptor para fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α) (Hill e Nishiyama, 2014; Nishiyama *et al.*, 2009). As OPCs são altamente migratórias, proliferativas, resistentes e fortemente mielinizantes após a sua maturação (Dimou; Gallo, 2015). Estas células estão presentes tanto na substância branca, como na substância cinzenta e no cérebro adulto se concentram, principalmente, na zona subventricular (SVZ) e no parênquima (Aguire *et al.*, 2004).

Embora, as OPCs, tenham como principal função gerar OL, estas células desempenham outras importantes funções, como por exemplo, gerar astrócitos em determinadas regiões do SNC (Pepper *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2008). Ainda, as OPCs recebem estímulos sinápticos glutamatérgicos e gabaérgicos (Lin; Bergles 2004), secretam TGF β 1 e contribuem para a integridade da barreira hematoencefálica (Seo *et al.*, 2014). Adicionalmente, as OPCs modulam a neuroinflamação, atuando como células apresentadoras de antígenos e são alvos citotóxicos na desmielinização inflamatória (Kirky *et al.*, 2019).

1.4 Origem das Células Precursoras de oligodendrócitos (OPCs) durante o desenvolvimento

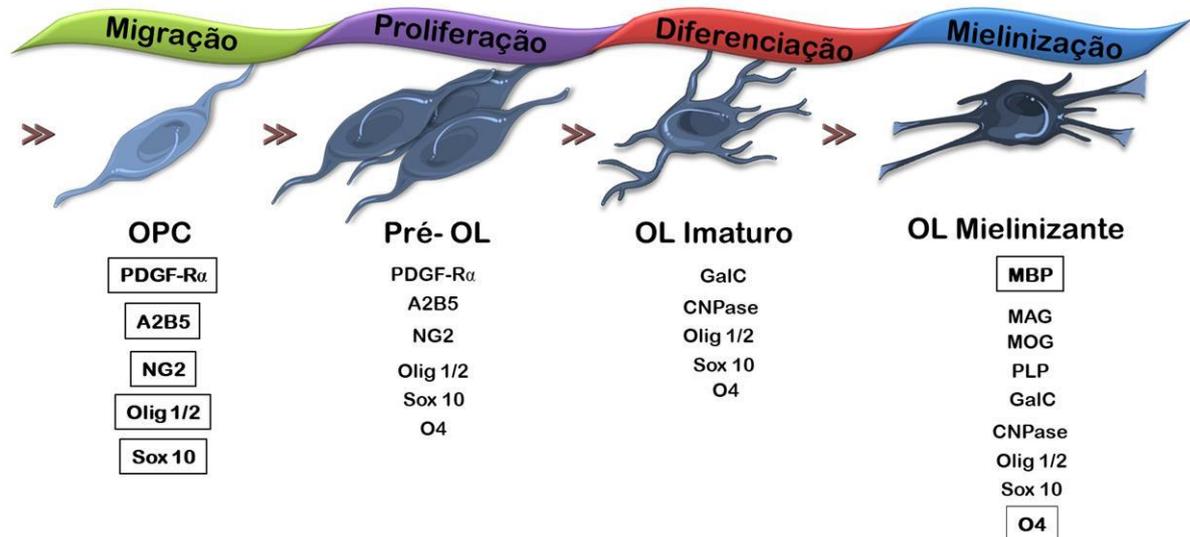
As células neurais como neurônios e macroglia (astrócitos e linhagem de OLs) surgem de células progenitoras neuroepiteliais (NPCs) no tubo neural embrionário (Rowitch; Kriegstein, 2010). Em camundongos, por volta do 9º dia embrionário, as NPCs se transformam em glia radiais, que são as células progenitoras primárias para neurônios e macroglia durante a embriogênese. Depois que as células gliais radiais geram neurônios, uma "troca gliogênica" ocorre e elas começam a se diferenciar em astrócitos ou OPCs (também chamadas de glia NG2).

Durante este tempo, são secretadas numerosas substâncias sinalizadoras, como, por exemplo, Sonic hedgehog (Shh), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), proteínas Wnts, proteínas Notch/Delta, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e citocinas, que atuam em conjunto para controlar o destino celular tanto espacial quanto temporalmente, levando à presença de domínios específicos que geram seletivamente astrócitos ou OPCs (Rowitch; Kriegstein, 2010; Zuchero; Barres, 2013. Zuchero; Barres, 2015). Entre os principais fatores de transcrição envolvidos na diferenciação destaca-se o Olig2, que é expresso tanto por células de linhagem neuronal quanto por OLs. As células que expressam Olig2 na zona ventricular se diferenciam em OPC. As células que se diferenciarão em OLs começam a expressar NG2, a expressão de Olig2 é mantida, enquanto os genes neuronais são reprimidos (Novitsch *et al.*, 2001; Petryniak *et al.*, 2007). Outro fator de transcrição importante é o Sox10, que é expresso em toda a linhagem de OLs. Durante a embriogênese e idade adulta, as OPCs também expressam gangliosídeos A2B5 (Roy *et al.*, 1999).

1.5 Diferenciação de OPCs a oligodendrócitos mielinizantes

A progressão ao longo da linhagem dos OLs ocorre através de um programa altamente organizado de migração, proliferação, diferenciação e mielinização (Figura 2). Em suma, o processo ocorre em quatro estágios, com a geração progressiva de: células precursoras de OLs (OPCs), pré-OLs (ou OPC tardio), OLs imaturos (ou pré-mielinizantes) e OLs maduros (ou mielinizantes). Estes estágios são identificados de acordo com a complexidade morfológica e pela expressão de marcadores específicos (Barateiro; Fernandes, 2014).

Figura 2- A linhagem de oligodendrócitos apresenta quatro estágios de maturação



Fonte: próprio autor

Estes estágios são identificados de acordo com a morfologia, a expressão de marcadores característicos e a capacidade de proliferar e se diferenciar. Os marcadores destacados foram pesquisados neste estudo.

Durante o processo de diferenciação, a OPC origina o pré-OL, que expressa os mesmos marcadores da OPC e também o marcador O4, que persiste até a fase de OL imaturos. Após a perda dos marcadores A2B5 e NG2, os OLs imaturos continuam a expressar O4 e começam a expressar GalC. Neste ponto, os OLs se tornam células pós-mitóticas com longos prolongamentos. Na fase final de desenvolvimento, o OL maduro estende membranas que envolvem e compactam os axônios, formando bainhas. Este evento ocorre de forma ordenada e induz a expressão de proteínas específicas e essenciais para o bom funcionamento da mielina, por exemplo: MBP, PLP, MAG, MOG, e CNPase (Barateiro; Fernandes, 2014).

As OPCs evoluem para OLs mielinizantes, estendendo e ramificando múltiplas estruturas de membrana protrusiva que levam à formação da folha de mielina que envolve o axônio. A diferenciação de OPCs em OLs mielinizantes representa uma das mudanças mais significativas na remodelação celular e é fortemente regulada no espaço e no tempo por uma interação dinâmica entre actina,

actmiosina e tubulina do citoesqueleto e complexos de adesão de membrana celular (Domingues *et al.*, 2018).

1.6 Oligodendrócitos

A primeira caracterização sistemática de OLs foi feita pelo espanhol Pio Del Rio Hortega em 1928. O pesquisador descreveu a morfologia das células denominadas de oligodendroglia (glia com poucos prolongamentos), além de associá-las com a bainha de mielina, fato que apenas foi confirmado com estudos de microscopia eletrônica em 1960 (revisado por Perez-Cerdá, 2015). Os OLs maduros mielinizantes são células pós-mitóticas, fibrosas e frágeis, não proliferativas e não migratórias, o que limita a utilidade destas células como alvo terapêutico (Bradl; Lassmann, 2010). Morfologicamente, os OLs são uma das células mais versáteis e complexas do SNC. Estima-se que, durante o pico da mielinização, os OLs sintetizem cerca de três vezes o seu peso em membrana por dia e, eventualmente, suportem membranas com até 100 vezes o peso do seu corpo celular (McTigue; Tripathi, 2008). Este recurso, em particular, torna os OLs suscetíveis a estresse em vários aspectos: primeiro, para mielinizar adequadamente, os OLs devem ter taxas metabólicas extremamente altas e consumir grandes quantidades de oxigênio e ATP (Bradl; Lassmam, 2010). Esta alta taxa metabólica produz, por sua vez, espécies reativas de oxigênio, as quais devem ser adequadamente metabolizadas (McTigue; Tripathi, 2008). Segundo, a mielinização está sob o controle de muitas enzimas sintéticas de mielina, que requerem ferro como cofator (Connor; Menzies, 1996). Isso pode contribuir para o fato de que OPCs e OLs têm as maiores reservas intracelulares de ferro do cérebro (Thorburne;, Juurlink, 1996), que podem, sob condições desfavoráveis, promover formação de radicais livres e peroxidação lipídica (McTigue; Tripathi, 2008). E, por último, as modificações proteicas e seu enovelamento, que ocorrem no retículo endoplasmático durante a mielinização, também são muito estressantes para o OL, já que pequenas variações na quantidade de uma única proteína podem resultar na retenção, enovelamento incorreto e acúmulo de muitas outras proteínas nesta organela (Bauer *et al.*, 2002).

1.7 Falência na remielinização endógena

Para que a remielinização aconteça, OPCs respondem a sinais quimiotáticos para migrar em direção às áreas lesionadas, proliferar-se, diferenciar-se em OLs maduros e envolver axônios desmielinizados (Miron *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2013). Entretanto, muitas vezes a remielinização falha, particularmente, na progressão de doenças, como se verifica na esclerose múltipla. Análises *post mortem* revelam que 30% das lesões não remielinizam por deficiência na migração de OPCs, e que 70% das falhas se sucedem pela inibição da diferenciação das OPCs em OLs (Lucchinetti *et al.*, 1999).

Diversos fatores intrínsecos e ambientais foram descritos como envolvidos nesta falência da diferenciação de OPCs (Chamberlain *et al.*, 2016). Desde o fator idade, que torna o processo de remielinização menos eficiente (Franklin *et al.*, 2002), até diversas vias moleculares podem inibir a diferenciação de OPCs. As sinalizações por Notch, Wnt, Lingo e Semaforina modulam negativamente sua diferenciação (Gaesser; Fyffe-Maricich, 2016).

Os detritos de mielina gerados pela desmielinização contêm inibidores da diferenciação de OPCs, portanto, precisam ser removidos do espaço extracelular para que não interfiram com o estágio final de diferenciação da remielinização (Lampron *et al.*, 2015). Por esse motivo, componentes envolvidos na imunidade inata tem papel importante no processo regenerativo. Células como microglia e macrófagos favorecem a diferenciação de OPCs por meio da fagocitose de detritos celulares de mielina e pela secreção de fatores neurotróficos e de crescimento (Katsumoto *et al.*, 2014; Miron *et al.*, 2013;). Ainda, citocinas como o TNF α , IL-1 β e IL-11 medeiam a proliferação e diferenciação de OPCs (Miron *et al.*, 2010).

Algumas vias de sinalização modulam positivamente a remielinização e incluem a via de ativação do receptor muscarínico de acetilcolina (mAChR) e a sinalização do receptor de retinoide X (RXR). Os OPCs “ativados”, ou seja, envolvidos no processo de remielinização, podem ser caracterizados por expressão de marcadores de proliferação, bem como altos níveis de FGFR1, Shh, Sox17, Msi1, Myt1, Nkx2.2, Tcf4 e Ascl1/Mash1, juntamente com a expressão nuclear de Olig1/2 (Franklin; Gallo, 2014).

Além de modulação gênica e pós-transcricional, há também mecanismos epigenéticos envolvidos na diferenciação de OPCs, incluindo modulação de acetilação e metilação de histonas, microRNAs e RNAs não codificantes, além de remodelagem de cromatina (Emery; Lu; 2015; Shen *et al.*, 2008). A remielinização também é influenciada por fatores extrínsecos como o rompimento da barreira hematoencefálica e distúrbios da lâmina basal, os quais provocam deposição aberrante de componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, ácido hialurônico e condroitina proteoglicanos sulfato (CSPGs), que podem bloquear a diferenciação de OPCs a OLs (Lau *et al.*, 2013; Lourenço *et al.*, 2016).

As células da linhagem de OLs são capazes de responder a uma lista diversa de estímulos, incluindo neurotransmissores como o ácido γ -aminobutírico e glutamato; trifosfato de adenosina; serotonina; acetilcolina; óxido nítrico; opióides; prostaglandinas; prolactina e canabinóides (Marinelli *et al.*, 2016). Desde modo, múltiplos sinais podem impactar na remielinização, refletindo na sua proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência no processo de transição de OPCs a OLs (Tognatta; Miller, 2016).

1.8 Possíveis aplicações terapêuticas de toxinas na remielinização

Alguns componentes de veneno de animais exibem excelente seletividade e afinidade para vários alvos localizados no SNC humano. Pesquisas recentes indicam que os venenos de animais são ricos em moléculas neuroativas, que podem ser ferramentas farmacológicas para analisar o progresso patológico de distúrbios neurodegenerativos e fornecer bons candidatos ao desenvolvimento de novos medicamentos (Chen *et al.*, 2018, de Souza *et al.*, 2018). Por exemplo, estudos demonstraram que o veneno da abelha *Apis mellifera*, melhora os sintomas clínicos de animais submetidos ao modelo Encefalomielite auto-imune experimental (EAE) (Karimi *et al.*, 2012). Assim como, um peptídeo, denominado *Tnp* derivado de veneno do peixe brasileiro *Thalassophryne nattereri*, que induz efeitos positivos tanto no modelo de EAE, quanto em modelo de desmielinização induzida por cuprizona (Komegae, *et al.*, 2017). Outro exemplo, é o CTK 01512-2, uma versão recombinante do peptídeo Ph α 1 β , derivado do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Este peptídeo inibe o influxo de cálcio mediado pelos canais

VGCC/TRPA-1, resultando em efeitos promissores no modelo da EAE (Silva et al., 2018).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado há anos a crotalfina, um peptídeo sintético, cuja sequência é idêntica a um componente do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Este peptídeo apresenta potente e duradora (3 a 5 dias) atividade antinociceptiva (Machado et al., 2014; Zambelli et al., 2014; Gutierrez et al., 2012; Brigatte et al., 2012; Konno et al., 2008; Gutierrez et al., 2008). O efeito antinociceptivo da crotalfina envolve a ativação periférica de receptores CB2, que, uma vez ativados, liberam peptídeos endógenos, particularmente dinorfina A, que vai agir em receptores opióides do tipo kappa, o que acarreta antinocicepção (Machado et al., 2014). Estudos adicionais demonstram também que a crotalfina ativa a via das quinases ativadas por mitógenos (MAPKS), dentre elas a ERK1/2 e a JNK, em neurônios do DRG (Zambelli et al., 2014). Estudos recentes também demonstraram que a crotalfina ativa parcialmente e desensibiliza canais iônicos do tipo TRPA1, o que contribui para sua ação analgésica (Bressan et al., 2016). Motivados pelas propriedades antinociceptivas em diversos modelos de inflamação e neuropatia e também pelas ações imunomodulatórias da crotalfina, avaliamos seu efeito no modelo da EAE. O peptídeo, além de inibir a nocicepção, reduziu significativamente o déficit motor induzido pela doença, como paralisia da cauda e dos membros. Ensaios de microscopia eletrônica de nervo demonstraram que animais tratados com crotalfina apresentavam desmielinização reduzida na fase tardia da doença (30 dias), com melhora no diâmetro das fibras e presença de axônios regenerados (Giardini et al., comunicação pessoal).

Adicionalmente, Ruiz e colaboradores (comunicação pessoal), investigando a ação da crotalfina em cultura de agregados celulares do cérebro (células tronco neurais, células progenitoras neurais, neurônios maduros e células da glia), observaram, por imunocitoquímica, que após a desmielinização induzida por interferon- γ (IFN- γ) e LPS, verificou que o peptídeo induziu aumento dos níveis das proteínas específicas de OL como, MBP e MOG. Esses resultados sugerem que a crotalfina: (a) mantém a integridade de OL em modelo de desmielinização inflamatória ou (b) promove a remielinização, por favorecer a diferenciação dessas células. Entretanto, como os agregados continham vários tipos celulares, o estudo da crotalfina em linhagem de OLs isoladamente, se faz necessário.

Pelo exposto, o desenvolvimento de uma plataforma capaz de estudar o efeito de venenos ou toxinas animais pode ser de extrema importância na descoberta de novas substâncias capazes de controlar a desmielinização ou promover remielinização.

1.9 Diferenciação de células tronco de camundongos (mESCs) em células precursoras de Oligodendrócitos

Na ausência de remielinização endógena adequada, a busca de novas moléculas que promovam a diferenciação de células precursoras em células maduras mielinizantes é de extrema importância, como também a compreensão dos mecanismos que regulam a migração, proliferação e diferenciação de OPCs (Skaper, 2019; Najm *et al.*, 2015; Deshmukh *et al.*, 2013;.

Modelos celulares para estudar o desenvolvimento de OLs e a mielinização são sistemas úteis para a avaliação da citotoxicidade de vários compostos ou a eficácia de estratégias terapêuticas. Embora limitados pela ausência de circuitos cerebrais, bem como pela falta de circulação sistêmica e sinalização *in vivo*, as culturas primárias são modelos úteis em abordagens iniciais que permitem a avaliação de um grande número de funções e processos celulares. Estes modelos também têm a vantagem crucial de reduzir o número de animais usados em experimentos *in vivo* (Barateiro; Fernandes, 2014).

As células tronco pluripotentes (PSCs), como as células tronco embrionárias (ESCs) e células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) dispõem de potencial para se diferenciar em diversos tipos celulares e, com elas, pode-se obter um número ilimitado de células diferenciadas, úteis para estudos terapêuticos ou mesmo para o transplante de células exógenas (Goldman *et al.*, 2015; Yamashita *et al.*, 2017). Já foram descritas várias estratégias para diferenciar PSCs em OPCs (Lager *et al.*, 2018; Douvaras *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2009; Brustle *et al.*, 1999) porém com diferentes protocolos, alguns em condições de cultivo pouco definidas e pouco reprodutíveis, outros com grande complexidade técnica ou, ainda, que geram uma população de células diferenciadas de baixa pureza.

Assim, o desafio deste estudo foi obter OPCs derivadas de mESCs com metodologia simples, com alto grau de pureza e em quantidade suficiente para o

estudo de novas drogas remielinizantes e para isto, nos baseamos em métodos já bem descritos (Tokumuto *et al.*, 2010; Bian *et al.*, 2016).

2 OBJETIVOS

Este estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

- Estabelecer uma linhagem de OPCs com potencial para a criação de uma plataforma para testar novos compostos com potencial remielinizante.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de diferenciação de mESC em OLs;
- Caracterizar as células obtidas conforme o padrão de expressão de marcadores;
- Verificar a validade e a robustez do protocolo de diferenciação em duas linhagens de mESCs (HM-1 e USP-1).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todo cultivo de células foi feito a 37°C, em 5% de CO₂ e com ambiente úmido.

3.1 Manutenção e expansão de fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs-Mouse Embryonic Fibroblasts)

As MEFs, utilizadas, neste estudo, foram cedidas por Dra Irina Kerkis, do laboratório de Genética. Para o uso, as células foram descongeladas em banho-maria e imediatamente transferidas para um tubo cônico com 5 mL de meio MEF pré-aquecido. As células foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensão em meio MEF composto de DMEM/F12, 10% soro fetal bovino (SFB); 100U/mL penicilina, 100U/mL estreptomicina e 2mM de L-glutamina (todos os produtos da Gibco). O cultivo de MEFs foi mantido até 85% de confluência, quando as células foram, então, dissociadas por ação enzimática com solução de tripsina, 0.38 g/L /EDTA (0,25% Trypsin-EDTA, Gibco) por 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi neutralizada com meio MEF e a suspensão transferida para um tubo cônico e centrifugada a 300 g por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio MEF, contadas em Câmara de Neubauer e foram semeadas na concentração de $1,4 \times 10^4$ células/cm². Diversas passagens (máximo 10 passagens) foram feitas para que houvesse células suficientes para utilização como células alimentadoras ou para o congelamento. Para congelamento das MEFs, o meio foi removido, as células dissociadas, contadas, e a suspensão celular diluída em volume adequado para preparar criotubos com aproximadamente 1×10^6 células em meio MEF com 10% de DMSO (LGC). Os criotubos foram mantidos em freezer -80°C durante a noite e posteriormente foram transferidos para nitrogênio líquido.

3.2 Inativações mitótica das MEFs e plaqueamento como células alimentadoras

As MEFs foram inativadas mitoticamente com o tratamento com mitomicina C (Sigma-Aldrich). As MEFs foram semeadas em placas de 100 mm na concentração inicial de $1,1 \times 10^6$ células. Após as células atingirem confluência em placa, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS, por três vezes, para remover o

SFB e antibióticos e, em seguida, foi adicionado meio DMEM suplementado com solução diluída de mitomicina C em volume adequado para uma concentração final de 10 µg/mL. As placas de MEFs com mitomicina C foram incubadas por 2h a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por três vezes, para retirada completa da mitomicina C e foi adicionado o meio MEF.

3.3 Expansão de mESCs em estado indiferenciado

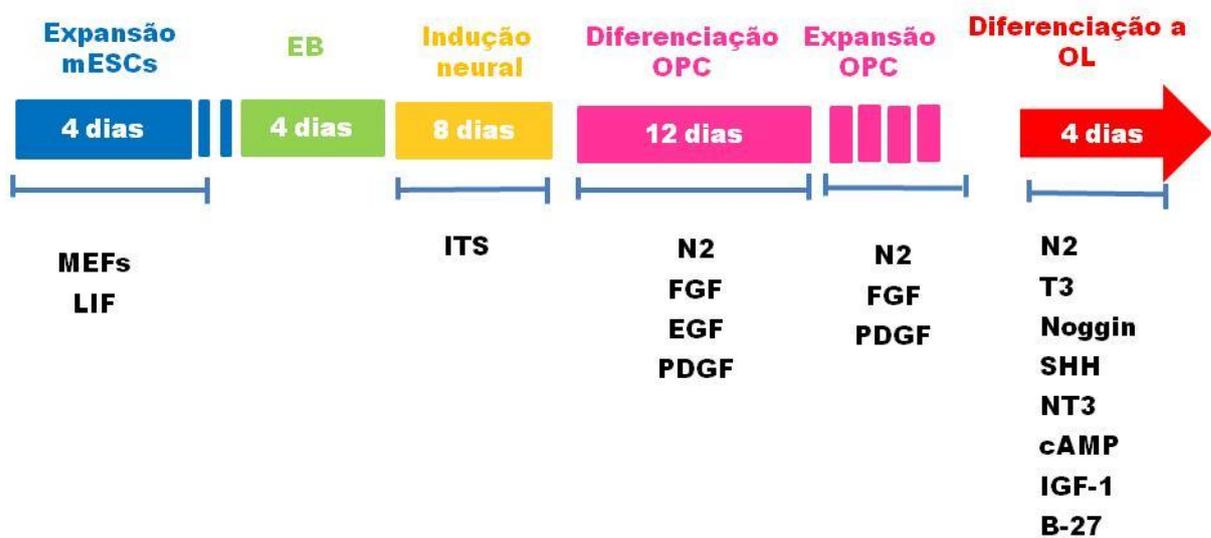
Para estabelecer o protocolo de diferenciação deste estudo, foram utilizadas duas diferentes linhagens de mESCs, ambas extraídas de camundongos machos, a linhagem HM-1-derivadas de camundongos 129/ola (Magin *et al.*, 1992) e a linhagem USP-1 derivadas de camundongos 129/sv (Sukoyan *et al.*, 2002), ambas doadas pela Dra. Irina Kerkis, do Laboratório de Genética, Instituto Butantan. Para o cultivo das mESCs, utilizou-se o meio ESC que consiste em KnockOut DMEM (Gibco), acrescido de 10% SFB, 100U/mL penicilina, 100U/mL estreptomicina, 1% de L-glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA), 0,1mM de 2-mercaptoetanol e 1000U/mL de Esgro-LIF (Millipore,).

Uma suspensão das mESCs ($1,5 \times 10^4$ células/cm²) em meio ESC, foi semeada sobre as MEFs e incubada a 37°C, 5% de CO₂ em estufa umidificada. Foram realizadas trocas diárias de meio. As mESCs em proliferação formam colônias que aumentam de tamanho com o tempo. O cultivo foi mantido até a formação de colônias individuais (3-4 dias). Quando as colônias de células quase se tocavam, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS, as células dissociadas com solução de tripsina/EDTA, por 5 min, a 37°C, a tripsina neutralizada com meio ESC, e a suspensão transferida para um tubo cônico, centrifugada a 300 g por 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso, as células foram contadas e congeladas ou transferidas para outra placa e semeadas sobre as MEFs. Vários cultivos de mESCs foram realizados para se obter um banco de 4×10^7 células (cerca de 40 criotubos).

3.4 Protocolo de diferenciação de OPCs a partir de mESCs

O protocolo executado para diferenciar OPCs a partir de mESCs foi baseado em outros trabalhos como o de Tokumoto e colaboradores (2010) e Bian e colaboradores (2016), com algumas modificações (Figura 3).

Figura 3- Esquema de diferenciação de mESC a OL



Fonte: próprio autor

3.5 Formação de corpos embrioides (EBs)

Para a formação de EB, optamos pelo método de cultura em suspensão estática. As mESCs expandidas foram cultivadas sobre as MEFs como descrito para expansão. Após dissociação com TrypLE (Gibco), a enzima foi neutralizada com meio ESC, as células transferidas para tubo cônico, centrifugadas, ressuspensas em meio ESC e incubadas a 37°C, por aproximadamente 20 minutos, para se desagregarem das MEFs, o meio foi removido e as células contadas. Aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células/cm² foram transferidas para uma placa não aderente tratada com agarose (Invitrogen) a 1%, em meio EB (meio ESC sem LIF). As células foram incubadas por 4 dias, a 37°C, em meio umidificado contendo 5% de CO₂ e o meio EB foi trocado no dia 2, com cuidado, para não dissociar os EBs. Após

4 dias de cultivo, os EBs foram, gentilmente, transferidos para tubo cônico, metade do meio foi removido e foi adicionado metade do volume de meio EB novo. O meio com os EBs foi transferido para uma nova placa e as células cultivadas por 24h para permitir a aderência.

3.6 Indução de linhagem neural

Depois que os EBs aderiram à placa, o meio foi substituído por meio ITS/fibronectina e os EBs cultivado por 6-8 dias, a 37°C, em ar umidificado com 5% de CO₂. O meio ITS/ fibronectina foi trocado a cada 2 dias. Durante este período, uma monocamada de células cresceu a partir dos EBs aderidos.

O meio ITS/fibronectina consiste de DMEM/F12 suplementado com 1,55 mg/mL de glicose (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina, 2,4 mg/mL de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 1X de suplemento ITS (R&D), 5µg/mL de fibronectina (R&D) e 100 U/mL penicilina 100 U/mL estreptomicina. O suplemento ITS contém insulina bovina, transferrina e selenito de sódio.

3.7 Indução de OPCs

Após o final da indução neural, o meio ITS/fibronectina foi removido da cultura celular e as células aderidas lavadas duas vezes com PBS estéril. As células foram dissociadas com TrypLE e foi adicionado meio EB para neutralizar a enzima. As células foram transferidas para um tubo cônico que permaneceu na vertical por aproximadamente 5 minutos para que os EB se acomodassem no fundo do tubo. As células suspensas foram transferidas para novo tubo e centrifugadas por 5 minutos a 220 g. As células foram ressuspensas em meio N-2 MAX/FGF, contadas, semeadas na densidade de 1×10^5 células/poço em 500 µL de meio N-2 MAX/FGF em placas de 24 poços revestidas com 15 µg/mL de poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich-Aldrich) e 10µl/mL de laminina (Life Technologies). O meio N-2 MAX/FGF foi trocado diariamente por 4 dias. Após 4 dias, o meio foi substituído por N-2 MAX/FGF/EGF com trocas diárias por 4 dias, seguido de meio N-2 MAX/FGF/ PDGF-AA por 4 dias adicionais com reposição diária do meio.

O Meio N-2 Max é composto por DMEM/F12 suplementado com 1,55 mg/mL de glicose, 2 mM de L-glutamina, 1,69 mg/mL de NaHCO₃, 1x suplemento N-2, composto por insulina e transferrina humanas, putrescina, selenito e progesterona (R&D) e 100 u/mL de penicilina/estreptomicina. O estoque FGFb (Peprotech) foi dissolvido em 0,1% de BSA em PBS e foi utilizado na concentração de 20 ng/mL para o meio de uso. O EGF estoque foi dissolvido em 0,1 % BSA em ácido acético 10 mM e adicionado na concentração de 20 ng/mL no meio de uso. O estoque PDGF-AA (Peprotech) foi dissolvido em 0,1% de BSA em PBS estéril e utilizado no meio de uso na concentração de 20 ng/mL.

Para o revestimento da placa com poli-L-ornitina/laminina, uma solução de 15 µg/mL de poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich) em PBS foi adicionada à placa que foi incubada por 15 horas a 37°C. Após esse período, os poços foram lavados 3x com PBS e a placa novamente incubada por uma noite a 37°C. No terceiro dia, após a lavagem da placa com PBS, foi adicionada uma solução de 10 µg/mL de laminina em PBS e a placa incubada a 37°C, por 3 a 30 h antes de ser utilizada.

Para realização de ensaios de imunofluorescência, lamínulas foram colocadas nos poços anteriormente ao revestimento de poli-L-ornitina/laminina,

3.8 Expansão de OPCs derivado de mESCs

As OPCs foram mantidas e expandidas em Meio N2 Max suplementado com 20 ng/mL de FGFb e 20 ng/mL de PDGF-AA e este meio foi trocado em dias alternados. A partir da passagem 1, as OPCs foram semeados na concentração de $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ em garrafas revestidas com 5% de MATRIGEL (Corning) e cultivados até atingirem 80 a 90% de confluência. Para o congelamento, as OPCs foram mantidas em meio DMEM acrescido de 10% de SFB e 10% de DMSO em nitrogênio líquido.

3.9 Diferenciação mESC para OLs

As OPCs derivadas de mESC foram diferenciadas em OLs em placas revestidas com poli-L-ornitina e laminina na proporção de $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ em meio OL. O meio OL contém DMEM suplementado com B27 1X (Gibco); N2 1X (R&D); 100ng/mL de Noggin (R&D); 10µM de sal dibutilil AMP cíclico (Sigma-Aldrich);

100ng/mL de IGF-1(R&D); 10ng de NT3 (R&D Systems); 200 ng de Shh (R&D); e 40ng/mL de T3 (Sigma-Aldrich). O cultivo foi mantido por 3 a 4 dias.

3.10 Imunofluorescência

No final de cada etapa do processo de diferenciação, algumas células foram destinadas à imunofluorescência com marcadores específicos.

Para tanto, as células foram fixadas com 4% para formaldeído (Sigma-Aldrich) por 20 min, à temperatura ambiente e lavadas 2 vezes com PBS. Para permeabilização (quando necessária), as células foram tratadas com Triton X-100 a 0,2% (Sigma-Aldrich) em PBS, por 5 min, à temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS. O bloqueio foi feito com BSA (Sigma-Aldrich) 5% em PBS, por 30 min. As células foram incubadas por uma noite a 4°C, com os anticorpos primários diluídos em BSA a 1%. Os anticorpos primários utilizados para as mESCs, suas diluições e número de catálogo foram, respectivamente: **anti-Nanog (1/100 Abcam ab80892)**; **anti-Oct4 (1/100 Abcam ab181557)**; **anti-Sox2 (1/100 Abcam ab137385)**, **anti-SSEA-1 (1/100 Santa Cruz sc21702)**. Para precursores neurais foram: **anti-Pax6 (1/50 Abcam ab5750)**; **anti-Nestin (1/100 sc23927)**, **anti-Sox1(1/100 Abcam 109290)**. Para OPC foram: **anti-Sox10 (1/250 Abcam ab155279)**; **anti-Olig2 (1/500 Abcam ab9610)**; **anti-PDGFR α (1/100 Abcam ab5460)**; **anti-NG2 (1/200-Abcam ab5320)** e **anti-A2B5 (1/200-Millipore MAB312R)**. Após incubação, a suspensão com o anticorpo foi removida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e às células foi adicionado anticorpo secundário marcado com fluoróforo e diluído 1/500 em BSA 1%. Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes-Thermo Fisher, A11034), Alexa Fluor 633 anti-rat (A 21094) e Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (A11001). As células foram incubadas à temperatura ambiente, por 2 h, sem exposição à luz. Para marcação nuclear, as células foram incubadas com 1 μ g/mL de DAPI (Sigma-Aldrich) e a placa incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Foram realizados controles negativos para os anticorpos secundários com a adição de DAPI. As imagens foram capturadas com o microscópio confocal Leica TCS SP 8 e analisadas com o Software Leica LAS no Laboratório de Biologia Celular por Alexsander S. Souza.

3.11 Análise de células por citometria de fluxo

As OPCs foram dissociadas com TrypLE Select (Gibco), neutralizadas, centrifugadas e o sobrenadante removido. A suspensão celular foi bloqueada com soro normal de cabra (Invitrogen) 5% diluído em DMEM/F12, por 30 min, no gelo. Após lavar com 1 mL de DMEM/ F12, as células foram centrifugadas a 200 g por 5 min, os anticorpos primários foram adicionados (**anti-CD140a-APC/PDGFR, diluído 1/80, eBioscience/Thermo Fisher e o anticorpo não conjugado anti-NG2-AF488, 1/100, Millipore**) e incubadas por 30 min, no gelo, Após as células serem lavadas com DMEM/F12, a suspensão celular foi incubada com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1/400), por 20 min. Foram incluídos controles para cada anticorpo isoladamente. Foram utilizadas 3 a 5 x 10⁵ células para cada tubo controle e 2 x 10⁶ células para o tubo de dupla marcação. As células foram separadas em citômetro de fluxo FACSAria (BD Becton Dickinson) e analisadas com o programa BD FACS Diva 8.0.1.

3.12 Extração de RNA e RT-PCR

Para separar mESCs das MEFs que estavam em co-cultura, as células foram dissociadas com tripsina, a enzima neutralizada e as células transferidas para um frasco de cultivo. A suspensão celular foi incubada, por 30 min a 37°C, em ambiente umidificado contendo 5% de CO₂. Após esse período, foi coletado o meio contendo as mESCs enquanto as MEFs ficaram aderidas ao frasco de cultivo. A suspensão celular foi centrifugada a 300 g por 5 minutos, as células contadas, lavadas com PBS e o sedimento estocado em RNAlater Solution (Thermo Fisher) a -80°C.

Para extração do RNA, foi utilizado o kit “RNeasy Mini Kit” (QIAGEN) e o protocolo realizado conforme as recomendações do fabricante. Para quantificar e analisar o RNA, foram utilizados os equipamentos Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific) e Bioanalyzer System (Agilent). Foram utilizados 1 µg de RNA de cada amostra para a transcrição reversa com o kit ThermoScript™ RT-PCR System (ThermoFischer) seguindo o protocolo do fabricante. Para o RT-PCR, foram utilizados os primers da **Tabela 1** e Taq DNA Polymerase (GeneDirex,). O programa para o PCR foi realizado com desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de

desnaturação por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 min seguido por extensão final a 72°C, por 7 min, em termociclador Veriti-Applied Biosystems/Thermo Fisher. O produto do RT-PCR foi analisado em gel de agarose 1,7% corado com Nancy 520 (Sigma-Aldrich) usando padrão de peso molecular GeneRuler SM241 (Thermo Fisher) e fotografado utilizando fotodocumentador (Alliance 2.7-UNIVET)

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-PCR em mESCs

Gene	Senso	Antisenso	Tamanho (pb)
Nanog	ACCTGAGCTATAAGCAGGTTAAGAC	GTGCTGAGCCCTTCTGAATCAGAC	116
Sox2	ACCAGCTCGCAGACCTACAT	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTA	153
Oct4	CCAATCAGCTTGGGCTAGAG	CTGGGAAAGGTGTCCCTGTA	128
Gapdh	CCCCAACACTGAGCATCTCC	ATTATGGGGGTCTGGGATGG	50

Fonte: próprio autor

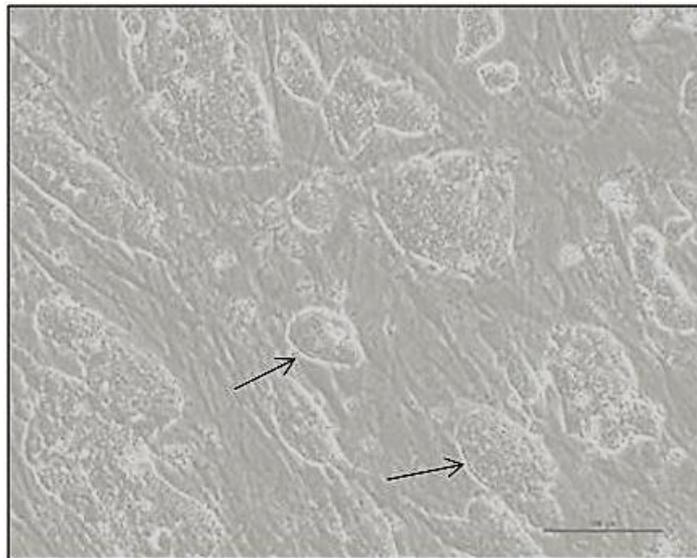
4 RESULTADOS

Apresentamos nossos resultados:

4.1 RT-PCR e Imunofluorescência confirmaram estado indiferenciado de mESC

As mESCs foram cultivadas em co-cultura com células alimentadoras, fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs), gentilmente cedidos pela Dra. Irina Kerkis. As MEFs foram utilizadas por 10 passagens e mantiveram suas características originais de cultivo.

Figura 4 - Imagem representativa de contraste de fase para co-cultura de MEFs e ESCs em placas.

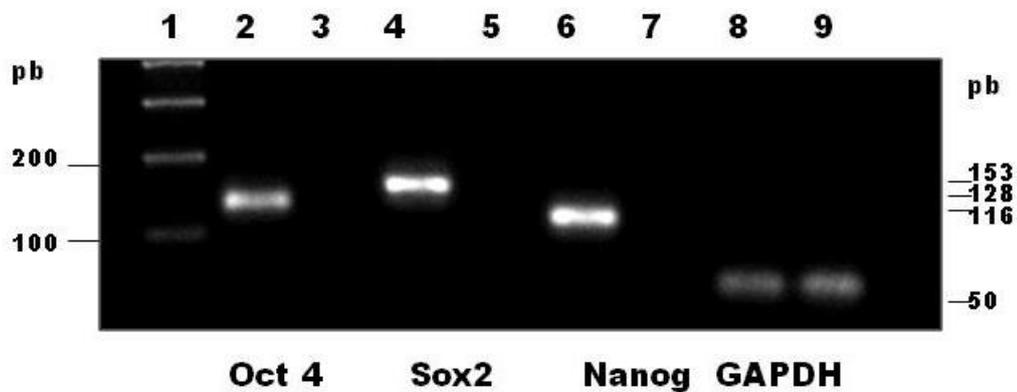


Fonte: próprio autor
Algumas colônias de mESCs estão indicadas por setas. Aumento 100 x.

Uma característica marcante de ESCs em cultura é sua habilidade de se dividir indefinidamente se forem mantidas em condições apropriadas (Figura 4). Para garantirmos que, durante a expansão das mESCs por diversas passagens, as células que utilizamos mantiveram-se em estado indiferenciado, realizamos análises

morfológicas e análises de marcadores de pluripotência por imunofluorescência e RT-PCR. Foram pesquisados os fatores de transcrição Nanog, Sox2 e Oct4 associados com a promoção da proliferação e inibição da diferenciação: e o carboidrato de superfície SSEA-1

Figura 5 - Análise de RT-PCR para marcadores de pluripotência

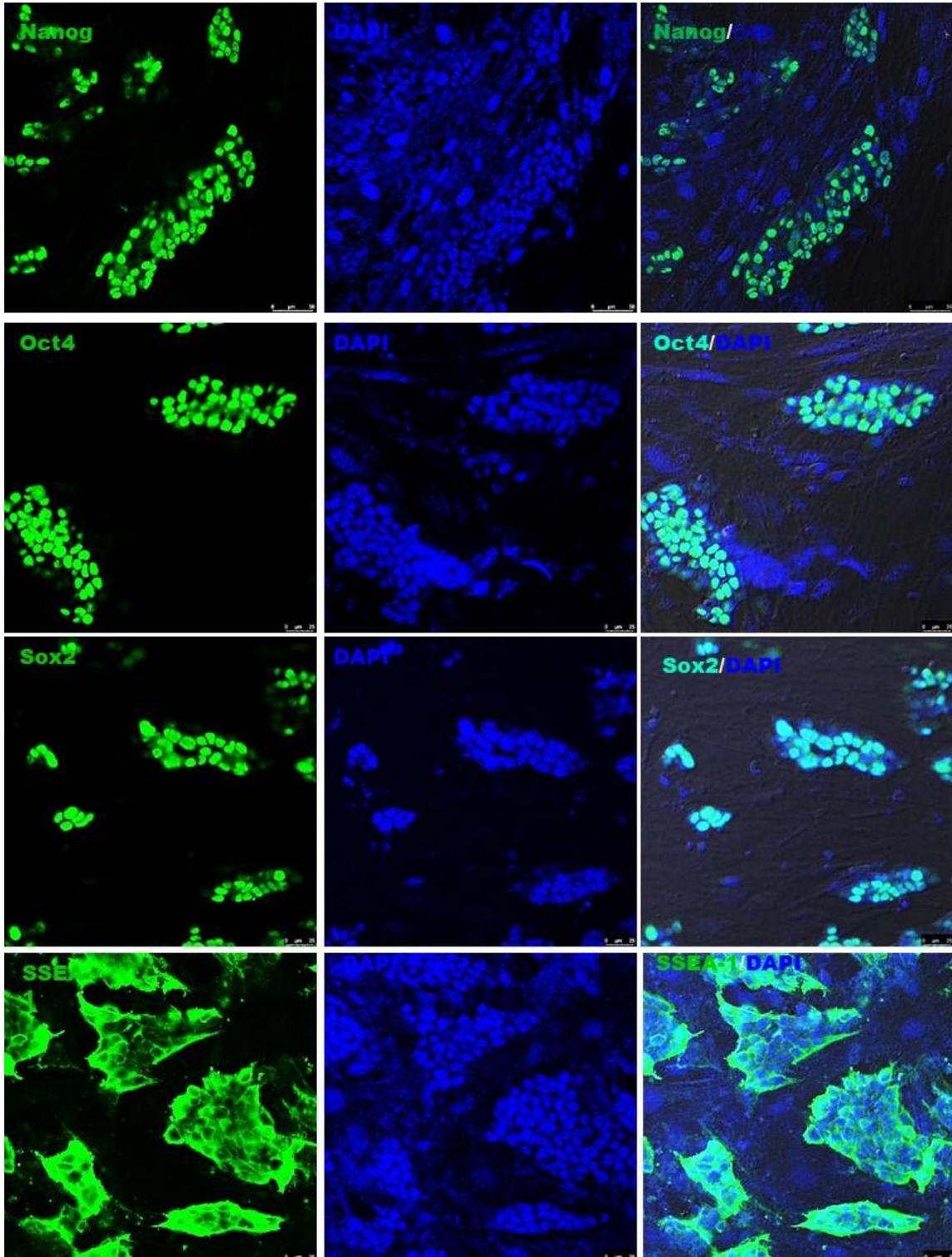


Fonte: próprio autor

Nas canaletas 2,4, 6 e 8 estão mostradas amplificações dos cDNAs de mESC indicados abaixo. Nas canaletas 3, 5, 7 e 9 estão indicadas amplificações de cDNAs de MEFs. A primeira canaleta apresenta o marcador de peso molecular.

Os resultados apresentados na figura 5 demonstram que as mESCs foram positivas para marcadores de pluripotência: Oct4; Nanog e Sox2. Este experimento foi realizado para as duas linhagens de mESCs com o mesmo resultado. Os resultados obtidos por RT-PCR foram confirmados por imunofluorescência para os mesmos marcadores e também para o carboidrato de membrana SSEA-1, confirmando a pluripotência (Figuras 6 e 7)

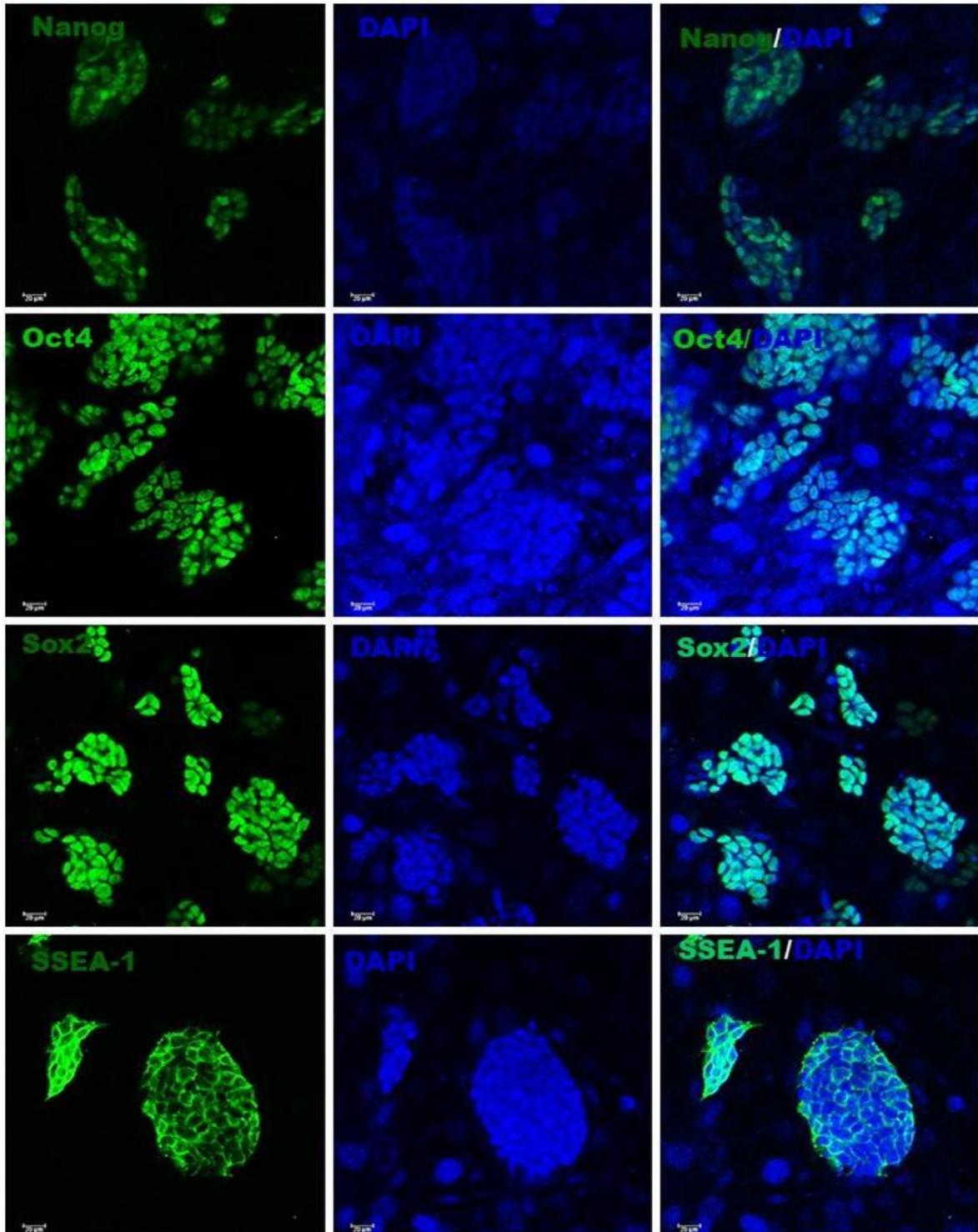
Figura 6 - Análise de imunofluorescência de MEF-mESCs (linhagem USP-1)



Fonte: próprio autor

As imagens demonstram a positividade para marcadores Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-1, sendo os primeiros três nucleares e a SSEA, superficial. Somente as colônias de mESCs foram marcadas, sem reconhecimento das MEFs sobre as quais cresceram. Todas as imagens têm escala de 25µm.

Figura 7 - Análise de imunofluorescência de MEF-mESCs (linhagem HM-1)



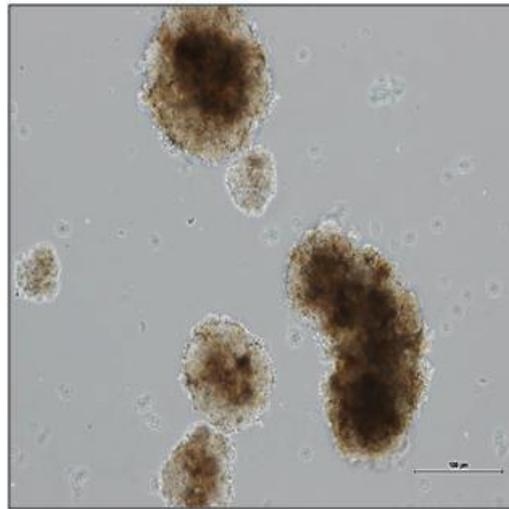
Fonte: próprio autor:

As imagens demonstram a positividade para marcadores Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-1, sendo os primeiros três nucleares e a SSEA, superficial. Somente as colônias de mESCs foram marcadas, sem reconhecimento das MEFs sobre as quais cresceram. Todas as imagens têm escala de 20µm

4.2 Avaliação da formação de EBs

O início da diferenciação de mESCs ocorreu com a formação de agregados celulares não aderentes denominados EBs. O desenvolvimento de EBs foi realizado em suspensão estática, com o mesmo meio utilizado para as mESCs, porém sem o inibidor LIF, que mantinha as mESCs em estado indiferenciado durante a expansão. Para fornecer condições não aderentes de baixo custo, optamos por utilizar placas com revestimento de agarose 1%. Os EBs apresentam células diferenciadas representativas dos três folhetos germinativos (ectoderme, mesoderme e endoderme).

Figura 8 - Imagem de microscopia óptica de corpos embrioides derivados de mESCs



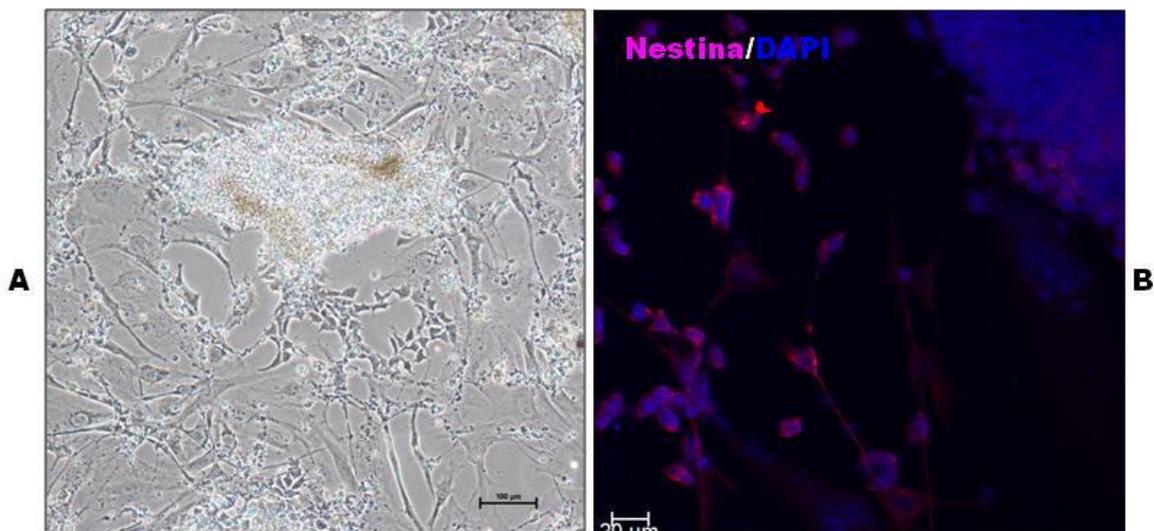
Fonte: próprio autor:

Agregados celulares após 4 dias de cultivo em condições de diferenciação. A barra de escala corresponde a 100 μ m.

4.3 O tratamento com meio ITS induziu a diferenciação de células com características neuroepiteliais

Após a formação de EBs, para que houvesse o direcionamento neural pretendido, os EBs foram transferidos para uma placa aderente com meio ITS. Nestas condições, os EBs liberaram células que formaram uma monocamada de células com características neuroepiteliais (Figura 9A). Pode-se notar, também, que as células liberadas do EB já expressavam nestina, um filamento intermediário típico de precursores neurais (Figura 9B).

Figura 9 – Imagens representativas de células com características de precursores neurais

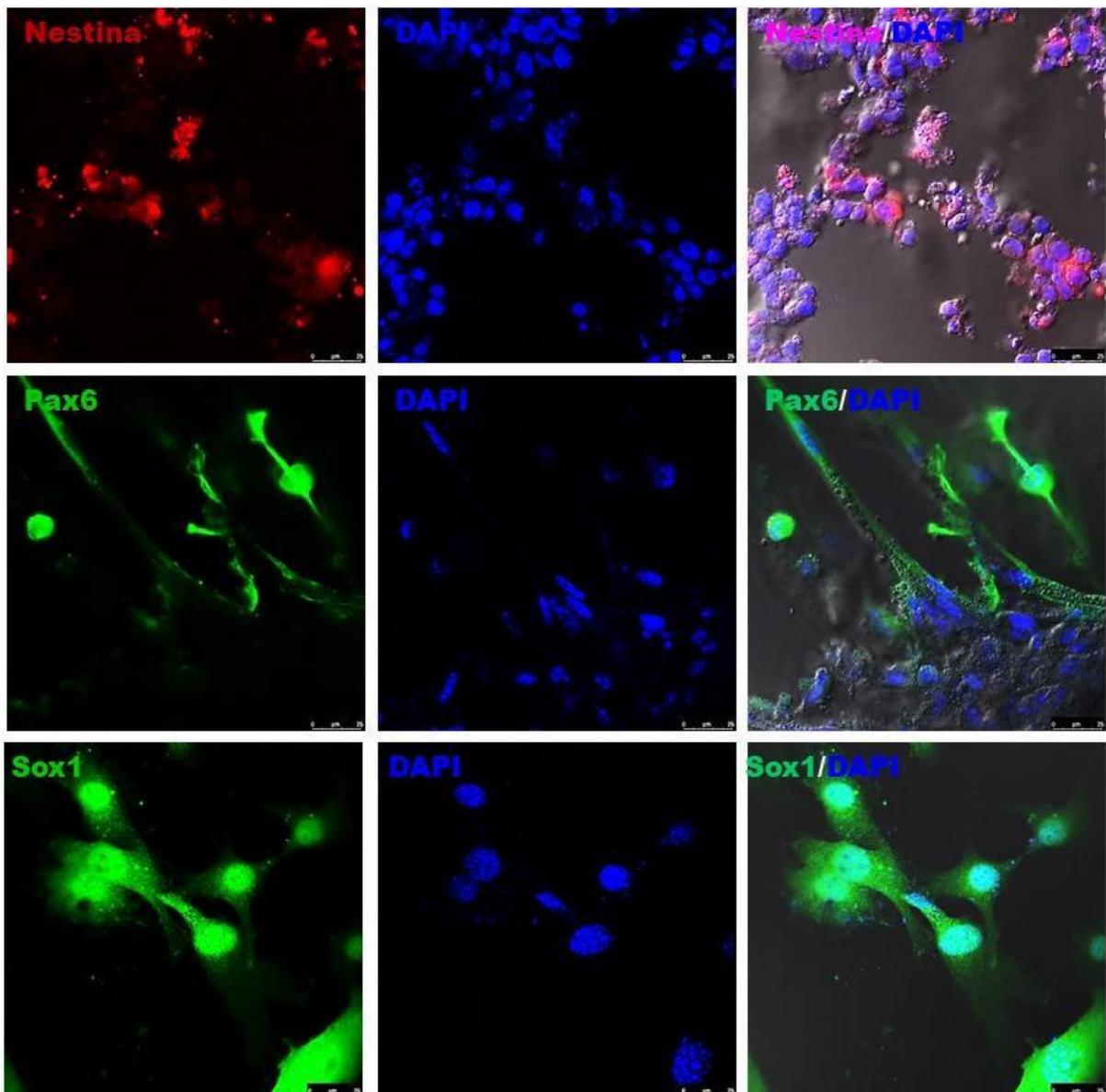


Fonte: próprio autor

Imagem de microscopia óptica demonstrando características neurais de células liberadas a partir do EB (A). Análise de imunofluorescência de células Nestina+ liberadas a partir do EB. Escala de 100µm (A) e 20µm (B),

Observamos também que as células apresentaram mudanças morfológicas em relação às mESCs e houve expressão de marcadores neuroepiteliais, nestina, Sox1 e Pax6 pela maioria das células diferenciadas analisadas por imunofluorescência (**Figuras 10 e 11**).

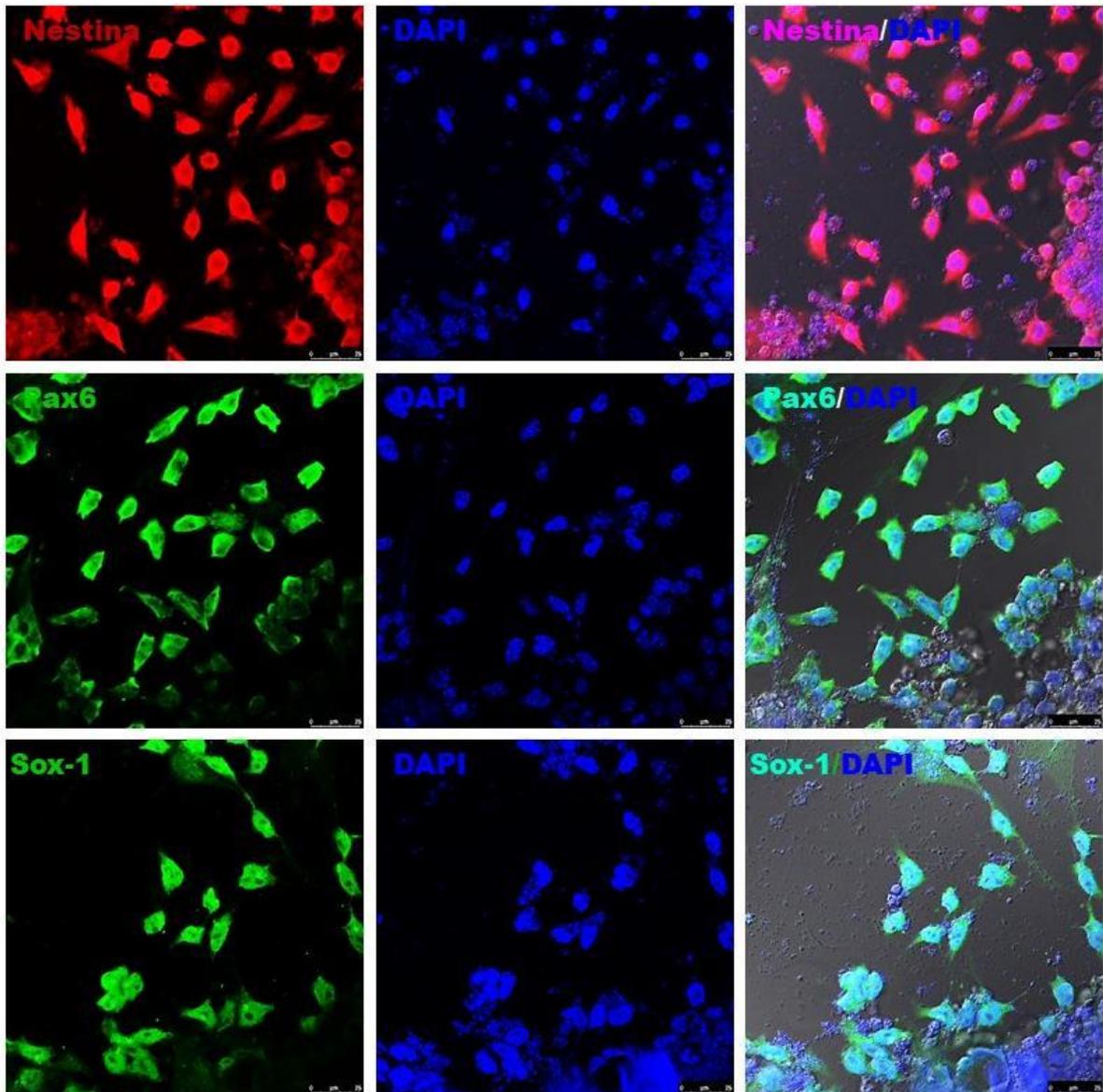
Figura 10 - Imagens representativas de imunofluorescência de precursores neurais (derivados da linhagem USP-1)



Fonte: próprio autor

As células expressaram Nestina, Pax6 e Sox1. Barra de escala 25μm.

Figura 11 - Imagens representativas de imunofluorescência de precursores neurais (derivados da linhagem HM-1)

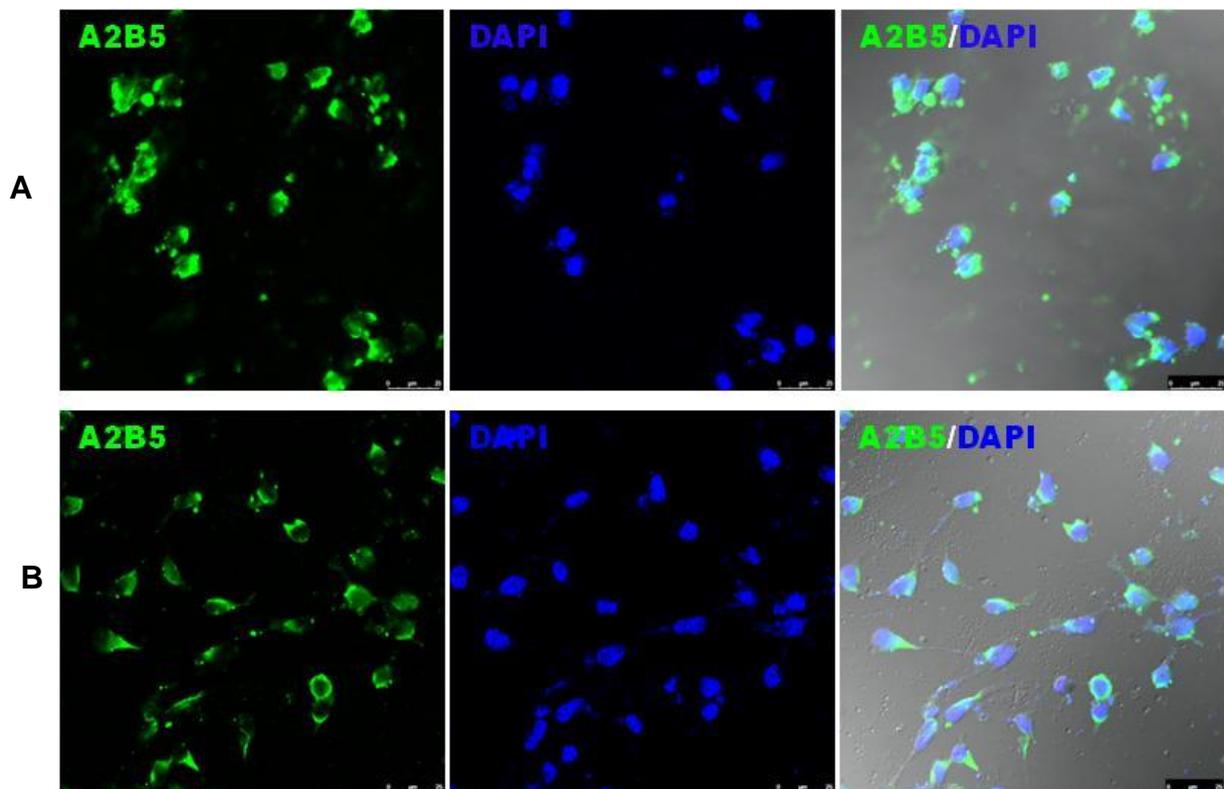


Fonte: próprio autor
Células expressando Nestina, Pax6, Sox1. Barra de escala 25µm.

4.4 Os procedimentos empregados favoreceram a diferenciação de precursores neurais a OPCs

Os precursores neurais obtidos em etapa anterior proliferaram e diferenciaram em resposta à adição de FGFb, EGF e PDGF-AA, ao meio de cultura. Após 12 dias de cultivo, as células apresentaram morfologia bipolar. Para comprovar a diferenciação em OPCs, foram realizados ensaios de imunofluorescência, que demonstraram marcação positiva para marcadores característicos como: A2B5, Olig2, Sox10, PDGFR α , e NG2. As duas linhagens de mESC utilizadas em nossos experimentos foram diferenciadas em OPCs de maneira eficiente, sem qualquer alteração do protocolo proposto (Figura 17). Na figura 12, observa-se que as OPCs derivadas de ESCs expressaram A2B5.

Figura 12 - Imagens representativas de imunofluorescência para marcação com anti-A2B5

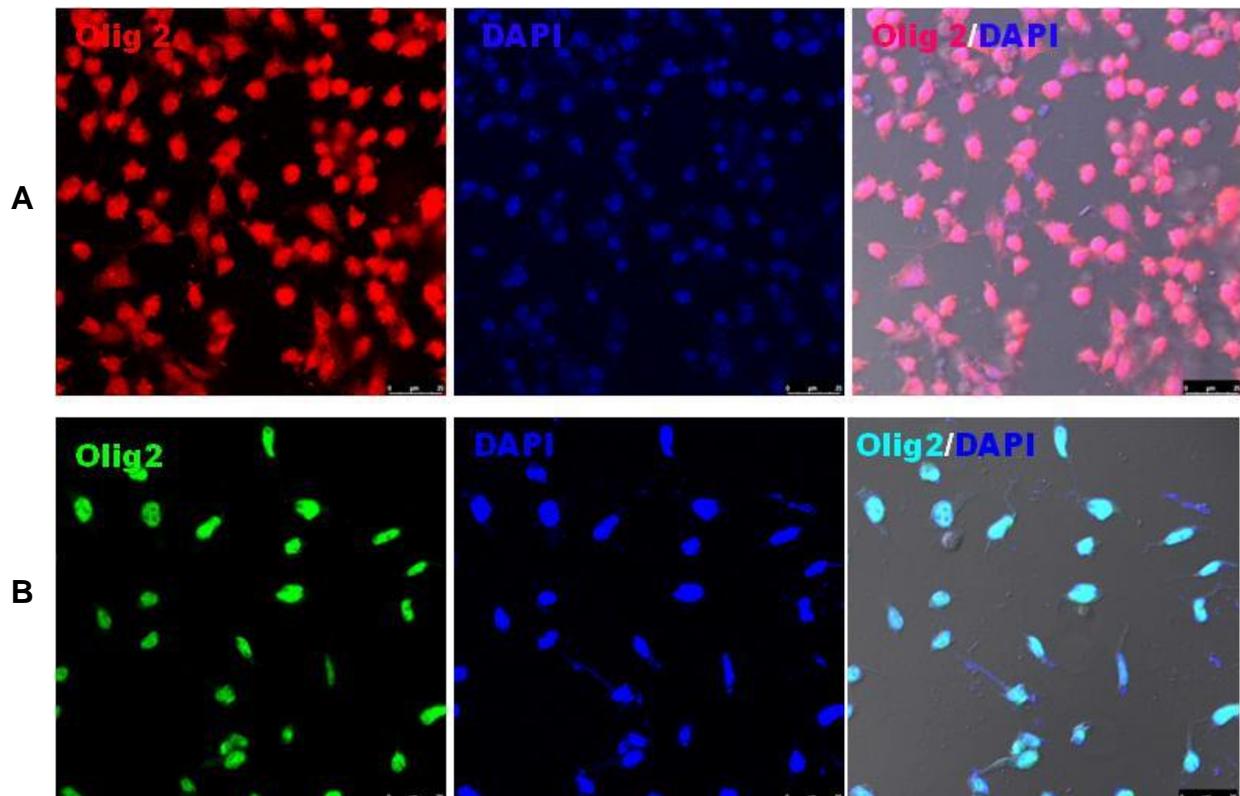


Fonte: próprio autor

Marcação anti-A2B5 (proteína lisossomal) em OPCs derivadas de mESCs, linhagem HM-1 em A e USP-1 em B. Escala de 25 μ m.

Os OPCs derivados de mESCs também expressaram o marcador Olig2, um importante fator de transcrição (Figura 13).

Figura 13 - Imagens representativas de imunofluorescência para marcação com anti-Olig2

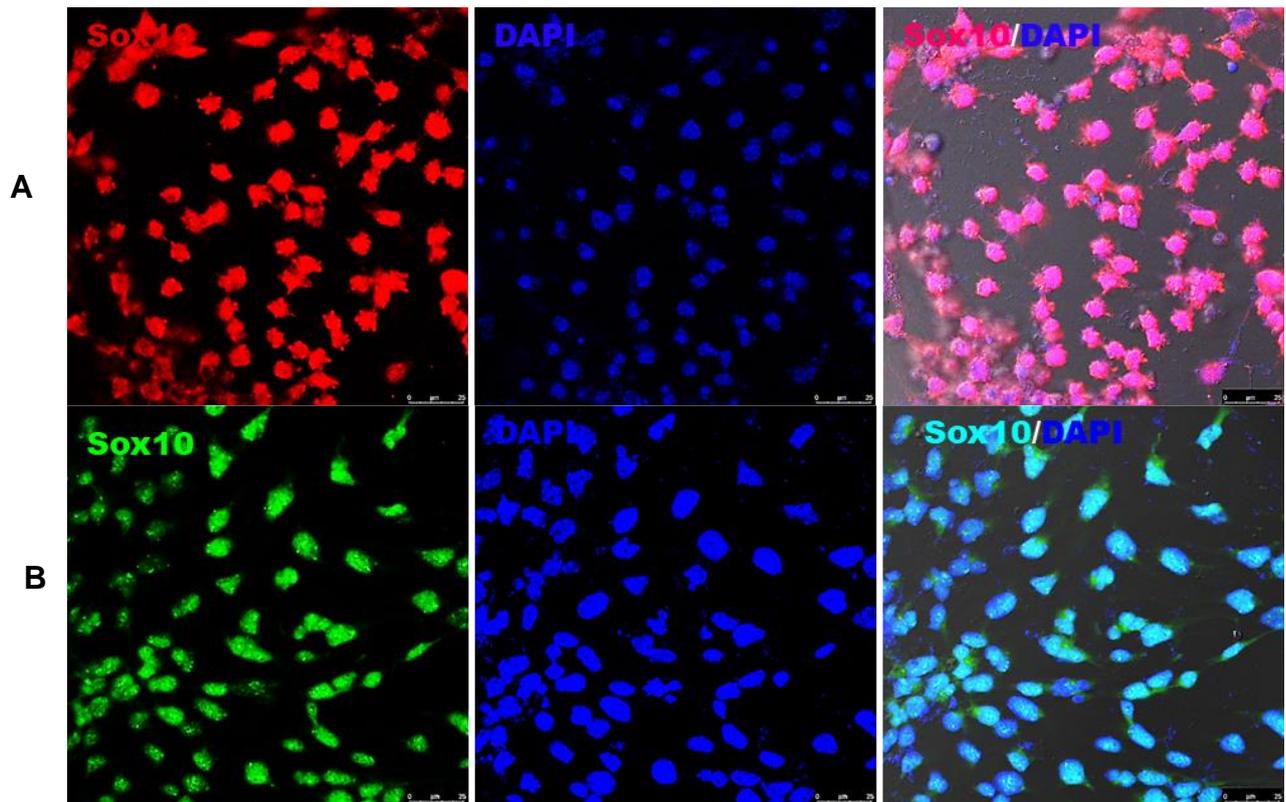


Fonte: próprio autor

Marcação com anti-Olig2 em OPCs derivadas de mESCs, linhagem HM-1 em A e USP-1 em B.
Escala de 25µm

O Sox10, outro fator de transcrição, foi expresso por OPCs derivadas de mESCs das duas linhagens empregadas no estudo (Figura 14).

Figura 14 - Imagens representativas de imunofluorescência para marcação com anti-Sox10

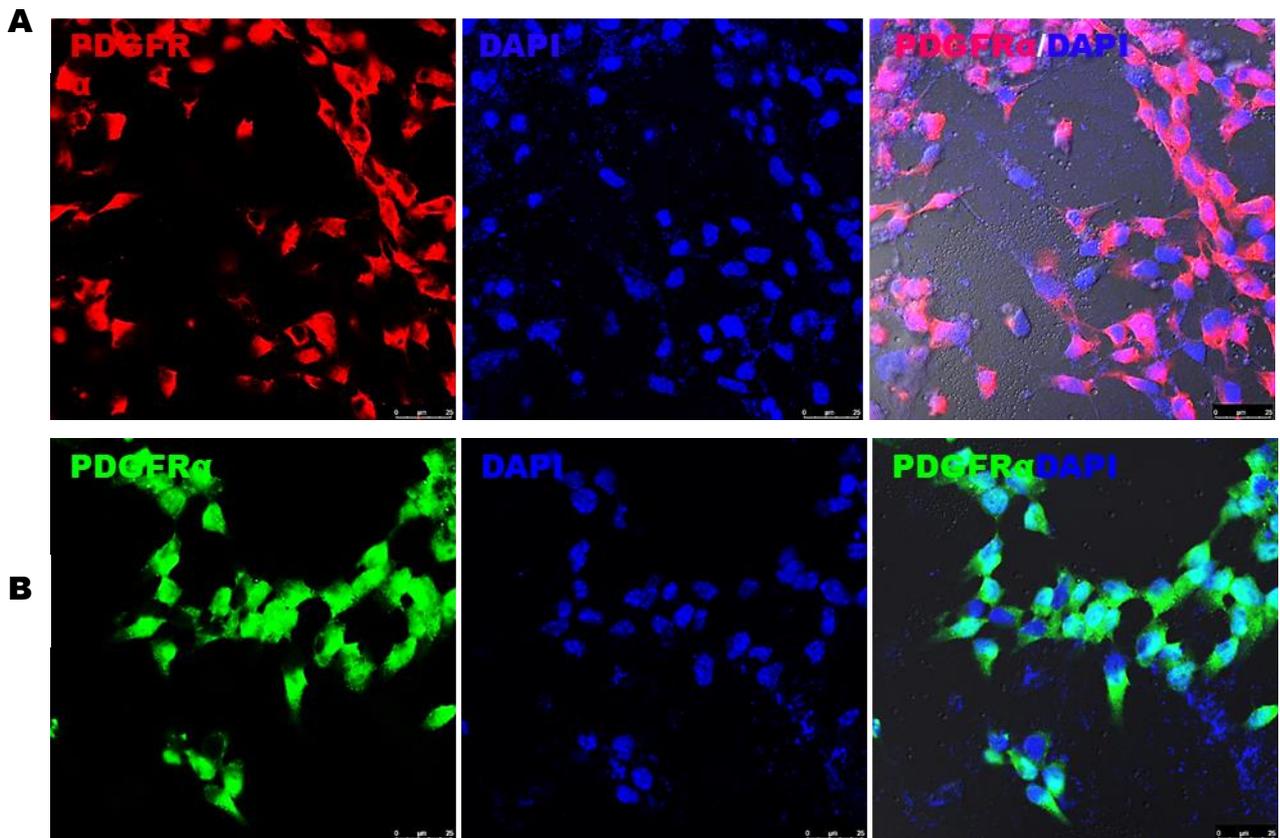


Fonte: próprio autor

Marcação com anti-Sox10 em OPCs derivadas de mESCs, linhagem HM-1 em **A** e USP-1 em **B**.
Escala de 25 μ m.

Outro importante marcador para OPCs é o PDGFR α . Na figura 15, podemos observar que os OPCs derivados de mESCs são positivos para PDGFR α :

Figura 15 - Imagens representativas de imunofluorescência para marcação com anti-PDGFR α

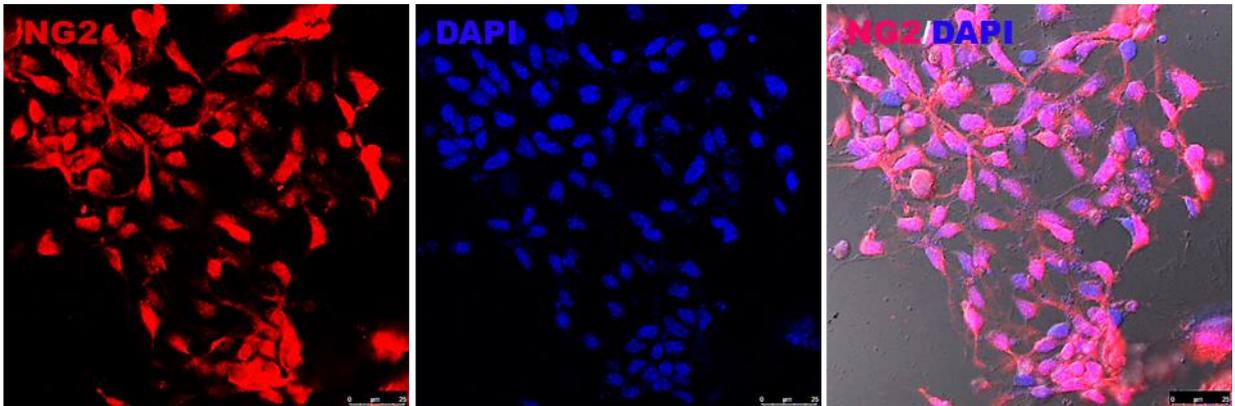


Fonte: próprio autor

Marcação com anti-PDGFR α (proteína de superfície) em OPCs derivadas de mESCs, linhagem HM-1 em A e USP-1 em B. Escala de 25 μ m.

O NG2, sulfato de condroitina, é um proteoglicano que ocorre no SNC quase que exclusivamente em OPCs. Este marcador foi altamente expresso em nossas células.

Figura 16 - Imagens representativas de imunofluorescência para marcação com anticorpo-NG2

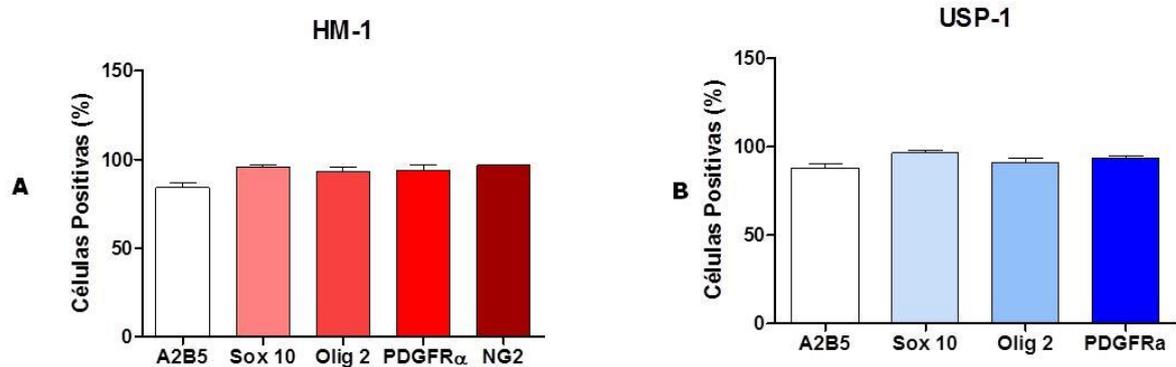


Fonte: próprio autor

Marcação com anticorpo-NG2 (proteína de superfície) em OPCs derivadas de mESCs (linhagem HM-1). Escala de 25 μ m.

A figura 17 (A e B) revela a expressão majoritária de marcadores de OPCs em células diferenciadas das duas linhagens utilizadas. Estes dados foram obtidos na primeira passagem de OPC, antes de qualquer seleção ou separação. Não foi possível realizar a quantificação para o marcador NG2 em OPCs (USP-1) por imunofluorescência.

Figura 17 - Quantificação da expressão de marcadores de OPCs



Fonte próprio autor

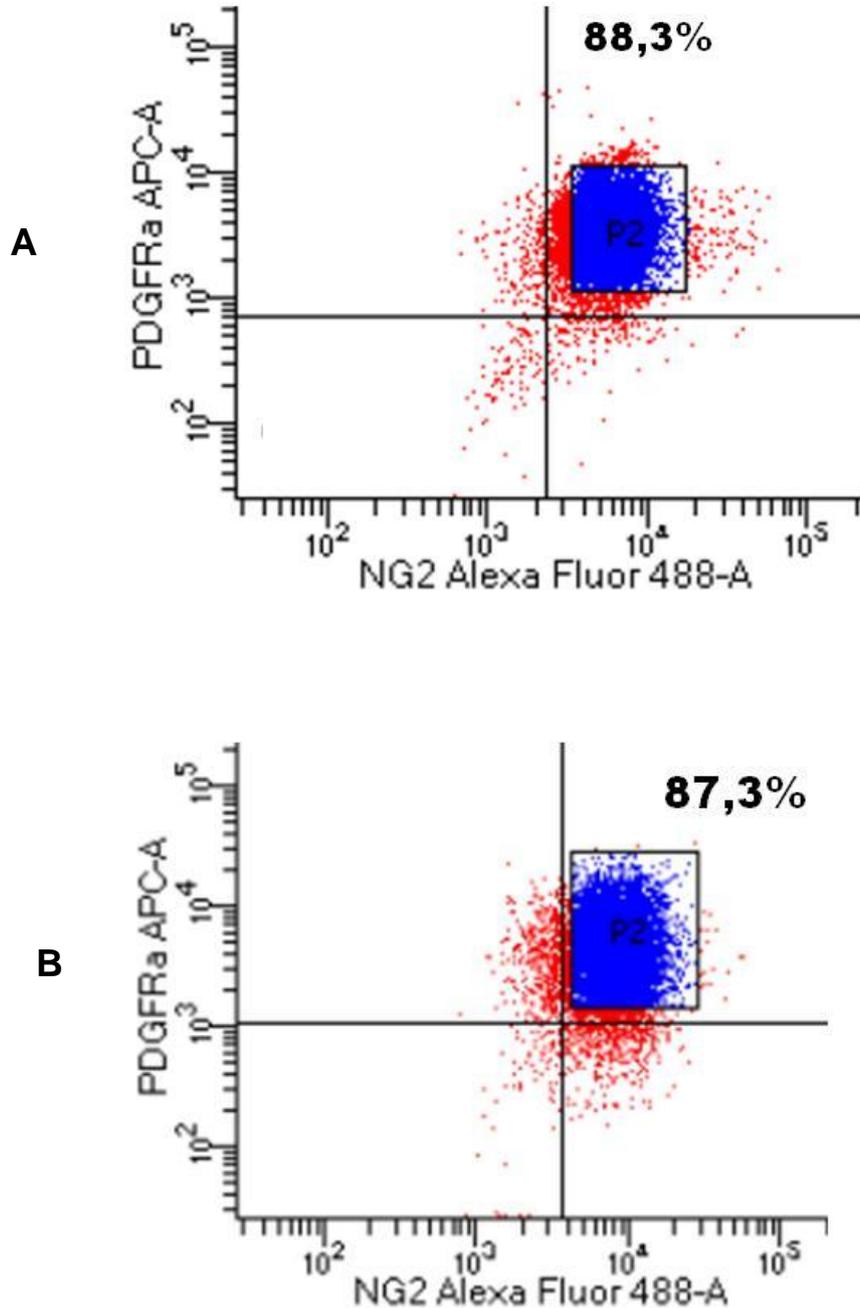
Quantificação da expressão de marcadores de OPCs em células diferenciadas derivadas mESCs linhagens HM-1 (A) e USP-1 (B) reveladas por imunofluorescência. Foram contadas 100 células em 3 campos aleatórios de 2 experimentos independentes e a porcentagem de células positivas foi calculada para cada marcador.

4.5 A análise de células por citometria de fluxo com dupla marcação confirmou a diferenciação de OPCs a partir de mESCs

As OPCs obtidas a partir de mESCs (linhagem USP-1) foram expandidas durante 10 passagens, conservando a pureza. Para confirmar a homogeneidade desta população de células, elas foram submetidas à análise por citometria de fluxo em passagens diferentes. Os resultados demonstram que essas células co-expressaram marcadores de superfície PDGFR α e NG2 em alta porcentagem (Figuras 18-A e 18-B), demonstrando a geração de uma população de células com alta pureza.

A citometria apresentada na Figura 18A foi realizada com OPCs de quarta passagem (p4) e resultou em 88,3% de positividade para a dupla marcação. No caso da Figura 18B, células não purificadas da mesma passagem (p4) das células submetidas à primeira citometria (Figura 18A), foram congeladas, descongeladas e, após proliferação por mais cinco passagens (p9), foram submetidas à citometria. O resultado semelhante (87,3% de dupla marcação) indica que as OPCs podem ser estocadas para serem utilizadas para testes posteriores.

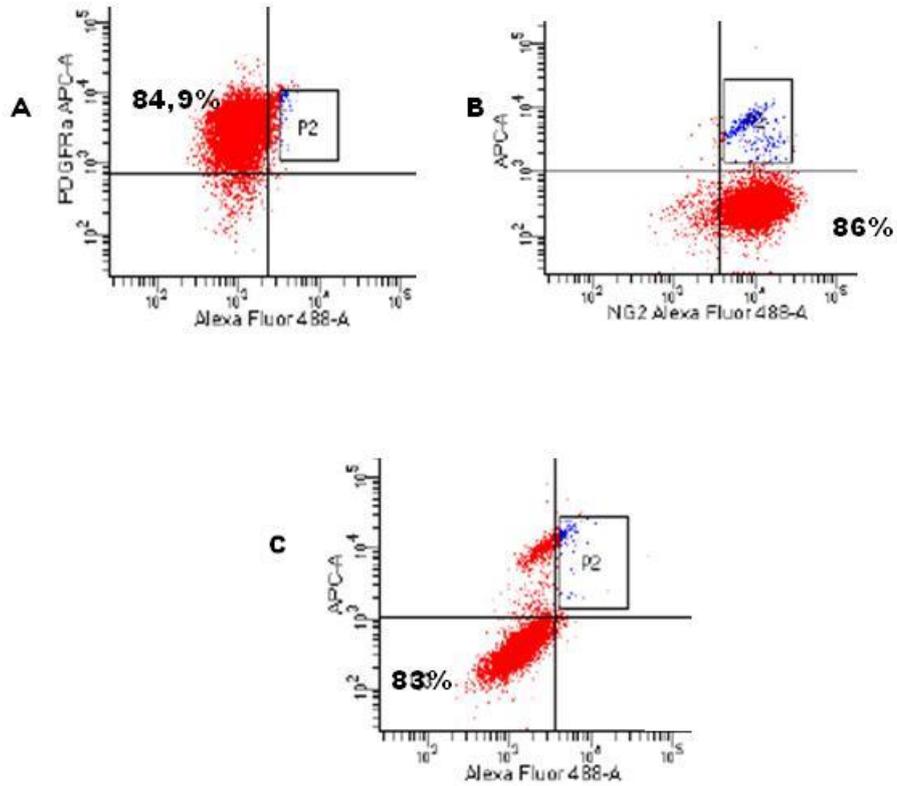
Figura 18 – Análise de citometria de fluxo demonstrando a co-expressão de NG2 e PDGFR α



Fonte; próprio autor

Citometria de fluxo. As figuras demonstram a co-expressão de NG2 e PDGFR α em OPCs de passagens diferentes, em baixa passagem (p4) **A** e em alta passagem após congelamento e descongelamento (p9) **B**.

Figura 19 Análise de citometria de fluxo para ensaios de controle



Fonte: próprio autor

As análises de citometria de fluxo demonstram a especificidade dos anticorpos. **A** OPCs marcadas apenas com anticorpo anti-PDGFR α ; **B** OPCs marcadas apenas com anticorpo anti- NG2 e o seu anticorpo secundário; **C** controle OPCs marcados apenas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488.

5 DISCUSSÃO

Terapias que visam promover a remielinização em pacientes acometidos por doenças desmielinizantes são baseadas na modulação de OPCs endógenas ou no transplante de células exógenas. Portanto, a obtenção de populações de OPCs, de alta pureza, pode ser uma estratégia relevante na busca por novos compostos, que promovam remielinização.

As ESCs em cultura apresentam uma característica marcante que é sua habilidade de se dividir indefinidamente, se forem mantidas em condições apropriadas, assim como sua capacidade em diferenciar em vários tipos celulares, incluindo OPCs e OL. Neste estudo, procuramos definir um protocolo de diferenciação de ESCs em OPCs, que fosse reprodutível, que produzisse uma quantidade ilimitada de OPCs e que estas células fossem caracterizadas com os principais marcadores típicos como Olig2, Sox10, A2B5, NG2 e PDGFR α .

Estudos anteriores descrevem a diferenciação de OPCs a partir de mESCs, contudo, estes trabalhos apresentaram rendimentos variados e não caracterizam as OPCs obtidas, pela expressão dos mesmos marcadores (Lager *et al.*, 2018; Bian *et al.*, 2016; Tokumoto *et al.*, 2010; Brustle *et al.*, 1999). Outros estudos descrevem a diferenciação de OPCs a partir de células tronco embrionárias humanas (hESCs) (Douvaras *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2009); porém estes protocolos apresentam múltiplos passos e são mais longos (acima de 60 dias) o que dificulta a sua aplicação. Assim, optamos por padronizar um protocolo de diferenciação de OPCs à partir de mESCs de menor duração (28 dias). As mESCs apresentam características comuns às hESCs, uma vez que, muitas características do desenvolvimento são conservadas entre as espécies e a maioria dos genes diferencialmente regulados tem variações de expressão semelhante nos dois organismos (Gabdoulline *et al.*, 2015).

De início, as mESCs foram cultivadas em co-cultura com células alimentadoras MEF, inativadas mitoticamente e na presença de LIF (citocina inibitória para a diferenciação), para que houvesse expansão de células com manutenção do estado indiferenciado. Tal estado indiferenciado foi verificado por análises morfológicas e análises de marcadores de pluripotência por imunofluorescência e RT-PCR. Para estas avaliações, escolhemos três dos

principais fatores de transcrição associados com a promoção da proliferação e inibição da diferenciação em mESCs: Nanog, Sox2 e Oct4 (Martello; Smith, 2014). Avaliamos também a expressão de outro marcador de mESC, o carboidrato de superfície SSEA-1 (Gooi *et al.*, 1981). Nossos resultados confirmaram a expressão dos genes Oct4; Sox2, Nanog, de suas proteínas correspondentes e do carboidrato de membrana SSEA-1 pelas células indiferenciadas de duas linhagens de mESCs avaliadas USP-1 e HM-1.

A primeira etapa para a diferenciação foi a formação de EBs. A diferenciação espontânea de ESCs através da formação de EBs é um método comum, especialmente na diferenciação de linhagens neurais (Rungarunlert *et al.*, 2009). Uma das vantagens da formação de EBs é que a diferenciação neural ocorre através de uma estrutura tridimensional, o que facilita o contato célula a célula, melhorando a sobrevivência, diferenciação e proliferação dos NPs, sem a necessidade da adição de matrizes extracelulares (Alsanie *et al.*, 2013). Alternativamente, outros estudos promovem a indução neural sem a formação de EB, mas pela formação de neuroesferas ou rosetas neurais por meio de suplementação do meio de cultivo com indutores e fatores de crescimento (Bian *et al.*, 2016; Najm *et al.*, 2011). A estratégia escolhida para alcançar a indução neural, neste trabalho, foi utilizar um meio sem ácido retinóico. A seleção neural a partir da progênie da EB foi obtida sob condições mínimas de crescimento, em um meio sem soro, suplementado com insulina, transferrina e selenito (meio ITS). Sob essas condições, a maioria das células derivadas de EB morre e emerge uma população distinta de células imaturas que expressa níveis crescentes do filamento intermediário nestina (Okabe *et al.*, 1990). A proteína nestina é um filamento intermediário de classe IV e é abundante durante a neurogênese no SNC e SNP. Desta forma, a nestina é utilizada como marcadora de células progenitoras neurais (Lendahl *et al.*, 1990; Frederiksen *et al.*, 1988; Hockfield; McKay, 1985) e sua expressão confirma características como multipotência, alta proliferação e capacidade de autorrenovação e regeneração (Neraldil; Veselska, 2015; Wiese *et al.*, 2004). O Pax6, expresso na ectoderme, é um fator de transcrição altamente conservado entre vertebrados e é muito importante em vários processos do desenvolvimento do SNC, especialmente na regulação de proliferação e diferenciação (Osumi *et al.*, 2008; Manuel *et al.*, 2015). Mutações ou deleções do

gene Pax6 em embriões desencadeia diversas desordens neurais, confirmando seu papel no desenvolvimento neural (Manuel *et al.*, 2015). A expressão de Pax6 também modula a neurogênese no adulto induzindo à diferenciação de NP em populações neuronais ou glias (Klempin *et al.*, 2012). Com relação ao Sox1, sua expressão é fortemente relacionada com a indução neural *in vivo* e *in vitro* e este fator de transcrição é expresso exclusivamente no SNC (Pevny *et al.*, 1998). No nosso estudo, portanto, confirmamos que as células diferenciadas nesta etapa, expressaram os marcadores Nestina, Sox1 e Pax6 compatíveis com o estágio de diferenciação neuroepitelial.

Após a etapa de indução neural, os precursores neurais foram diferenciados em OPCs em resposta à adição de importantes mitógenos como FGFb, EGF e PDGF-AA. O FGFb e o EGF. Esses fatores são utilizados em numerosos protocolos com intuito de promover a especificação celular de linhagens de OL (Bian *et al.*, 2016; Najm *et al.*, 2011). O PDGF (particularmente a isoforma PDGF-AA) é fator de crescimento descrito como um importante indutor de diferenciação de OPC exógenos e endógenos (Guo *et al.*, 2019). No nosso estudo, a adição dos fatores mencionados acima induziu a expressão de proteínas A2B5, Olig2, Sox10, PDGFR α e NG2 de maneira semelhante ao que ocorre na diferenciação de OPCs *in vivo*.

Como mencionado na Introdução, o A2B5, um gangliosídeo de superfície característico de precursores neurais, foi um dos primeiros marcadores descritos para OPCs (Ralf *et al.*, 1983), embora, *in vivo*, não seja muito específico para OPCs (Baracska *et al.*, 2007). Já o Olig2 é expresso na linhagem de OLs desde os precursores até o estágio adulto (Ono *et al.*, 2017). Para estudar as funções do fator Olig2, Takebayashi *et al.*, 2002) geraram camundongos com inativação homozigótica do gene *Olig2* e verificaram que estes animais não se alimentavam, morriam com um dia de vida e suas células neuroepiteliais não se diferenciavam em OLs, comprovando a importância deste fator de transcrição no processo de diferenciação deste tipo celular. O Sox10 é outro fator de transcrição de crucial importância. García-Léon e colaboradores (2017), demonstraram que a superexpressão de apenas SOX10 em NPs derivados de hPSC permitiu gerar OLs de maneira rápida e eficiente. Neste mesmo ano, para analisar a diferenciação e a multipotência de OPC murinos, Suzuki e colaboradores estabeleceram uma linhagem de camundongos transgênicos que expressam uma proteína fluorescente

Venus, sob controle do promotor de Sox10, cuja expressão é restrita a OPCs e OLs no SNC. Com essa ferramenta os autores demonstraram claramente a diferenciação de OPC em OL e astrócitos. Com relação ao PDGFR α , um receptor tirosina quinase, sabe-se que ele é crucial durante o desenvolvimento embrionário e no SNC adulto (Funa *et al.*, 2014). O NG2 é um marcador muito importante das OPCs e por este motivo essas células podem também ser chamadas de Células NG2, glias NG2 ou células progenitoras NG2 (Dimou; Gallo, 2015).

Vale mencionar que no nosso estudo as OPCs obtidas a partir de mESCs, foram expandidas durante 10 passagens com auxílio de FGFb e PDGF-AA, conservando a pureza. Para confirmarmos a homogeneidade desta população de células, as mesmas foram submetidas à análise por citometria de fluxo em diferentes passagens. Os resultados mostraram que estas células co-expressaram marcadores de superfície PDGFR α e NG2 em alta porcentagem, sugerindo que foram geradas populações de células com alta pureza. Interessantemente, a pureza de OPCs da quarta passagem foi de 88,3%, enquanto que, após congelamento/descongelamento e outras cinco passagens, a pureza foi de 87,3%. O resultado semelhante indica que elas podem ser estocadas e expandidas para serem utilizadas em testes posteriores.

Nosso protocolo de diferenciação de OPCs derivados de ESCs foi baseado nos trabalhos de Brustle *et al.*, 1999; e Tokumoto *et al.*, 2010, que, entretanto, obtiveram um rendimento baixo de OPCs. O estudo de Tokumoto *et al.*, 2010, gerou uma população de OPCs derivadas de mESCs com apenas 15,5% de expressão de A2B5. Com as modificações presentemente inseridas aperfeiçoamos o processo com relativa simplicidade e maior rendimento. Os trabalhos de Bian *et al.*, 2016 e Lager *et al.*, 2018 deram origem a OPCs com alta pureza (80 a 90% de positividade para marcadores como Sox10, Olig2 e Nkx2.2), porém fizeram uso de vários outros inibidores e fatores de crescimento, elevando o custo e a complexidade dos procedimentos.

No presente trabalho utilizamos células derivadas de duas linhagens de mESCs e ambas expressaram entre de 80 a 90% os marcadores A2B5, Sox10, Olig2, PDGFR α , demonstrando a alta positividade para todos. Também analisamos por citometria de fluxo a co-expressão de NG2 e PDGFR α , que são os marcadores mais frequentemente utilizados e representativos para caracterização de OPCs

(Wilson *et al.*, 2006; Alsanie *et al.*, 2013; Najm *et al.*, 2011) e verificamos, uma alta porcentagem de positividade (87,3 a 88,3%). Desse modo, as duas linhagens de mESCs utilizadas, foram capazes de se diferenciar em OPCs com eficiência semelhante, o que demonstra a robustez do protocolo executado.

Assim, a habilidade em mantermos a capacidade proliferativa das OPCs, mesmo após o congelamento e descongelamento, como observado por análise de marcadores por citometria de células de alta passagem, demonstra que este protocolo pode ser utilizado para experimentos em larga escala. Essa possibilidade é particularmente importante, visto que, abre perspectivas para a triagem de novos compostos remielinizantes. Por exemplo, poderemos utilizar as OPCs para testar as toxinas estudadas no Instituto Butantan, especialmente as que já apresentaram efeitos promissores em modelos animal de esclerose múltipla experimental.

As células, ainda podem ser modificadas geneticamente, na fase de ESCs ou OPCs e depois diferenciadas para se verificar o efeito da superexpressão ou inibição gênica em modelos de doenças neurodegenerativas ou para serem transplantados em animais para experimentos de funcionalidade (García-León *et al.*, 2018; Lager *et al.*, 2018)

Em suma, o estudo apresenta uma plataforma simples e eficiente para a geração de células da linhagem de OL, com várias aplicações, entre elas a triagem de novos compostos que atuem sobre OLs.

6 CONCLUSÕES

Estabelecemos um protocolo de diferenciação de OPCs derivados de mESCs eficiente e que gera células diferenciadas com alta pureza.

Com algumas modificações, conseguimos otimizar protocolos previamente descritos, o que resultou em maior rendimento das OPCs geradas.

As duas linhagens de mESCs empregadas neste estudo, foram capazes de gerar OPCs com eficiência semelhante e com o mesmo protocolo.

A caracterização de OPCs foi realizada por análises de imunofluorescência para cinco marcadores destas células: A2B5, Olig2, Sox10, NG2 e PDGFR α .

A análise por citometria de fluxo de OPCs duplamente marcadas para NG2 e PDGFR α confirmou a expressão destes marcadores e a relativa homogeneidade da população obtida.

A população de OPCs foi capaz de proliferar e expandir para gerar populações suficientes para análise por citometria e resistiu ao congelamento/descongelamento.

O congelamento e descongelamento das OPCs preservou a capacidade de proliferação das células geradas.

Desta forma, geramos uma população de OPCs a partir de mESCs em quantidade suficiente serem utilizadas

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A. A.; CHITTAJALLU, R.; BELACHEW, S.; GALLO, V. NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. **J Cell Biol.** v.165, p. 575-589, 2004.
- ALSANIE, W.F.; NICLIS, J.C.; PETRATOS, S. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocytes: protocols and perspectives. **Stem Cells Dev.** v.22, n.18, p.2459-2476, 2013.
- BARATEIRO, A.; FERNANDES, A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination **Biochimica et Biophysica Acta** v.1843, p.1917-1929, 2014. Review.
- BARACSKAY, K. L.; KIDD, G.J.; MILLER, R.H.; TRAPP, B.D. NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. **Glia.** v.55, n.10, p.1001-1010, 2007.
- BARKOVICH A, J.; DEON, S. Hypomyelinating disorders: An MRI approach. **Neurobiol Dis.** v. 87, p.50-58, 2016.
- BARTON, S.K.; GREGORY, J.M.; CHANDRAN, S.; TURNER, B.J. Could an Impairment in Local Translation of mRNAs in Glia be Contributing to Pathogenesis in ALS? **Front. Mol. Neurosci.** v.12, n.124, 2019.
- BARTZOKIS, G. Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. **Neurobiol Aging.** v.32, n.8, p. 1341-1371, 2011.
- BAUER, J., BRADL, M.; KLEIN, M.; LEISSER, M.; DECKWERTH, T.L.; WEKERLE, H.; LASSMANN, H. Endoplasmic reticulum stress in PLP overexpressing transgenic rats: gray matter oligodendrocytes are more vulnerable than white matter oligodendrocytes. **J Neuropathol Exp Neurol** 61:12-22, 2002.
- BERCURY, K..K.; MACKLIN, W.B. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. **Dev Cell.** v.32, n.4, p. 447- 458, 2015. Review.
- BERGER, J., FORSS-PETTER, S., EICHLER, F.S., Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy. **Biochimie** v. 98, p. 135-42, 2014.
- BIAN, J, ZHENG, J, LI, S.; LUO, L.; DING, F. Sequential Differentiation of Embryonic Stem Cells into Neural Epithelial-Like Stem Cells and Oligodendrocyte Progenitor Cells. **PLoS ONE** v.11, n.5, 2016.
- BOVE, R.M.; GREEN, A.J. Remyelinating Pharmacotherapies in Multiple Sclerosis. **Neurotherapeutics.**v.14, n.4, p.894-904, 2017.

BRADL, M.; LASSMANN, H. Oligodendrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.**, v. 119, p. 37-53, 2010. Review

BRIGATTE, P.; KONNO, K.; GUTIERREZ, V.P.; SAMPAIO, S.C.; ZAMBELLI, V.O.; PICOLO, G.; CURI, R.; CURY, Y. Peripheral kappa and delta opioid receptors are involved in the antinociceptive effect of crotalphine in a rat model of cancer pain. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 109, p.1-7, 2013

BRESSAN, E.; TOUSKA, F.; VETTER, I.; KISTNER, K.; KICHKO, T.I.; TEIXEIRA, N.B.; PICOLO, G.; CURY, Y.; LEWIS, R.;J.; FISCHER, M.J.; ZIMMERMANN, K.; REEH, P.W. Crotalphine desensitizes TRPA1 ion channels to alleviate inflammatory hyperalgesia. **Pain.** v.157, n.11, p.2504-2516, 2016

BRUSTLE, O.; JONES, K.N.; LEARISH, R.D, KARRAM, K, CHOUDHARY, K.; WIESTLER, O.D.; DUNCAN, I.D; MCKAY, R.D. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. **Science.** v.285, n.5428, p.754-756, 1999.

BUSER, J. R., MAIRE, J., RIDDLE, A., GONG, X., NGUYEN, T., NELSON, K., Arrested pre oligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. **Annals of Neurology**, v.71, p.93-09, 2012.

FRANKLIN, R. J. M.; ZHAO, C.; SIM, F. J. Ageing and CNS remyelination. **Neuroreport** v.13, p.923-928, 2002.

CHAMBERLAIN, K.A.; NANESCU, S.E.; PSACHOULIA, K.; HUANG, J.K. Oligodendrocyte regeneration: Its significance in myelin replacement and neuroprotection in multiple sclerosis. **Neuropharmac.** v.110, p.633-643, 2016

CHEN, N.; XU, S.; ZHANG, Y.; WANG, F. Animal protein toxins: origins and therapeutic applications. **Biophys Rep.** v.4, n.5, p.233-242, 2018

CHRAST, R.; SAHER, G.; NAVE, K. A; VERHEIJEN, M.H.; Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. **Journal of Lipid Research** v.52, p. 419-434, 2011.

CLARNER, T., WIECZOREK, N., KRAUSPE, B., JANSEN, K., BEYER, C., KIPP, M. Astroglial redistribution of aquaporin 4 during spongy degeneration in a Canavan disease mouse model. **J. Mol. Neurosci.** v.53, p. 22-30, 2014.

COLE, K.L.H.; EARLY, J.J.; LYONS, D.A. Drug discovery for remyelination and treatment of MS. **Glia.** v.65, n.10, p.1565-1589, 2017.

COMABELLA, M; KHOURY, S.J. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Immunology**, v.42, n. 1, p.2-8, 2012. Review.

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet.** v.372; n.9648, p.1502-1517, 2008. Review.

CONNOR, J.R.; MENZIES, S.L. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. **Glia**. v. 17, n. 2p. 83-93, 1996

DAWSON, M. R. L.; POLITO, A.; LEVINE, J. M.; REYNOLDS, R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. **Mol. Cell. Neurosci.** v.24, p.476-488, 2003.

DE SOUZA, J.M; GONCALVES, B.D.C.;GOMEZ, M.V.; VIEIRA, L.B RIBEIRO F.M. Animal Toxins as Therapeutic Tools to Treat Neurodegenerative Diseases. **Front. Pharmacol.**v. 9, n.145, 2018

DEL RÍO-HORTEGA P. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. **Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural**. v.14, p.5-122, 1928.

DESHMUKH, V. A.; TARDIF, V.; LYSSIOTIS, C.A.; GREEN, C.C.; KERMAN, B.; KIM, H.J.; PADMANABHAN,K.; SWOBODA,J.G.; AHMAD,I.; KONDO,T.; GAGE, F.H.; THEOFILOPOULOS, A.N.; LAWSON, B.R.; PETER G. SCHULTZ, P.G.; LAIRSON, L.L. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis - **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 327-332, 2013.

DIMOU, L; GALLO, V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. **Glia**. v. 63, n.8, p.1429-451, 2015. Review.

DOMINGUES, H. S.; CRUZ, A.; CHAN, J.R.; RELVAS, J. B.; RUBINSTEIN, B. PINTO, I.M. Mechanical plasticity during oligodendrocyte differentiation and myelination. **Glia**. v.66, n.1, p. 5-14, 2018.

DOUVARAS, P.; WANG, J.; ZIMMER, M.; HANCHUK, S.; O'BARA, M.A. SADIQ, S.; SIM, F.; GOLDMAN, J.; FOSSATI, V. Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**. v.3, n.2, p.250-259, 2014

DUNCAN, I.D.; RADCLIFF, A.B. Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology. **Exp.Neurol.**, v. 283, p. 452-475, 2016. Review.

DUTTA, R.; TRAPP, B.D. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. **Prog. Neurobiol.** v.93, p.1-12, 2011.

EDGAR, J.M.; McCULLOCH, M.C.; MONTAGUE, P.; BROWN, A.M.; THILEMANN, S.; PRATOLA, L.; GRUENENFELDER, F.I.; GRIFFITHS, I.R.; NAVE, K.A. Demyelination and axonal preservation in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. **EMBO Mol Med**. v.2, n.2, p.42-50, 2010.

EMERY, B., LU, Q.R. Transcriptional and epigenetic regulation of oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** v.7, n.9, 2015.

FFRENCH-CONSTANT, C. & RAFF, M. C. Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. **Nature** v.319, p. 499-502, 1986.

FRANKLIN, R. J. M.; ZHAO, C.; SIM, F. J. Ageing and CNS remyelination. **Neuroreport** v.13, p.923-928, 2002.

FRANKLIN, R.J.M.; FFRENCH-CONSTANT. C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. **Nat. Rev. Neurosci.** v.9, p839-855, 2008.

FRANKLIN, R.J; FFRENCH-CONSTANT, C.; EDGAR, J.M.; SMITH, K.J. Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. **Nat Rev Neurol.**, v.8, n.11, p.624-34, 2012.

FRANKLIN, R.J.; GALLO, V. The translational biology of remyelination: past, present, and future. **Glia.** v.62, n.11, p. 1905-1915, 2014.

FREDERIKSEN, K.; MCKAY, R. D. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. **J. Neurosci.** v.8., p 1144-1151, 1988.

FUNA, K; SASAHARA, M. The roles of PDGF in Development and During Neurogenesis in the Normal and Diseased Nervous System. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 9: p. 168-181, 2014.

GABDOULLINE, R.; KAISERS, W.; GASPAR, A.; MEGANATHAN, K.; DOSS, M.X.; JAGTAP, S.; HESCHELER, J.; SACHINIDIS, A.; SCHWENDER, H. Differences in the Early Development of Human and Mouse Embryonic Stem Cells. **PLoS One.** v.10, n.10, 2015.

GAESSER, J. M.; FYFFE-MARICICH, S.L. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS **Exp. Neurol.**, v .283, p. 501-511, 2016. Review.

GARCÍA-LEÓN, J.A.; KUMAR, M.; BON, R.; CHAU, D.; ONE, J.; WOLFS, E.; EGGERMONT K.; BERCKMANS, P.; GUNHANLAR, N.; DE VRIJ, F.; LENDEMEIJER, B.; PAVIE, B.; CORTHOUT, N.; KUSHNER, S.A., DÁVILA, J.C., LAMBRICHTS, I.; HU, W.S.; VERFAILLIE, C.M. SOX10 Single Transcription Factor-Based Fast and Efficient Generation of Oligodendrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 10, n.2, p. 655-672, 2018.

GARG N; SMITH T.W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. **Brain Behav.** v.5, n.9, p.1-13, 2015.

GIOVANNONI, G.; BUTZKUEVEN, H.; DHIB-JALBUT, S., HOBART, J.; KOBELT, G.; PEPPER, G.; SORMANI, M.P.; THALHEIM, C.; TRABOULSEE, A.; VOLLMER, T. Brain health:time matters in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders.** v. 9, S5-S48, 2016.

GOLDMAN S.A.; KUYPERS N.J. How to make an oligodendrocyte. **Development.**, v.142, n.23 p. 3983-3995, 2015. Review.

GOOI, H.C.; FEIZI, T.; KAPADIA, A.; KNOWLES, B.B.; SOLTER, D.; EVANS, M.J. Stage-specific embryonic antigen involves alpha 1 goes to 3 fucosylated type 2 blood group chains. **Nature**. v.292, n.5819, p.156-158, 1981.

GUO, X.Y.; DUAN, F.X.; CHEN, J.; WANG, Y.; WANG, R.; SHEN, L.; QI, Q.; JIANG, Z.Q.; ZHU, A.Y.; XI, J.; LÜ, H.Z.; HU, J.G. Subcutaneous Administration of PDGF-AA Improves the Functional Recovery After SpinalCord Injury. **Front. Neurosci**. v.13, n.6, 2019.

GUTIERREZ, V.P.; KONNO, K.; CHACUR, M.; SAMPAIO, S.C.; PICOLO, G.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CURY, Y. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.594, p. 84-92, 2008.

GUTIERREZ, V.P.; ZAMBELLI, V.O.; PICOLO, G.; CHACUR, M.; SAMPAIO S.C.; BRIGATTE, P.; KONNO, K.; CURY, Y. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behav Pharmacol.**, v.23, n.1, p. 14-24, 2012

HARLOW, D.E.; HONCE, J.M; MIRAVALLE, A.A. Remyelination Therapy in Multiple Sclerosis. **Front Neurol**. v.6, n. 257, 2015.

HARTLINE D. K; COLMAN D. R. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. **Curr Biol**. v.17, n. 1. p. 29-35, 2007.

HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **Lancet Neurol**. v. 14, p. 406-419, 2015.

HERRING, N.R.; KONRADI C. Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia. **Front Biosci**. v.3, p. 23-40, 2011.

HILL, R.A; NISHIYAMA, A. NG2 cells (polydendrocytes): listeners to the neural network with diverse properties. **Glia**.v.;62, n.8, p. 1195-210, 2014

HOCKFIELD, S. MCKAY, R. D. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. **J. Neurosci**. v.5, p. 3310-3328, 1985.

HUANG, B.; WEI, W.; WANG, G.; GAERTIG, M.A.; FENG, Y.; WANG, W.; LI, X-J.; LI, S. Mutant Huntington Downregulates Myelin Regulatory Factor-Mediated Myelin Gene Expression and Affects Mature Oligodendrocytes. **Neuron**. v. 85, n.6, p. 1212-1226, 2015.

HU, B.Y.; D.U. Z.W.; ZHANG, S.C. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. **Nat Protoc**. v.4, n.11, p. 1614-1622, 2009.

KARIMI, A.; AHMADI, F.; PARIVAR, K.; NABIUNI, M.; HAGHIGHI, S.; IMANI, S.; AFROUZI, H. Effect of honey bee venom on lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. **Iran J Pharm Res**. 2012

KATSUMOTO, A.; LU, H.; MIRANDA, A.S.; RANSOHOFF, R.M. Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. **J Immunol.** v.193, n.6 p. 2615-21, 2014.

KLEMPIN, F.; MARR, R. A.; PETERSON, D.A. Modification of pax6 and olig2 expression in adult hippocampal neurogenesis selectively induces stem cell fate and alters both neuronal and glial populations. **Stem Cells.** v.30, n.3, p.500-509, 2012.

KIRBY, L.; JIN, J.; CARDONA, J.G.; SMITH, M.D.; MARTIN, K.A; WANG, J.; STRASBURGER, H.; HERBST, L.; ALEXIS, M.; KARNELL, J.; DAVIDSON, T.; DUTTA, R.; GOVERMAN, J.; BERGLES, D.; CALABRESI, P.A. Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. **Nat Commun.** v.10, n.1, 2019.

KOMEGAE, E.N.; SOUZA, T.A; GRUND, L.Z.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Multiple functional therapeutic effects of TnP: A small stable synthetic peptide derived from fish venom in a mouse model of multiple sclerosis. **PLoS One.** v.12, n.2, 2017.

KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CAMARGO, A.C.; CURY, Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p.1293-1304, 2008.

KOUDRIAVTSEVA, T.; RENNA, R.; PLANTONE, D.; MAINERO, C.; Demyelinating and thrombotic diseases of the central nervous system: common pathogenic and triggering factors. **Front Neurol.**, v.6, n.63, p. 1-4, 2015.

LAMPRON, A.; LAROCHELLE, A.; LAFLAMME, N.; PRÉFONTAINE, P.; PLANTE, M.M.; SÁNCHEZ, M.G.; YONG, V.W.; STYS, P.K.; TREMBLAY, M.È.; RIVEST, S. Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. **J Exp Med.** v.212, n.4. p. 481-95, 2015.

LAGER, A.M.; CORRADIN, O.G.; CREGG, J.M. ELITT, M.S. SHICK, H.E.; CLAYTON, B.L.L.; ALLAN, K.C.; OLSEN, H.E.; MADHAVAN, M.; TESAR, P.J. Rapid functional genetics of the oligodendrocyte lineage using pluripotent stem cells. **Nat Commun.** v.9, n.1, 3708, 2018.

LAU, L.W.; CUA, R.; KEOUGH, M.B.; HAYLOCK-JACOBS, S.; YONG V.W. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. **Nat Rev Neurosci.** v.14, n.10, p.722-729, 2013.

LEE, Y.; MORRISON, B.M.; LI Y.; LENGACHER, S.; FARAH, M.H.; HOFFMAN, P.N.; LIU, Y.; TSINGALIA, A.; JIN, L.; ZHANG, P.W, PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J, ROTHSTEIN J.D. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. **Nature.** v.487, n.7408, p.443-448, 2012.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L.B.; MCKAY, R.D.G. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell** v.60, p.585-595, 1990.

LIN, S.C.; BERGLES, D. E. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nat. Neurosci.** v.7, p.24-32, 2004.

LOURENÇO, T.; PAES DE FARIA, J.; BIPPES, C.A.; MAIA, J.; LOPES-DA-SILVA, J.A.; RELVAS, J.B.; GRÃOS, M. Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues. **Sci Rep.**v.6, n.21563, 2016.

LUCCHINETTI, C.; BRÜCK, W.; PARISI, J.; SCHEITHAUER, B.; RODRIGUEZ, M.; LASSMANN, H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. **Brain.** v.122, p. 2279-95, 1999.

LUCCHINETTI, C.F.; GUO, Y.; POPESCU, B.F.; FUJIHARA, K.; ITOYAMA, Y; MISU, T. The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica. **Brain Pathol.** v. 24, p.83-97; 2014.

MACKAY A.L., LAULE C. Magnetic Resonance of Myelin Water: An in vivo Marker for Myelin. **Brain Plasticity.** v. 2, n.1, p.71-91, 2016.

MAGIN, T.M.; McWHIR, J.; MELTON, D.W. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. **Nucleic Acids Res.**v.20, n.14, p.3795-3796, 1992.

MALLUCCI, G.; PERUZZOTTI-JAMETTI, L. BERNSTOCKA, J. D.; PLUCHINO, S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. **Prog Neurobiol:** p. 1-22, 2015.

MANUEL, M.N.; MI, D.; MASON, J.O.; PRICE, D.J. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. **Front Cell Neurosci.** v. 9, n.70, 2015.

MARINELLI, C., BERTALOT, T.; ZUSSO, M.; SKAPER, S.D.; GIUSTI, P. Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage. **Front Cell Neurosci.** v.10, n.27, 2016.

MARTELLO, G.; SMITH, A. The nature of embryonic stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v.30, p.647-675, 2014.

MAYER, J.A., GRIFFITHS, I.R., GOLDMAN, J.E., SMITH, C.M., COOKSEY, E., RADCLIFF, A.B., DUNCAN, I.D. Modeling the natural history of Pelizaeus-Merzbacher disease. **Neurobiol. Dis.** v.75, p.115-130, 2015.

McMURRAN C.E.; JONES C.A.; FITZGERALD D.C.; FRANKLIN R.J.M. CNS Remyelination and the Innate Immune System. **Front. Cell Dev. Biol.** v. 4, n.38, p.1-8, 2016.

McTIGUE, D. M.; TRIPATHI, R. B. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. **J. Neurochem.** v.107, p.1-19, 2008.

MESSING, A., BRENNER, M., FEANY, M.B., NEDERGAARD, M., GOLDMAN, J.E. Alexander disease. **J. Neurosci.** v.32, p. 5017–5023, 2012.

MIRON, V.E.; KUHLMANN, T.; ANTEL, J.P. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1812, p. 184-193, 2010.

MIRON, V.E.; BOYD, A.; ZHAO, J.W.; YUEN, T.J.; RUCKH, J.M.; SHADRACH, J.L.; VAN WIJNGAARDEN, P.; WAGERS, A.J.; WILLIAMS, A, FRANKLIN, R.J.M.; FFRENCH-CONSTANT, C. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. **Nat Neurosci.** v.16, n.9, p.1211-1218, 2013.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis around the World.

NAJM, F.J., ZAREMBA, A.; CAPRARIELLO, A.V.; NAYAK, S.; FREUNDT, E.C.; SCACHERI, P.C.; MILLER, R.H.; TESAR, P.J. Rapid and robust generation of functional oligodendrocyte progenitor cells from epiblast stem cells. **Nat Methods.**v.8, n.11, p. 957-962, 2011.

NAJM, F. J, MADHAVAN, M.; ZAREMBA, A.; SHICK, E.; KARL, R.T.; FACTOR, D.C.; MILLER, T.E.; NEVIN, Z.S. KANTOR, C.; SARGENT, A.; QUICK, K.L.; SCHLATZER, D.M.; TANG, H.; PAPOIAN, R. et al. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination *in vivo*. **Nature** v. 522, p.216-220, 2015

NAVE, K. A.; TRAPP, B. D. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. **Annu Rev Neurosci**, v. 31, p.535-561, 2008. Review.

NERADIL, J.; VESELSKA, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. **Cancer Sci.**; v. 106, n.7, p 803-811, 2015.

NISHIYAMA, A.; KOMITOVA, M.; SUZUKI, R.; ZHU, X. Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10, p. 9 - 22, 2009.

NOVITCH, B. G.; CHEN, A. I.; JESSELL, T. M. Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. **Neuron** v.31, p.773-789, 2001.

O'CONNOR, K. C.; BAR-OR, A.; HAFLER, D. A. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. **J. Clin. Immunol.**, v 21, p.81-92, 2001.

- OKABE, S.; FORSBERG-NILSSON, K.; SPIRO, A.C.; SEGAL, M.; MCKAY, R.D. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. **Mech. Dev.** v.59, p.89-102, 1996.
- OLMOS-SERRANO, J.L.; KANG, H.J.; TYLER, W.A.; SILBEREIS, J.C.; CHENG, F.; ZHU, Y.; PLETIKOS, M.; JANKOVIC-RAPAN, L.; CRAMER, N.P.; GALDZICKI, Z.; GOODLIFFE, J.; PETERS, A.; SETHARES, C.; DELALLE, I.; GOLDEN, J.A.; HAYDAR, T.F.; SESTAN N. Down syndrome developmental brain transcriptome reveals defective oligodendrocyte differentiation and myelination. **Neuron.** v.89, n.6, p.1208-1222, 2016.
- ONO, K.; HIRAHARA, Y.; GOTOH, H.; NOMURA, T.; TAKEBAYASHI, H.; YAMADA, H.; IKENAKA, K. Origin of Oligodendrocytes in the Vertebrate Optic Nerve: A Review **Neurochem Res.** v. 43, n.1, p.186-194, 2018.
- OSUMI, N.; SHINOHARA, H.; NUMAYAMA-TSURUTA, K., MAEKAWA, M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. **Stem cells.**, v.26, n.7; 1663-1672, 2008.
- PACEY, L.K.; XUAN, I.C.; GUAN, S.; SUSSMAN, D.; HENKELMAN, R.M.; CHEN, Y.; THOMSEN, C.; HAMPSON, D.R. Delayed myelination in a mouse model of fragile X syndrome. **Hum Mol Genet.** v.22, n.19, p.3920-3930, 2013.
- PAN, S., CHAN, J.R. Regulation and dysregulation of axon infrastructure by myelinating glia. **J Cell Biol.** v.216, n.12, p.3903-3916. 2017. Review.
- PEPPER, R.E.; PITMAN, K.A.; CULLEN, C.L.; YOUNG, K.M. How Do Cells of the Oligodendrocyte Lineage Affect Neuronal Circuits to Influence Motor Function, Memory and Mood? **Front. Cell. Neurosci.** v.12, n.399, 2018.
- PÉREZ-CERDÁ, F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; MATUTE, C. Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. **Front. Neuroanat.** v9, n.92, 2015.
- PETRYNIAK, M. A.; POTTER, G. B.; ROWITCH, D. H.; RUBENSTEIN, J. L. Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. **Neuron.** v. 55, p.417-433, 2007.
- PEVNY, L.H.; SOCKANATHAN, S.; PLACZEK, M.; LOVELL-BADGE, R. A role for SOX1 in neural determination. **Development.** v.125, n.10, p. 1967-1978, 1998.
- PHILIPS, T., ROTHSTEIN, J.D. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. **J Clin Invest.** v.127, n.9, p. 3271-3280. 2017. Review.
- RAFF, M.C.; MILLER, R.H.; NOBLE, M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. **Nature**, v.303, p.390-396, 1983.
- RICHARDSON, W.D.; KESSARIS, N.; PRINGLE, N. Oligodendrocyte wars. **Nat Rev Neurosci.** n.1, p.11-18, 2006. Review.

ROWITCH, D. H.; KRIEGSTEIN, A. R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. **Nature**; v. 468; n. 7321, p.214-222, 2010.

ROY, N. S., WANG, S., HARRISON-RESTELLI, C., BENRAISS, A., FRASER, R. A., GRAVEL, M., BRAUN, P. E. GOLDMAN, S. A. Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. **J. Neurosci.**, v. 19, p.9986-9995, 1999.

RUNGARUNLERT, S.; TECHAKUMPHU, M.; PIRITY, M.K.; DINNYES, A. Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. **World J. Stem Cells**.v.1, n.1.p.11-21, 2009.

SEO, J.H.; MAKI, T; MAEDA, M.; MIYAMOTO, N.; LIANG, A.C.; HAYAKAWA, K.; PHAM, L.D.; SUWA, F.; TAGUCHI, A.; MATSUYAMA, T.; IHARA, M.; KIM, K.W.; LO, E.H.; ARAI, K. Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- β signaling. **PLoS One**. v.9, n.7, 2014

SHEN, S.; SANDOVAL, J.; SWISS, V. A.; LI, J.; DUPREE, J.; FRANKLIN, R.J.M.; CASACCIA-BONNEFIL, P. Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. **Nat.Neurosci.** v.11,p.1024-1034, 2008.

SCHMITT, S.; CASTELVETRI, L. C.; SIMONS, M. Metabolism and functions of lipids in myelin. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1851, p. 999-1005, 2015.

SEGAL B.M; COHEN J.A; ANTEL J. Americas Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis Forum 2017: Environmental factors, genetics, and epigenetics in MS susceptibility and clinical course. **Mult Scler**. v.24, n. 1, p.:4.-5, 2018.

SIMONS M.; NAVE K.A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. Cold Spring Harb **Perspect Biol** v. 8, n.1, p. 1-16, 2015. Review.

SILVA, R.B.M.; GREGGIO, S.; VENTURIN, G.T, DA COSTA, J.C.; GOMEZ, M.V.; CAMPOS, M.M. Beneficial Effects of the Calcium Channel Blocker CTK 01512-2 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol**. v.55, n.12, p.:9307-9327, 2018.

SKAPER, S.D. Oligodendrocyte precursor cells as a therapeutic target for demyelinating diseases. **Prog Brain Res**. v.245, p.119-144, 2019.

STERN, J.N.; YAAR, I G.; VANDER HEIDEN, J.A.; CHURCH, G.; DONAHUE, W.F.; HINTZEN, R.Q.; HUTTNER, A.J.; LAMAN, J.D.; NAGRA, R.M.; NYLANDER, A, PITT, D.; RAMANAN, S.; SIDDIQUI, B.A.; VIGNEAULT, F., KLEINSTEIN, S.H.; HAFLER, D.A, O'CONNOR, K.C. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. **Sci. Transl. Med**.v.6, n.248, 2014.

SUKOYAN, M.A.; KERKIS, A.Y.; MELLO, M.R.; KERKIS, I.E.; VISINTIN, J.A.; 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.535-542, 2002.

SULLIVAN, G.M.; MIERZWA, A.J.; KIJPASALRATANA, N.; TANG, H.; WANG, Y., SONG, S.-K.; SELWYN, R.; ARMSTRONG, R.C. Oligodendrocyte lineage and subventricular zone response to traumatic axonal injury in the corpus callosum. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v.72, p.1106-1125, 2013.

TAKEBAYASHI, H.; NABESHIMA, Y.; YOSHIDA, S.; CHISAKA, O.; IKENAKA, K.; NABESHIMA, Y. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. **Curr Biol.** v.12, n.13, p.1157-1163, 2002.

THORBURNE, S. K.; JUURLINK, B. H. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. **J. Neurochem.** v.67, p.1014-1022, 1996.

TOGNATTA, R.; MILLER, R.H. Contribution of the oligodendrocyte lineage to CNS repair and neurodegenerative pathologies. **Neuropharmacology.** v.110, p.539-547, 2016.

TOKUMOTO, Y.; OGAWA, S.; NAGAMUNE, T.; MIYAKE J., Comparison of efficiency of terminal differentiation of oligodendrocytes from induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells in vitro. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v. 109; n. 6, p.622-628, 2010.

WALDMAN, A.T., **Continuum** (Minneap Minn). v. 24, n.1, p.130-149, 2018.

WANG, S.; BATES, J.; LI, X.; SCHANZ, S.; CHANDLER-MILITELLO, D.; LEVINE, C.; MAHERALI, N.; STUDER, L.; HOCHEDLINGER, K.; WINDREM, M.; GOLDMAN, S.A. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. **Cell Stem Cell.** v.12, n.2, p.252-264, 2013.

WAUBANT, E.; LUCAS, R.; MOWRY, E.; GRAVES, J.; OLSSON, T.; ALFREDSSON, L.; LANGER-GOULD, A.; Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. **Ann Clin Transl Neurol.** 2019. Review.

WIESE, C.; ROLLETSCHEK, A.; KANIA, G.; BLYSZCZUK, P.; TARASOV, K.V.; TARASOVA, Y.; WERSTO, R.P.; BOHELER, K.R.; WOBUS, A.M. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, n19-20; p.2510-22, 2004.

WILSON, P.G.; STICE, S.S. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. **Stem Cell Rev.** p. 67-77; 2006.

YAMASHITA T., MIYAMOTO Y, BANDO Y. ONO T., KOBAYASHI S., DOI A., et al. Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from dissociated monolayer and feeder-free cultured pluripotent stem cells. **PLoS ONE** v12, n. 2, 2017.

YONG, V. W. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Contin. Lifelong Learn. Neurol.** v.10, p. 11-27, 2004.

YOUNG, N.P.; WEINSHENKER, B.G.; PARISI, J.E.; SCHEITHAUER, B.; GIANNINI, C.; ROEMER, S.F.; THOMSEN, K..M.; MANDREKAR, J.N., ERICKSON, B.J., LUCCHINETTI, C.F. Perivenous demyelination: association with clinically defined acute disseminated encephalomyelitis and comparison with pathologically confirmed multiple sclerosis. **Brain.** v.133, p.333-348, 2010.

ZAMBELLI, V.O.; FERNANDES, A.C.O.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, J.C.B.; PARADA, C.A.; MOCHLY-ROSEN, D.; CURY, Y.2014 Peripheral Sensitization Increases Opioid Receptor Expression and Activation by Crocophine in Rats. **Plos One**, v.9, n.3, p. 1-13, 2014.

ZHU, X., BERGLES, D.E, NISHIYAMA, A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. **Development.** n. 135, n.1, p.145-157, 2008

ZUCHERO, J. B.; BARRES, B.A.- Glia in mammalian development and disease. **Development**, v. 142, p. 3805-3809, 2015. Review

ZUCHERO, J. B.; BARRES, B. A. Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. **Curr. Opin. Neurobiol.** v.23, p.914-920, 2013.

