CAINÃ MAX COUTO DA SILVA

**PAPEL DA PROTEÍNA PRION CELULAR E SEU
LIGANTE, STIP1, NA NEUROGÊNESE ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

Cainã Max Couto da Silva

**Papel da proteína prion celular e seu ligante, *stip1*, na
neurogênese adulta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes

Versão original

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Silva, Cainã Max Couto da.

Papel da proteína prion celular e seu ligante, stip1, na neurogênese adulta / Cainã Max Couto da Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia de células-tronco/progenitoras neurais - neurogênese adulta.

Versão do título para o inglês: Role of cellular prion protein and its ligand, stip1, in the adult neurogenesis.

1. Neurobiologia 2. Doença de príon 3. Células-tronco 4. Neurônios
5. Ventrículos cerebrais 6. Olfato I. Lopes, Profa. Dra. Marilene
Hohmuth II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Tecidual III. Título.

ICB/SBIB016/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cainã Max Couto da Silva.

Título da Dissertação: Papel da proteína prion celular e seu ligante, *stip1*, na neurogênese adulta.

Orientador(a): Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **016** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Marilene Hohmuth Lopes**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel da interação entre a Proteína Prion e Stress inducible Protein 1 na Auto-Renovação in vitro de precursores neurais de Encefalo adulto*" do qual participam o(s) aluno(s) **Cainã Max Couto da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **05.06.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 11 de junho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEUA.105/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 016/13/CEUA, aprovado em 05.06.13 e por solicitação da Profa. Dra. **Marilene Hohmuth Lopes**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de 80 animais (camundongos) ao Projeto de Pesquisa "*Papel da interação entre a Proteína Prion e Stress inducible Protein 1 na Auto-Renovação in vitro de precursores neurais de Encefalo adulto*" uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 16 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Dedico este trabalho à pessoa que mais me ajudou no decorrer do meu mestrado, em todas as formas e maneiras possíveis, a qual tenho e sempre terei total consideração, minha amiga, minha irmã, Magna Magalhães.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes, pela oportunidade, pela competente e excelente orientação neste projeto. Digo enfaticamente que o meu período em seu laboratório foi onde mais evoluí profissionalmente. Como seu aluno, participei de cursos, congressos, simpósios, discussões de artigos, e estágio no exterior. E gostaria muito de ter correspondido melhor às suas expectativas.

Ao corpo docente da minha graduação em Ciências Biológicas na Universidade Guarulhos, pois sem eles não estaria aqui hoje, e ao corpo docente e discente da Universidade de São Paulo, pois conheci excelentes professores e amigos que fizeram a diferença no meu tempo de mestrado na USP, proporcionando meu crescimento científico, social e intelectual.

À minha família, meu pai Márcio Silva e a Jéssica Ávila, e à minha mãe Porancy Oliveira, pelo cuidado, apoio, amor e carinho comigo. Pelas críticas e pelos conselhos.

À minha filha, Sophia Couto, pela compreensão, carinho, e pelas divertidas horas jogando videogame e andando de bicicleta juntos.

Aos meus amigos (as) de infância, que fiz ao decorrer do curso, e em no meu departamento de pós-graduação, que compartilharam bons momentos comigo, e que foram cruciais para o meu desenvolvimento e melhora de saúde. Destaco em especial a minha melhor amiga e irmã, a qual dedico orgulhosamente este trabalho, M e. Magna Magalhães, pelo apoio imensurável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agência de fomento que financiou minha pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

“Em uma instituição de ensino, professores, alunos e funcionários não podem pensar que são uma ilha de sapiência ou privilegiados, isolados da sociedade. Muito pelo contrário. Devemos entender que o trabalho de cada um reflete em toda a sociedade, pois o saber produzido ou transmitido deve ser responsável pelo progresso da comunidade. Ou seja, o conhecimento deve priorizar; antes de tudo, uma responsabilidade social”.

David Pereira Neves

RESUMO

SILVA, C. M. C. **Papel da proteína prion celular e seu ligante, stip1, na neurogênese adulta.** 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A neurogênese adulta em mamíferos consiste em um importante mecanismo para reposição neuronal e diversas funções cognitivas. A zona ventricular-subventricular (V-SVZ) é um dos nichos neurogênicos melhor descrito na literatura. A V-SVZ abriga células-tronco/progenitoras neurais adultas (adNSPCs) que originam neuroblastos, e estes migram para o bulbo olfatório através da via migratória rostral (RMS) para participar da olfação. Neurônios recém-formados expressam uma concentração elevada da proteína prion celular (PrP^C), uma glicoproteína de membrana que atua como receptora para diversas moléculas. PrP^C desempenha diversas funções no sistema nervoso central (SNC), destacando-se a promoção da autorrenovação, proliferação e diferenciação de NSPCs durante o desenvolvimento embrionário e na fase pós-natal adulta. Dentre seus ligantes, PrP^C interage com a co-chaperona STIP1 para promover a autorrenovação de NSPCs durante a fase embrionária, porém ainda não se conhece o papel desta interação proteica na neurogênese adulta. A fim de avaliar o papel de PrP^C e STIP1 na neurogênese adulta do nicho V-SVZ, foram adotadas diferentes abordagens *in vitro*. Ensaio de formação de neuroesferas derivadas da V-SVZ de camundongos adultos, tipo-selvagem (*Prnp*^{+/+}) ou deficientes para PrP^C (*Prnp*^{-/-}), foram adotados e, as neuroesferas geradas, foram dissociadas ou utilizadas diretamente no tratamento com STIP1 recombinante para análise da autorrenovação, proliferação e migração celular. A cultura celular de adNSPCs em suspensão (*i.e.* neuroesferas) foi padronizada e caracterizada, bem como sua cultura em monocamada sobre laminina. A multipotência das células foi confirmada através do uso de marcadores específicos para células-tronco/progenitores neurais, astrócitos, neurônios ou oligodendrócitos. Os ensaios de autorrenovação e proliferação celular confirmaram o papel de PrP^C na neurogênese adulta, previamente descrito na literatura, e o ensaio de migração celular apontou um achado inédito de sua participação na migração de adNSPCs. Não foi observada quaisquer influências de STIP1 recombinante nos processos celulares aqui avaliados. Interessantemente, a laminina utilizada no ensaio de migração é altamente expressa na RMS e corresponde a um ligante específico de PrP^C. Deste modo, estes achados abrem rumo para novas perspectivas de estudo da interação PrP^C-laminina na neurogênese adulta no nicho da V-SVZ. Estudos adicionais que visam a melhor compreensão dos mecanismos que medeiam a neurogênese adulta são necessários para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos no tratamento de distúrbios neurológicos.

Palavras-chave: Proteína prion. PrP^C. Chaperona. STIP1. Precursores neurais. NSPCs.

ABSTRACT

SILVA, C. M. C. **Role of cellular prion protein and its ligand, stip1, in the adult neurogenesis.** 2016. 69 p. Master thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Mammalian adult neurogenesis consists in an important mechanism for neuronal replacement and several cognitive functions. Ventricular-subventricular zone (V-SVZ) is the best-described neurogenic niche in the literature. V-SVZ harbors adult neural stem/progenitor cells (adNSPCs) that give rise neuroblasts, which migrate to olfactory bulb through rostral migratory stream (RMS) in order to participate of olfaction. Newborn neurons express a high concentration of cellular prion protein (PrP^C), a membrane glycoprotein that acts as a receptor to many different molecules. PrP^C has several functions in the central nervous system (CNS), especially inducing self-renewal, proliferation, and differentiation of NSPC during embryonic development and adult postnatal period. Among its ligands, PrP^C interacts with STIP1 co-chaperone to promote NSPC self-renewal during embryonic stage, but the role of this interaction in the adult neurogenesis remains unknown. In order to assess whether PrP^C and STIP1 play a role in adult neurogenesis from V-SVZ, different approaches *in vitro* have been performed. Neurosphere-formation assays derived of V-SVZ from wild-type (*Prnp*^{+/+}) and knockout (*Prnp*^{-/-}) adult mice were carried out, and the formed-neurospheres were dissociated or used directly to analyze self-renewal, proliferation and cell migration in the presence of recombinant STIP1. Primary cell culture of adNSPCs grown in suspension (*i.e.* neurospheres) was standardized and characterized as well as monolayer culture on laminin. Multipotency of the cells has been confirmed through expression of specific cell markers for neural stem/progenitor cells, astrocytes, neurons, and oligodendrocytes. Self-renewal and cell proliferation assays have confirmed the role of PrP^C in adult neurogenesis, previously described in the literature, and migration cell assay pointed out an unprecedented finding of its participation in adNSPCs migration. There was no impact of recombinant STIP1 in the cellular processes evaluated here. Interestingly, laminin used in the migration assay is highly expressed on RMS and corresponds to a specific PrP^C ligand. Therefore, these findings may open new avenues to studies aiming the role of PrP^C-laminin interaction in adult neurogenesis from V-SVZ niche. Additional studies aimed to better understanding the mechanisms that mediate adult neurogenesis are required for the establishment of new therapeutic targets in the treatment of neurological disorders.

Keywords: Prion protein. PrP^C. Chaperone. STIP1. Neural precursors. NSPCs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Relação entre a perda e reposição de neurônios no cérebro adulto.	26
Figura 2 – Esquema dos diferentes domínios das células B1 dentro da V-SVZ adulta.	29
Figura 3 – Ensaio de formação de neuroesferas.	39
Figura 4 – Estereomicroscópio.	40
Figura 5 – V-SVZ murina.	40
Figura 6 – Caracterização da cultura celular de adNSPCs da V-SVZ.	45
Figura 7 – Expressão de PrP ^C e STIP1.	46
Figura 8 – Multipotência das adNSPCs derivadas da V-SVZ.	48
Figura 9 – PrP ^C promove a autorrenovação de adNSPCs provenientes da V-SVZ.	49
Figura 10 – PrP ^C promove a proliferação de adNSPCs proveniente da V-SVZ.	50
Figura 11 – PrP ^C promove a migração de adNSPCs.	51
Figura 12 – Perspectivas de estudo para PrP ^C na neurogênese adulta.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
adNPC	<i>Adult Neural Progenitor Cell</i> – Célula progenitora neural adulta
adNSC	<i>Adult Neural Stem Cell</i> – Célula-tronco neural adulta
adNSPC	<i>Adult Neural Stem/Progenitor Cell</i> – Célula-tronco/progenitora neural adulta
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> – Fator de crescimento de fibroblasto básico
BFS	<i>Bovine Fetal Serum</i> – Soro fetal bovino
BrdU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> – Bromodeoxiuridina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina do soro bovino
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> – Encefalopatia espongiforme bovina
BV	<i>Blood Vessel</i> – Vaso sanguíneo
Cat. No.	<i>Catalogue number</i> – Número de catálogo (referência)
cDNA	<i>Complementary Desoxyribunucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cf.	Confira, confronte.
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> – Líquido (fluído) cerebrospinal
Cx	Áreas corticais
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCX	<i>Doublecortin</i>
DG	<i>Dentate Gyrus</i> – Giro denteado
DGC	<i>Dentate granule cell</i> – Célula granular denteada
DP1	Domínio 1 rico em aspartato e prolina da proteína STIP1
DP2	Domínio 2 rico em aspartato e prolina da proteína STIP1
E	<i>Ependimary cells</i> – Células endodimárias
e.g.	<i>Exempli gratia</i> – Por exemplo
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> – Fator de crescimento epidermal
fCJD	<i>Familial Creutzfeldt-Jakob Disease</i> – Doença familiar de Creutzfeldt-Jakob
GPI	<i>Glycosyl-phosphatidylinositol</i> – Glicosil fosfatidil inositol
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> – Proteína glial fibrilar ácida
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> – Solução salina balanceada de Hank

Hop	<i>Hsp70/Hsp90 Organizing Protein</i> – Proteína organizadora das proteínas de choque térmico de 70 e 90 kDa
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i> – Proteína de choque térmico
Hsp70	<i>Heat Shock Protein of 70 kDa</i> – Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp90	<i>Heat Shock Protein of 90 kDa</i> – Proteína de choque térmico de 90 kDa
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> – Isto é
iCJD	<i>Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease</i> – Doença iatrogênica de Creutzfeldt-Jakob
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> – Fator de crescimento semelhante à insulina
IPC	<i>Intermediate Progenitor Cell</i> – Célula progenitora intermediária
IPC ₁	<i>Intermediate Progenitor Cell 1</i> – Célula progenitora intermediária 1
IPC ₂	<i>Intermediate Progenitor Cell 2</i> – Célula progenitora intermediária 2
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> – Célula-tronco de pluripotência induzida
kDa	kiloDalton
Ln	<i>Laminin</i> – Laminina
LTM	<i>Long-term Memory</i> – Memória de longa duração
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinases</i> – Proteína cinase ativada por mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> – Ácido ribonucleico mensageiro
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> – Molécula de adesão da célula neural
NeuN	<i>Neuronal Nuclear Antigen</i> – Antígeno nuclear neuronal
<i>No prelo</i>	Não impresso
NPC	<i>Neural Progenitor Cell</i> – Célula progenitora neural
NSA	<i>Neurosphere Assay</i> – Ensaio de formação de neuroesferas
NSC	<i>Neural Stem Cell</i> – Célula-tronco neural
NSP	<i>Neurosphere</i> – Neuroesfera
NSPC	<i>Neural Stem/Progenitor Cell</i> – Célula-tronco/progenitora neural
OB	<i>Olfactory Bulb</i> – Bulbo olfatório
OPC	<i>Oligodendrocyte Precursor Cell</i> – Célula precursora de oligodendrócito
pb	Pares de Bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Solução salina tamponada com fosfato
PKA	<i>Protein Kinase A</i> ou <i>Cyclic AMP-dependent Protein Kinase</i> – Proteína cinase A ou Proteína cinase dependente de AMP cíclico
<i>Prnp</i> ^{-/-}	Animal deficiente para a proteína prion gerado por Büeler et al. (1992)

<i>Prnp</i> ^{+/+}	Animal controle do <i>Prnp</i> ^{-/-}
PrP	Proteína Prion
PrP ^C	Proteína Prion Celular
PrP ^{SC}	Proteína Prion Scrapie
RA	<i>Retinoic acid</i> – Ácido retinoico
RMS	<i>Rostral Migratory Stream</i> – Via migratória rostral
sCJD	<i>Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease</i> – Doença esporádica de Creutzfeldt-Jakob
SCZ	Subcallosal Zone – Zona subcalosa
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Dodecil sulfato de sódio
SGZ	<i>Subgranular Zone</i> – Zona subgranular
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
STIP1	<i>Stress-inducible phosphoprotein 1</i> – Fosfoproteína induzida pelo estresse 1
STM	<i>Short-term memory</i> - Memória de curto prazo
SVZ	<i>Ventricular zone</i> – Zona subventricular
TAC	<i>Transient Amplifying Cell</i> – Célula amplificadora transiente
TPR	<i>Tetratricopeptide Repeat</i> – <i>Tetratricopeptídeo repetido</i>
TSE	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathy</i> – Encefalopatia espongiforme transmissível
USP	Universidade de São Paulo
V	Ventrículo
vCJD	<i>Variant Creutzfeldt-Jakob Disease</i> – Nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob
Vn	<i>Vitronectin</i> – Vitronectina
V-SVZ	<i>Ventricular-subventricular Zone</i> – Zona ventricular-subventricular
VZ-SVZ	<i>Ventricular Zone-subventricular Zone</i> – Zona ventricular-zona subventricular

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
M	Molar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Neurogênese no Cérebro Adulto	20
2.1.1	Breve histórico	20
2.1.2	Nichos neurogênicos	22
2.1.2.1	<i>Nichos canônicos e não canônicos</i>	22
2.1.2.2	<i>Células-tronco/progenitoras neurais</i>	23
2.1.2.3	<i>Zona ventricular-subventricular</i>	27
2.1.3	Ensaio de formação de neuroesferas	30
2.2	Proteína Prion	31
2.2.1	Breve histórico	31
2.2.2	Prion sob perspectiva fisiológica	33
2.3	Proteína Stress-inducible Phosphoprotein 1	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Reagentes	37
4.2	Animais	37
4.3	Ensaio de Formação de Neuroesferas	38
4.4	Passagem e manutenção das Neuroesferas em cultura	41
4.5	Cultura Celular em Monocamada	41
4.6	Ensaio de Autorrenovação Celular	41
4.7	Ensaio de Proliferação Celular	42
4.8	Ensaio de Migração Celular	42
4.9	Ensaio de Imunofluorescência	42
4.10	Análise Estatística	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Padronização e Caracterização da Cultura Celular	44
5.2	Pr^{PC} Aumenta a Autorrenovação de adNPCs	47
5.3	Pr^{PC} Promove a Migração de adNPCs	50

6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A neurogênese adulta consiste em um mecanismo importante para reposição de neurônios perdidos e diversas funções cognitivas, como o aprendizado e memória. Sumarizando, as etapas que compreendem a neurogênese adulta correspondem à autorrenovação, proliferação e diferenciação de células-tronco/progenitoras neurais (NSPCs), bem como a migração, maturação e integração funcional dos neurônios recém-formados (TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014; VADODARIA; GAGE, 2014). A zona ventricular-subventricular (V-SVZ, do inglês, ventricular-subventricular zone) é um dos mais bem estudados nichos neurogênicos no cérebro de mamíferos adultos. Nela, estão abrigados células-tronco/progenitores adultas (adNSPCs) que originam neuroblastos, e estes migram para o bulbo olfatório (OB, do inglês, olfactory bulb) através da via migratória rostral (RMS, do inglês, rostral migratory stream), onde se diferenciam em interneurônios que participam do processamento olfatório (TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014). Esse processo é controlado por sinais mediados pela interação célula-célula e fatores externos, como, por exemplo, fatores de crescimento (FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012). A proteína prion celular (PrP^C) tem sido estudada por desempenhar um papel importante no contexto da neurogênese adulta (LOPES; SANTOS, 2012; PRODOMIDOU et al., 2014).

A PrP^C consiste em um glicoproteína de membrana altamente expressa no sistema nervoso central (SNC), sobretudo em neurônios recém-formados e amplamente conservada no decorrer da evolução, e que funciona como um receptor para diversas moléculas, desencadeando diferentes sinais intracelulares (GABRIEL et al., 1992; LINDEN et al., 2008; STEELE et al., 2006). Embora seja comumente associada à sua isoforma patogênica (PrP^{Sc}), agente etiológico das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), a PrP^C tem-se mostrado crucial em várias etapas da neurogênese adulta e embrionária: autorrenovação, proliferação e diferenciação de NPCs (PRODOMIDOU et al., 2014; SANTOS et al., 2011; STEELE et al., 2006). O grupo de estudo coordenado pela Dra. Vilma Martins no AC Camargo Cancer Center, em colaboração com outras instituições (e.g. Instituto de Ciências Biomédicas – USP), têm investigado o papel da PrP tanto no contexto patológico quanto fisiológico. Assim, os mesmos determinaram três ligantes desta proteína: vitronectina (Vn) (HAJJ et al., 2007), laminina (Ln) (GRANER et al., 2000a; GRANER et al., 2000b) e stress-inducible phosphoprotein one (STIP1) (MARTINS et al., 1997; ZANATA et al., 2002). A vitronectina, ao interagir com a PrP^C, promove axonogênese no sistema nervoso

periférico (SNP) (HAJJ et al., 2007), enquanto que a interação entre PrP^C-Ln medeia neuritogênese, manutenção dos neuritos formados (GRANER et al., 2000a; GRANER et al., 2000b) e, ainda, retenção da memória de curto prazo e consolidação da memória de longo prazo, processos estes que requerem as vias clássicas de sinalização PKA/MAPK (COITINHO et al., 2006). O terceiro receptor/ligante descoberto pelo princípio da hidropaticidade complementar¹ (MARTINS et al., 1997) e identificado/caracterizado por ZANATA et al. (2002), STIP1, consiste em uma co-chaperona que modula a atividade das proteínas de choque térmico de 70 e 90kDa (SONG; MASISON, 2005). Esta, quando associada à PrP^C (complexo PrP^C-STIP1), medeia neuritogênese e neuroproteção *in vitro* (LOPES et al., 2005; SAKUDO et al., 2005), retenção da memória de curta duração (STM), consolidação da memória de longa duração (LTM) (COITINHO et al., 2007) e, destacando-se para este projeto, aumento na autorrenovação de NPCs fetais (SANTOS et al., 2011). Neste projeto, objetivou-se responder se a função previamente estabelecida de PrP^C na neurogênese adulta é determinada por sua interação com STIP1, uma vez que na fase embrionária a interação entre ambas as proteínas promove a autorrenovação e proliferação de NPCs. Especificamente, investigou-se o papel do complexo PrP^C-STIP1 na autorrenovação, proliferação e migração de células-tronco/progenitoras neurais adultas provenientes da V-SVZ (adNPCs). Este estudo propiciará uma melhor compreensão da biologia de adNSCs e dos mecanismos que medeiam a neurogênese e plasticidade neuronal no cérebro adulto, bem como a abertura de novas perspectivas.

¹**Hidropaticidade complementar:** Técnica de biologia molecular utilizada no estudo de aminoácidos que propõe que peptídeos codificados por fitas de cDNA são capazes de interagir entre si (Cf. BRENTANI, 1988).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neurogênese no Cérebro Adulto

2.1.1 Breve histórico

A neurogênese pós-natal² foi, por muitas vezes, desacreditada. No passado, era de consenso comum e universal a ideia de que novos neurônios não são formados no cérebro adulto. Este dogma persistiu por meio século, sendo assegurado por grandes cientistas da época, tais como Koelliker, His e Cajal. Ramón y Cajal, considerado o pai da neurociência moderna, foi agraciado juntamente com Camillo Golgi com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1906, pelos diversos estudos sobre estrutura e função do sistema nervoso central (SNC). Durante os estudos realizados por estes cientistas, nenhuma figura mitótica ou estágio do desenvolvimento de neurônios foi observada no cérebro adulto, fazendo com que Cajal e colegas chegassem à conclusão de que a estrutura cerebral permanecesse fixa e imutável (CAJAL 1928 apud³ GROSS, 2000; GROSS, 2000; LEAL, 2009).

As primeiras descobertas relatando a neurogênese no encéfalo adulto surgiram a partir dos anos 60, porém apenas na década de 90, com o acúmulo de evidências relacionadas à plasticidade neural, a mesma tornou-se aceita pela comunidade científica. Na década de 60, Joseph Altman verificou a presença de pequenas células granulares mitoticamente ativas no giro dentado do hipocampo, bem como de neurônios recém-formados na zona subependimal (atualmente denominada de zona ventricular-subventricular) e no neocórtex de mamíferos jovens e adultos, através do uso de timidina radioativa (tritium, 3-H); a estes neurônios Altman denominou de “microneurônios” (Altman, 1962; Altman & Das, 1965). Na década de 70, Michael Kaplan e Hinds (1977) identificaram, também, através da microscopia eletrônica e autorradiografia, neurônios mitóticos (positivos para 3H-timidina) no hipocampo e bulbo olfatório de roedores adultos, relatando a sinalização destes por sinapses de neurônios vizinhos, confirmando assim os achados de Altman. Na década seguinte, Fernando Nottebohm e Goldman (1983) relataram a neurogênese no cérebro adulto de canários. Para tanto, os mesmos injetaram testosterona em canários fêmeas, o que induziu ao canto semelhante ao de canários machos. Demonstraram dessa forma, também através da injeção de 3H-timidina, microscopia eletrônica e eletrofisiologia, que esta modificação ocorreu pela

²**Neurogênese adulta:** Conjunto inteiro de eventos que levam à produção de novos neurônios no cérebro adulto, da divisão celular do precursor à sobrevivência neuronal funcionalmente integrada (LLEDO et al., 2006).

³RAMÓN y CAJAL, S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System, 1928.

hipertrofia dos núcleos vocais, que, por sua vez, ocorreu pela adição de novos neurônios nesta região (GOLDMAN; NOTTEBOM, 1983).

De fato, houve muita resistência ao dogma proposto por Cajal e seus colegas. Pode-se citar a resistência aos trabalhos publicados pelos cientistas pioneiros acima citados. As dimensões das células mitóticas descritas por Altman e Das (1965) eram parecidas com gliócitos e, pela inexistência de técnicas que comprovassem a diferenciação entre estes tipos neuronais, a comunidade científica não deu o merecido crédito aos trabalhos de Altman. Outro fator que também influenciou na rejeição das observações de Altman foi a baixa credibilidade do pesquisador, na época pós-doutorando que trabalhava por conta própria (GROSS, 2000; SILVA, 2009). Nos trabalhos de Kaplan, os demais cientistas questionaram os critérios ultraestruturais utilizados e, alguns, propuseram a possibilidade de que células gliais pudessem também receber sinapses e que a incorporação por timidina radioativa durante o processo de reparo do DNA poderia comprometer a hipótese do pesquisador. As observações de Nottebohm e Goldman foram irrefutáveis, porém foram aceitas apenas para o cérebro adulto de canários, mas não de mamíferos (LEAL, 2009). Todos estes achados tiveram maiores repercussões a partir da década de 90, quando Reynolds e Weiss (1992) conseguiram isolar e manter em cultura células-tronco neurais provenientes do cérebro adulto de mamíferos, verificando que as mesmas dão origem a neurônios e astrócitos, e quando Eriksson e colaboradores (1998), no laboratório do renomado professor contemporâneo Fred Gage, demonstrou pela primeira vez a neurogênese adulta em humanos, por meio de técnicas mais avançadas que surgiram na época. Nas décadas de 60, 70 e 80 os estudos pioneiros relatando a ocorrência da neurogênese foram realizados, principalmente, devido à introdução da autorradiografia com [3H]-timidina, porém a falta de técnicas eficazes para comprovação da neurogênese no cérebro adulto impediu tal aceitação. A partir dos anos 90, surgiram novas técnicas que possibilitaram a comprovação dos estudos anteriormente realizados, e a produção em larga escala de novas pesquisas. Os principais avanços científicos que propiciaram a comprovação da neurogênese no cérebro adulto, foram a introdução da molécula de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) e de marcadores celulares específicos. A BrdU é um análogo sintético da timidina e, portanto, incorpora-se às células em proliferação (fase S da mitose), podendo ser visualizada por técnicas imunocitoquímicas, não requerendo autorradiografia. Os marcadores celulares possibilitaram a identificação específica de novas células geradas, por meio da imuno-histoquímica (HERCULANO-HOUZEL, 2012; MENDEZ-OTERO et al., 2005).

Estes estudos pioneiros propiciaram uma gama de pesquisas que evidenciaram, irrefutavelmente, a neurogênese adulta em mamíferos, e abriram portas para a compreensão de um importante mecanismo fisiológico e inúmeras possibilidades de alvos terapêuticos (GAGE; TEMPLE, 2013; GROSS, 2000; ZHAO; DENG; GAGE, 2008).

2.1.2 Nichos neurogênicos

2.1.2.1 Nichos canônicos e não canônicos

O local, ambiente, onde novos neurônios são gerados, são conhecidos como sítios, nichos⁴, zonas ou regiões neurogênicas. Embora a ocorrência da neurogênese foi verificada tanto no cérebro de vertebrados (incluindo elasmobrânquios, teleósteos, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos), quanto no cérebro de invertebrados (e.g. insetos e crustáceos), dentro do grupo dos vertebrados, a mesma permanece restrita à algumas regiões (DERBY, 2007; PAREDES et al., 2015). Interessantemente, as células neurais de insetos, peixes e anfíbios podem se dividir normalmente ao decorrer da vida destes animais (GAGE, 2002). Estudos convincentes demonstraram a ocorrência da neurogênese em dois principais sítios neurogênicos: a zona ventricular-subventricular (V-SVZ, do inglês, ventricular-subventricular zone) (DOETSCH et al., 1999; IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011), que consiste na camada superficial das paredes laterais dos ventrículos laterais, e a zona subgranular (SGZ, do inglês, subgranular zone), localizada no giro dentado (DG, do inglês, dentate gyrus) do hipocampo (SERI et al., 2001). Outras áreas com potencial neurogênico descobertas recentemente consistem no hipotálamo e no corpo estriado (CHENG, 2013; ERNST et al., 2014; INTA; CAMERON; GASS, 2015; KOKOEVA et al., 2007; PAŁASZ; WIADERKIEWICZ, 2014; ROJCZYK-GOŁĘBIEWSKA). Desde que Kokoeva et al. (2007) relataram a neurogênese no hipotálamo, este evento tem sido intensamente investigado e promete grandes investimentos na pesquisa. Pode-se citar, por exemplo, achados recentes que correlacionam a neurogênese hipotalâmica com diabetes, por afetar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BACHOR; SUBURO, 2012; LEE; BLACKSHAW, 2012). A neurogênese adulta no corpo estriado foi publicada originalmente cerca de dois anos atrás, sendo verificada em seres humanos através de abordagens histológicas e por datação de carbono-14 (ERNST et al., 2014). Além destes sítios, que são mais bem aceitos na literatura, outros possíveis sítios foram também

⁴**Nichos neurogênicos:** Compreende-se por nichos, microambientes que abrigam, anatomicamente, células-tronco e controlam seu desenvolvimento *in vivo*. Células-tronco com potencial neurogênico estão presentes nos nichos neurogênicos (LLEDO et al., 2006; MING; SONG, 2011).

relatados: a zona subcalosa (SCZ, do inglês, subcallosal zone) (SERI et al., 2006) e o cerebelo – limite da camada granular interna com a substância branca (LEE et al., 2005) – embora estes permaneçam ainda suspeitos quanto às características das células-tronco neurais neles presentes (NSCs, do inglês, neural stem cells) (SANTOS et al., 2010).

A ocorrência da neurogênese fora dos sítios neurogênicos canônicos acima citados, tem sido alvo de debate na comunidade científica (FELICIANO; BORDEY; BONFATI, 2015). Há alguns anos atrás, a ocorrência da neurogênese no córtex cerebral foi convincentemente refutada (KORNACK; RAKIC, 2001; RAKIC, 2004). Ainda assim, a neurogênese cortical já foi demonstrada antes mesmo dos trabalhos aqui citados que refutaram a mesma (GOULD et al., 1999). Song e colaboradores (2002) relaram outros trabalhos que identificaram células precursoras de neurônios em várias regiões do cérebro adulto, e não apenas nos sítios neurogênicos canônicos, e, ainda, que estas podem dar origem a neurônios tanto in vitro quanto in vivo após a enxertia de volta aos nichos neurogênicos. Interessantemente, Leker et al. (2007) verificaram que o bloqueio da proliferação celular na V-SVZ resulta em uma redução parcial dos novos neurônios gerados na área lesada, mas não em sua total ausência. Ainda, há poucos anos atrás, Sirko et al. (2009) relataram o córtex visual de rato após lesão como um potente sítio neurogênico. No entanto, a maioria dos neurônios encontrados fora dos nichos neurogênicos canônicos é recorrente de lesões no SNC. Considerando todos estes relatos e muitos outros não citados aqui, levanta-se a hipótese de que a neurogênese ocorre não apenas nos sítios neurogênicos canônicos, mas também em regiões não canônicas, porém, pelo fato da mesma ocorrer em raras ocasiões (geralmente após lesão), sua evidência é dificilmente monitorada e demonstrada (BELLENCHI et al., 2013). Cabe ressaltar que a ocorrência da neurogênese nas variadas regiões não-canônicas foi observada em casos de lesão induzida e, portanto, não é incorreto designá-las como “não-canônicas” (FELICIANO; BORDEY; BONFATI, 2015).

2.1.2.2 Células-tronco/progenitoras neurais

Os nichos neurogênicos são conhecidos por abrigar células-tronco neurais (NSCs) e células progenitoras neurais (NPCs) responsáveis por gerar, constitutivamente, novos neurônios no cérebro adulto. NSCs e NPCs possuem um comportamento diferente e dificilmente são distinguíveis entre si fenotipicamente, e por isso serão aqui “agrupadas” e denominadas de células-tronco/progenitoras neurais adultas, adNSPCs (do inglês, adult neural stem/progenitor cells), ou, simplesmente, precursores neurais. Em ordem cronológica,

adNSCs se dividem simetricamente ou assimetricamente, originando outras adNSCs e também adNPCs, que se dividem de forma mais elevada e estão comprometidas com a diferenciação nos principais tipos neurais do SNC: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (BELLENCHI et al., 2013; PLUCHINO et al., 2005). Na neurogênese, particularmente, adNSCs originam progenitores comprometidos com a linhagem neuronal e, estes se diferenciam em neuroblastos, migram para seu destino, e completam sua maturação e integração funcional no SNC.

Para uma melhor compreensão deste projeto é importante salientar as diferenças entre terminologias comumente utilizadas neste campo da ciência – célula-tronco⁵, precursor⁶ e progenitor⁷. Estes termos são por muitas vezes utilizados de forma errada e, por isso, geram confusões tanto para iniciantes como para veteranos na ciência (TAJBAKHSI, 2009). Conforme Sohur et al. (2006), e os Institutos Nacionais de Saúde (NIH, 2001), as células-tronco são definidas como células com capacidade de autorrenovação ilimitada, enquanto que as células precursoras/progenitoras possuem uma capacidade limitada de autorrenovação, além de estarem mais comprometidas com a diferenciação em linhagens restritas. Embora haja esta distinção, Sohur et al. (2006) e Lledo et al. (2006) utilizam o termo “célula precursora” para designar tanto as células-tronco quanto as células precursoras/progenitoras (NSPCs). Aqui, foi adotado o mesmo critério estabelecido por estes autores.

Células-tronco neurais adultas (adNSCs, do inglês, adult neural stem cells) são encontradas em regiões específicas no SNC, apresentando-se como multipotentes, são capazes de se diferenciarem nos principais tipos neurais do SNC: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (SOHUR et al., 2006). Originam-se, provavelmente, de células-tronco embrionárias primárias derivadas de células neuroepiteliais (MERKLE; ALVAREZ-BUYLLA, 2006). Elas exibem características ultraestruturais de astrócitos, bem como presença de marcadores astrogliais (DOETSCH, 2003; KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009). Interessantemente, os astrócitos funcionam não apenas como adNSCs, mas também como um nicho celular, uma vez que fornecem suporte estrutural e funcional que contribuem para a neurogênese (BELLENCHI et al., 2013). Ainda não existem marcadores específicos para adNSCs ou adNPCs (células progenitoras neurais, do inglês, adult neural progenitor cells), o que dificulta a pesquisa neste campo da ciência (PASTRANA et al.,

⁵**Célula-tronco:** Célula clonal com autorrenovação ilimitada e capacidade de diferenciação em outros tipos celulares.

⁶**Progenitor:** Célula mitótica com alta taxa de divisão celular e que retém a capacidade de se proliferar e originar células diferenciadas. No entanto, sua capacidade de autorrenovação é limitada (Adaptado de LLEDO et al., 2006).

⁷**Precursor:** Células-tronco neurais e todos os progenitores são genericamente referidos como células precursoras (LLEDO et al., 2006).

2011). Ainda, cabe ressaltar que a formação de novos neurônios depende exclusivamente de adNSPCs, uma vez que, em situação fisiológica, até hoje não foi verificado nenhuma ocorrência neurônios maduros que reentraram no ciclo celular (saíram da fase G0). De fato, pacientes com doença de Alzheimer apresentaram neurônios maduros em divisão celular, porém, que sofrem morte celular após a divisão, sendo essa uma das hipóteses atuais para patogênese desta doença (HERCULANO-HOUZEL, 2012; HERRUP; YANG, 2007).

Diversos estudos foram e estão sendo feitos sobre as moléculas e fatores que modulam a atividade das adNSCs. Alguns dos importantes fatores estimulantes que modulam a neurogênese no encéfalo adulto consistem no exercício físico voluntário, ambiente enriquecido e na interação social, fatores estes bem demonstrados por Diamond (2001), onde a mesma relatou que a combinação das condições sociais com o ambiente enriquecido é necessária para o efeito completo do enriquecimento, e por van Praag et al. (1999), que demonstraram que o exercício físico voluntário aumenta grandemente a taxa de proliferação enquanto que o ambiente enriquecido aumenta a sobrevivência dessas células. Interessantemente, o envolvimento do ambiente enriquecido no SNC já foi relatado há muito tempo por Spurzheim, em 1815, e por Charles Darwin, em 1874 (revisado por DIAMOND, 2001). Outro importante fator indutor da neurogênese consiste nas células gliais, onde astrócitos aumentam a taxa de diferenciação e proliferação de adNSCs, em seis e em duas vezes, respectivamente (SONG; STEVENS; GAGE, 2002). A figura 1 sumariza as principais condições que modulam a neurogênese no cérebro adulto, produto de uma gama de descobertas científicas (BELLENCHI, 2013).

Figura 1 – Relação entre a perda e reposição de neurônios no cérebro adulto. Várias condições podem pender a balança para a perda ou reposição neuronal no cérebro adulto. A neurogênese pode restaurar esse balanço. (Adaptado de BELLENCHI et al., 2013).

As funções dos novos neurônios formados na fase adulta são ainda alvos de pesquisa. Embora a neurogênese seja comumente associada apenas ao ponto de vista benéfico, cabe ressaltar que taxa da neurogênese adulta decaiu com o aumento da complexidade do cérebro (LLEDO *et al.*, 2006) e que cerca de metade dos neurônios formados, tanto na V-SVZ quanto na SGZ, entram em apoptose, ainda que o motivo desta ocorrência permaneça desconhecido (OKANO; SAWAMOTO, 2008). Como já mencionado, no cérebro de mamíferos, a neurogênese permanece restrita a algumas regiões (*e. g.* V-SVZ e SGZ). Por esse motivo, muitas das pesquisas realizadas focaram no estudo das funções dos neurônios recém-formados nas V-SVZ e SGZ (hipocampo), que consistem em nichos neurogênicos canônicos, onde, diariamente, são gerados milhares de novos neurônios de forma constitutiva (GAGE; TEMPLE, 2013; KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Estudos condicentes à V-SVZ serão abordados no próximo item.

2.1.2.3 Zona ventricular-subventricular

Este sítio neurogênico foi descrito primeiramente por Doetsch et al. (1999), cuja área compreende à zona subventricular (SVZ, do inglês, subventricular zone), conhecida antigamente como zona sub-ependimal. Não obstante, Ihrle e Alvarez-Buylla (2011) verificaram que adNSCs presentes neste nicho possuem processos que contatam o ventrículo, estando presentes, portanto, não apenas na zona subventricular, mas também na zona ventricular. Assim, os mesmos propuseram uma nova denominação para este sítio: ventricular zone-subventricular zone – VZ-SVZ, atualmente denominado apenas como ventricular-subventricular zone – V-SVZ (FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012; TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014). Embora esta terminologia não seja demasiadamente utilizada, foi adotada no presente projeto pela coerência da mesma.

Na V-SVZ estão abrigadas tanto células-tronco quanto progenitores neurais. As adNSCs presentes neste nicho são denominadas como células tipo B. São conhecidos pelo menos quatro sub-populações de células tipo B, GFAP+. Elas dão origem a células progenitoras transitórias, amplificadoras, denominadas de IPCs ou TACs (do inglês, intermediate progenitor cells ou transient amplifying cells, respectivamente), também denominadas de células tipo C. As IPCs (células tipo C), por sua vez, originam neuroblastos – as células tipo A – que migram para seu local de destino – OB (DOETSCH, 1999; FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012; IHRLE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; LIM; ALVAREZ-BUYLLA, 2014). No OB, os neuroblastos se diferenciam em interneurônios granulares e periglomerulares que apresentam intensa atividade de membrana quando comparado com os neurônios “antigos” provenientes do desenvolvimento embrionário, além de apresentarem maior plasticidade em resposta à privação sensorial (BRETON-PROVENCHER; SAGHATELYAN, 2012; LLEDO et al., 2006). A organização destas células na V-SVZ encontra-se ilustrada na figura 2.

Estudos anatômicos recentes dos dois principais sítios neurogênicos, V-SVZ e SGZ, estão sendo correlacionados com os fatores – interação célula-célula e fatores solúveis – que controlam o comportamento das adNSPCs (AIMONE et al., 2014; FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012). Em ambos os nichos neurogênicos, células endoteliais atuam promovendo a autorrenovação enquanto astrócitos induzem a diferenciação neuronal de adNSCs (LLEDO et al., 2006). Artigos e livros já realizaram um compilado dos principais fatores já conhecidos por modular o comportamento das adNSPCs (para revisão, cf. BELZUNG; WIGMORE, 2013; FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012;

MING; SONG, 2011; RAMASAMY et al., 2013; URBÁN; GUILLEMOT, 2014). Fuentealba et al. publicaram uma revisão bem completa da neurogênese adulta em ambos os nichos neurogênicos canônicos, segundo seu período de publicação, e propuseram a divisão destes dois sítios em três domínios: proximal, intermediário e distal, a fim de facilitar a compreensão dos mecanismos que influenciam o comportamento destas células, quer seja promovendo a proliferação, diferenciação ou quiescência das mesmas. A figura 2 sumariza os domínios e suas principais características quanto à estrutura e sinalização (FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012).

Os neurônios gerados na V-SVZ comumente migram para o OB através da via migratória rostral e desempenham, portanto, importantes funções na manutenção da integridade estrutural do OB (pela reposição de interneurônios mortos), no ajuste do processamento de informações, no aprendizado e na memória olfativa (BRETON-PROVENCHER; SAGHATELYAN, 2012; LAZARINI; LLEDO, 2011). Estima-se que 30.000 neuroblastos migram da V-SVZ para o OB, via RMS, diariamente (LLEDO et al., 2006). Estes, por sua vez, dão origem a sete tipos diferentes de interneurônios (granulares e periglomerulares) (BACHOR; SUBURO, 2012). O líquido cefalorraquidiano (CSF) e o batimento dos cílios das células endoteliais são conhecidos por orientar e direcionar os neuroblastos para o OB via RMS. Embora comumente associado apenas com o OB, os precursores da V-SVZ também geram neuroblastos que migram para áreas lesadas do cérebro, diferenciando-se em neurônios funcionais (BRANN; FIRESTEIN, 2014; YAMASHITA et al., 2006). Este achado corrobora com os achados de outros pesquisadores, que demonstraram que o número de neurônios aumenta em áreas lesadas do SNC (PARENT, 2003; XIONG; MAHMOOD; CHOPP, 2010), ainda que não seja suficiente para a reconstituição do tecido neuronal perdido (MENDEZ-OTERO, 2005; YAMASHITA et al., 2006).

Figura 2 – Esquema dos diferentes domínios das células B1 dentro da V-SVZ adulta. O painel superior esquerdo mostra um corte transversal do cérebro adulto de camundongo, demonstrando a localização da V-SVZ, onde a neurogênese na parede dos ventrículos laterais (V) continuam ao decorrer da vida. O painel abaixo mostra a composição celular da V-SVZ adulta e os domínios das células B1. adNSCs correspondem às células tipo B1 (em azul). Células B1 estão rodeadas por células endoteliais multi-ciliadas (E) formando uma estrutura com aspecto de cata-vento na superfície ventricular. Células B1 dão origem às IPCs (ou células C, em verde), que correspondem às células transitórias e amplificadoras que se dividem e geram neuroblastos (células tipo A, em vermelho). As células B1 retêm propriedades endoteliais, com um fino processo (contendo um cílio primário) que contata o ventrículo lateral (V) e um longo processo basal que culmina nos vasos sanguíneos (BV, em roxo). Portanto, as células B1 podem ser subdivididas em três domínios. O domínio I (proximal ou apical, em azul escuro) contém um cílio primário e está em contato direto com o líquido cerebrospinal (CSF); dentro deste domínio, células B1 podem acessar fatores solúveis dentro do CSF e moléculas sinalizadoras de células endoteliais vizinhas. O domínio II (intermediário, azul médio) está em estreita proximidade com IPCs, neuroblastos, terminações neuronais e outras células de suporte; interações célula-célula entre células B1 e sua progênie pode ocorrer dentro deste compartimento. O domínio III (distal, em azul claro) compreende um processo basal que culmina em um especializado “pé terminal” que contata o vaso sanguíneo; fatores provenientes do sangue e fatores derivados de células endoteliais podem atuar nas células B1 neste domínio (Adaptado de FUENTEALBA; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2012).

A neurogênese na V-SVZ possui um papel muito além de sua relação com o sistema do bulbo olfatório, dado os relatos de sua relevância no reparo de injúrias cerebrais. Deste modo, torna-se crucial uma plena compreensão dos fatores que modulam as adNSPCs deste nicho para explorar da melhor forma possível seu potencial terapêutico. Ainda, com o avanço científico e descoberta das iPSCs (do inglês, induced pluripotent stem cells), sendo possível reprogramar células somáticas adultas e torná-las células-tronco pluripotentes, aumentou intensamente a perspectiva de muitos pesquisadores (YAMANAKA, 2012). Este campo tem crescido bastante e pesquisas recentes, por exemplo, conseguiram estabelecer variados protocolos para reprogramação de fibroblastos adultos diretamente em neurônios funcionais, sem passar pela etapa da pluripotência (GRAF, 2011; HAN et al., 2012; HU et al., 2015; LI et al., 2015).

Apesar de muitos artigos terem realizado um levantamento bibliográfico dos principais fatores que controlam o comportamento de adNSPCs, nenhuma informação sobre o papel do complexo PrP^C-STIP1 foi relatada nestas revisões literárias. Nos tópicos 2.2 e 2.3, encontram-se informações destas proteínas e sua relação com a neurogênese adulta.

2.1.3 Ensaio de formação de neuroesferas

Na década de 90 surgiu o primeiro grande passo para a ampla aceitação da neurogênese adulta em mamíferos, previamente mostrada pelos cientistas citados no tópico 2.1.1. Os cientistas Reynolds e Weiss (1992) isolaram pela primeira vez adNSPCs da V-SVZ de mamíferos adultos e as cultivaram *in vitro*, sob influência dos fatores de crescimento EGF e bFGF. Nestas condições, cada célula individual se dividiu mantendo-se unidas e formando pequenos aglomerados celulares compostos por adNSPCs e capazes de se diferenciar em neurônios e astrócitos. Estes aglomerados foram posteriormente denominados de neuroesferas⁸ (NSP, do inglês, neurospheres). De fato, existem indícios de que EGF seja capaz de reverter (desdiferenciar) células progenitoras ao estado de células-tronco (GÖRITZ; FRISÉN, 2012).

Desde a descoberta do ensaio de formação de neuroesferas (NSA, do inglês, neurosphere-forming assay), descrito primeiramente por Reynolds e Weiss (1992), muitas pesquisas têm utilizado este ensaio para estudar a biologia de adNSCs *in vitro* (PASTRANA; SILVA-VARGAS; DOETSCH, 2011). No entanto, deve-se salientar que as neuroesferas são

⁸**Neuroesfera:** Agregado heterogêneo de células-tronco e progenitores neurais formados *in vitro*, sob exposição contínua aos agentes mitogênicos.

constituídas tanto por adNSCs quanto por adNPCs, constituindo uma população celular heterogênea (AHMED, 2009; GÖRITZ; FRISÉN, 2012; SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). Uma adNSC passa por diversas divisões assimétricas, dando origem a outras adNSCs e a progenitores, adNPCs, mais comprometidos com a diferenciação celular. Cada adNPCs, por sua vez, também se divide dando origem a outros progenitores, que, por sua vez, repetem o processo. Por fim, uma neuroesfera é constituída principalmente por adNPCs, apresentando uma pequena fração de adNSCs. Deste modo, pode-se afirmar que uma neuroesfera é constituída por “precursores neurais”, ou adNSPCs (LLEDO et al., 2006; SOHUR et al., 2006). Interessantemente, progenitores neurais também são capazes de originar neuroesferas, ainda que o tamanho destes seja mais limitado e com menor sobrevida (DOETSCH, 2011; JENSEN; PARMAR, 2006; PASTRANA; SILVA-VARGAS). Todavia, a ideia de que apenas adNSCs dão origem às NSPs permanece amplamente difundida e, por isso, muitos cuidados devem ser tomados nos ensaios que visam diferenciar células-tronco de progenitores neurais, uma vez que não existem marcadores específicos de células-tronco neurais e que os diferentes protocolos disponíveis na literatura dão margem a interpretações equivocadas (DOETSCH, 2011; GIL-PEROTÍN et al., 2013; MARSHALL; REYNOLDS; LAYWELL, 2007; PASTRANA; SILVA-VARGAS; REYNOLDS; RIETZE, 2005).

2.2 Proteína Prion

2.2.1 Breve histórico

No século XX, houve um surto de doenças denominadas de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs, do inglês, transmissible spongiform encephalopathies), e a comunidade científica se voltou para caracterizar qual seria o agente patológico destas doenças. As TSEs são doenças neurodegenerativas que afligem humanos e demais animais, caracterizadas pela aparência espongiforme nos cortes histológico, perda neuronal glial, ativação glial e acúmulo de agregados amiloides (MABBOTT; MACPHERSON, 2006).

As TSEs foram propagadas originalmente de forma acidental, onde ovelhas foram tratadas com formalina desconhecidamente derivada de um animal com scrapie – doença neurodegenerativa de ovelhas e cabras –, desenvolvendo a doença aproximadamente dois anos

depois (LOPES, 2005). Subsequentemente, ovelhas, camundongos, humanos, macacos e demais animais foram infectados e desenvolveram doenças priônicas. No caso dos seres humanos, a propagação de kuru – doença priônica que atinge primatas – foi atribuída aos hábitos canibalísticos das tribos da Nova Guiné (GAJDUSEK; GIBBS; ALPERS, 1966; GAJDUSEK; ZIGAS, 1957). Posteriormente, outras doenças que apresentavam característica similares com a scrapie chamaram a atenção dos cientistas contemporâneos para desvendar qual o agente patológico destas doenças (cf. tabela 1). As pesquisas realizadas apontavam para um agente cujo potencial de infecção diminui com procedimentos de hidrólise ou modificação proteica (e.g. proteases, SDS, sais caotrópicos e fenol), e que apresenta resistência aos procedimentos que atingem os ácidos nucleicos (e.g. nuclease e irradiação por luz ultravioleta) (PRUSINER et al., 1988). Estes achados fizeram com que Griffith propusesse pela primeira vez a hipótese “protein only”, do inglês, somente proteína, que prediz que o agente patológico das TSEs consiste em uma proteína capaz de se replicar sem material genético (GRIFFITH, 1967). Subsequentemente, Prusiner acunhou o termo prion, do inglês, proteinaceous infectious only (PRUSINER, 1982).

A proteína prion (PrP) foi isolada do cérebro de animais infectados com scrapie, apresentando massa molecular de 27 a 30 kD. Interessantemente, PrP também foi detectada em animais não infectados e, de fato, estudos demonstraram que os níveis de mRNA da PrP eram similares em tecidos infectados e não infectados, levantando a hipótese da existência de uma proteína prion endógena (PRUSINER et al., 1998). Posteriormente, o gene que codifica PrP foi identificado: PRNP, o qual se encontra no braço curto do cromossomo 20 do homem e no cromossomo 2 de camundongo (CHESEBRO et al., 1985; OESCH et al., 1985). A proteína prion que desencadeia as TSEs foi então denominada de proteína prion scrapie (PrP^{Sc}), enquanto a proteína expressa naturalmente pelo organismo foi denominada de proteína prion celular (PrP^C). Ambas as proteínas apresentam a mesma sequência de aminoácidos, diferindo por características estruturais, onde PrP^C apresenta um perfil de proteínas em α -hélice, enquanto PrP^{Sc} possui um número mais elevado de folhas β (PAN et al., 1993).

Em 1999, Harris propôs a hipótese da patogênese das TSEs, onde PrP^{Sc} atuaria modificando PrP^C, levando a novas moléculas de PrP^{Sc} em uma reação autocatalítica, e que tem sido fortemente estabelecida pelos conhecimentos atuais. A presença da PrP^C é fundamental na patogênese das doenças priônicas, visto que espécimes deficientes da PrP^C não manifestam a doença (MALLUCCI et al., 2003). Apesar dos mecanismos de propagação destas encefalopatias

não serem completamente esclarecidos, sabe-se que as TSEs podem ser adquiridas via infecção, genética (mutações no gene PRNP) ou esporádica (revisado por ARANTES, 2009). Assim, o conhecimento sobre as TSEs se expandiu e continua em pesquisa ainda hoje para o esclarecimento de sua patogênese e, apesar dos esforços, ainda não existe cura/tratamento para os indivíduos afetados por estas doenças (para melhor revisão, cf. AGGUZI; LAKKARAJU, 2016; NORRBY, 2011).

2.2.2 Prion sob perspectiva fisiológica

A PrP^C é uma glicoproteína de membrana ancorada à face externa da membrana plasmática, através de uma molécula de glicosil fosfatidil inositol (GPI, do inglês, glycosyl-phosphatidylinositol) predominantemente nas regiões dos lipid rafts⁹. Ela é constituída por aproximadamente 250 aminoácidos (aa), gerando um peso molecular de 27kDa. A PrP^C atua como receptor para diversas moléculas ligantes, dentre as quais podemos destacar as moléculas de matriz extracelular vitronectina, laminina e a cochaperona stress-inducible phosphoprotein 1, STIP1, cujas interações e funções foram observadas e descritas pelo grupo liderado pela Dra. Vilma Martins (LINDEN et al., 2008; MARTINS et al. 2010). A PrP^C é expressa constitutivamente em diversos tecidos animais, tais como intestino, pulmão, rim, pele, medula óssea, músculo e, principalmente, expressa no SNC, sobretudo em neurônios recém-formados (STEELE et al., 2006).

Segundo Gabriel et al. (1992), a PrP^C, além de presente, foi extremamente conservada durante o processo da evolução, sugerindo importante papel fisiológico a ser descoberto. Tendo por base este relato, o modelo animal nocaute para PrP^C (*Prnp*^{-/-}) surgiu como uma importante ferramenta para responder muitas perguntas referentes à fisiologia da PrP. À primeira instância, não foi observado nenhum defeito fenotípico aparente nos animais *Prnp*^{-/-} (BÜELER et al., 1992; MANSON et al., 1994). No entanto, estudos baseados neste modelo animal relataram anormalidades em diversas funções, tais como: alterações na neurotransmissão e plasticidade sináptica, na memória espacial hipocampal, déficit de memória em animais idosos, no ritmo circadiano, aumento da sensibilidade a agentes convulsivantes, nas respostas imunológicas e etc. (LOPES; SANTOS, 2012). A PrP^C regula a atividade de linfócitos T (BAINBRIGDE;

⁹**Lipid rafts:** Regiões da membrana plasmática rica em colesterol, esfingolipídios e proteínas de membranas ancoradas através de GPI (ALBERTS et al., 2008).

WALKER, 2005) e tem sido relacionada com a manutenção dos níveis de metais no organismo, tais como cobre, ferro e zinco (PUSHIE et al., 2011; URSO et al., 2012), além de modular o desenvolvimento dos astrócitos (HARTMANN et al., 2013). Interessantemente, Bribián et al. (2012) relataram uma correlação inversamente proporcional entre a expressão de PrP^C e a taxa de proliferação de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs, do inglês, oligodendrocyte precursor cells). No que se refere à plasticidade neuronal, diversos trabalhos têm mostrado a relação da PrP^C com a plasticidade neuronal (CAIATI et al., 2013). De forma relevante para este projeto, além dos imensos estudos sobre PrP^C, demonstrou-se sua correlação com a neurogênese adulta.

No quesito neurogênese, o papel de PrP^C foi estudado pela primeira vez em 2006, quando Steele e colaboradores mostraram sua participação na proliferação e diferenciação de NSPCs, tanto na fase embrionária quanto na fase adulta (MIRANDA et al., 2011; STEELE, et al., 2006). Subsequentemente, Santos et al. (2011) mostrou sua participação na autorrenovação e proliferação de NSPCs embrionárias quando há interação com STIP1. Em 2013, Prodomidou et al. apontaram a relação de PrP^C com NCAM e participação nos processos de autorrenovação, proliferação e diferenciação de adNSPCs, bem como estudos morfológicos dos neurônios recém-formados na fase pós-natal adulta. Com isso, torna-se claro que PrP^C possui um papel chave na neurogênese adulta, e o entendimento do seu papel nos demais quesitos que modulam a neurogênese adulta, bem como seu mecanismo de sinalização e os ligantes envolvidos, torna-se crucial para a melhor compreensão da neurogênese e potenciais alvos terapêuticos.

2.3 Proteína Stress-inducible Phosphoprotein 1

A proteína Stress-inducible phosphoprotein one (STIP1), também denominada de Hop (Hsp70/Hsp90 Organizing Protein), consiste em uma co-chaperona que se associa com as proteínas de choque térmico de 70kDa e 90kDa (Hsp70 e hsp90, respectivamente), modulando suas atividades, além de atuar como proteína-ligante de PrP^C (MARTINS et al., 1997; SONG; MASISON, 2005; ZANATA et al., 2002). Esta co-chaperona foi descrita primeiramente por Nicolet e Craig (1989), cientistas que isolaram e caracterizaram STIP1 de *Saccharomyces cerevisiae* durante um estudo genético cujo objetivo foi identificar fatores capazes de induzir expressão gênica de proteínas após choque térmico (Hsps, do inglês, heat shock proteins).

Posteriormente, diversos trabalhos identificaram homólogos de STIP1 em humanos, camundongos, insetos, leveduras, plantas, parasitas e em vírus (LOPES, 2005; ARANTES, 2009).

Em mamíferos, STIP1 consiste em uma proteína monomérica, constituída por três domínios TPR (do inglês, tetratricopeptide repeat) e por dois domínios ricos em aspartato e prolina (DP1 e DP2) (SCHMID et al., 2012). A STIP1 de humanos e murinos contém aproximadamente 2079 pares de bases (pb), 543 aa e peso molecular aparente de 66kDa (NICOLET; CRAIG, 1989). Sua distribuição subcelular é predominantemente citoplasmática, entretanto, estudos apontam que uma fração pode ser encontrada no núcleo e também no meio extracelular (ERLICH et al., 2007; EUSTACE; JAY, 2004; HAJJ et al., 2013; LANCASTER; FEBBRAIO, 2005a,b; LIMA et al., 2007). No quesito de sua fisiologia, sabe-se que STIP1 exerce importantes papéis na modulação de Hsps (SCHMID et al., 2012; SONG; MASISON, 2005) e está envolvida no ciclo da divisão celular, como, por exemplo, na transcrição da histona H2B (ZHENG; ROEDER; LUO, 2003), conformação de proteína-quinases (ABBAS-TERKI et al. 2002), destruição de ciclinas e separação das cromátides irmãs (YAMASHITA et al., 1996). Recentemente, um artigo inédito relatou que STIP1 é essencial no desenvolvimento embrionário, uma vez que camundongos deficientes para STIP1 são inviáveis, sofrendo severos comprometimentos no desenvolvimento, como, por exemplo, degeneração do tubo neural (BERALDO et al., 2013; BERALDO et al., 2015).

Os trabalhos de Martins et al. (1997) e Zanata et al. (2002) identificaram e caracterizam STIP1 como proteína-ligante de PrP^C. STIP1 se liga à sequência da PrP^C correspondente aos aminoácidos 230-245. Essa interação é conhecida por promover neuritogênese e neuroproteção in vitro (LOPES et al., 2005; SAKUDO et al., 2005), memórias de curta e longa duração (COITINHO et al., 2007) e autorrenovação de precursores neurais fetais (SANTOS et al., 2011). Todavia, o papel deste complexo na neurogênese adulta permanece não esclarecido. Assim, estudar o papel desta interação na neurogênese adulta consiste em um ótimo inquérito para esclarecer se este complexo atua de forma semelhante aos achados no quesito neurogênese embrionária, visto que este estudo é necessário para descoberta de possíveis alvos terapêuticos, levando em consideração que a maioria das doenças neurológicas, como aquelas neurodegenerativas, ocorrem na fase adulta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel de PrP^C e seu ligante STIP1 na neurogênese adulta em mamíferos.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar e caracterizar a cultura de adNSPCs provenientes da V-SVZ;
- Avaliar o papel do complexo PrP^C-STIP1 na autorrenovação de adNSPCs provenientes da V-SVZ de camundongos adultos *Prnp*^{-/-} e *Prnp*^{+/+};
- Avaliar o papel do complexo PrP^C-STIP1 na proliferação de adNSPCs provenientes da V-SVZ de camundongos adultos *Prnp*^{-/-} e *Prnp*^{+/+};
- Avaliar o papel do complexo PrP^C-STIP1 na migração de adNSPCs provenientes da V-SVZ de camundongos adultos *Prnp*^{-/-} e *Prnp*^{+/+}.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados em cultura celular foram: meio de cultura DMEM/F-12 (Gibco, Cat. No. 12500-062), suplemento B-27 (Gibco, Cat. No. 17504-044), heparina (Stem Cell Technologies, Cat. No. 7980), penicilina e estreptomicina (Gibco, Cat. No. 15140-122), gentamicina (Gibco, Cat. No. 15750-060), anti-anti 1X (Gibco, Cat. No. 15240-062), fatores de crescimento EGF e bFGF (Sigma, Cat. No. F291), PBS e HBSS (Gibco, Cat. No. 14170-112), tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, Cat. No. 25300-054), neutralizador de tripsina (Gibco, Cat. No. R-002-100), StemPro Accutase (Gibco, Cat. No. A11105-01), poli-L-lisina (Sigma, Cat. No. P9155), laminina (Roche, Cat. No. 11243217001), ácido retinoico (alíquota), soro fetal bovino (Gibco), IGF-1 (alíquota) e Trypan Blue 4% (Sigma, Cat. No. 15250-061). Além disso, utilizou-se BSA (Sigma, Cat. No. A2153) e Triton X100 (Sigma, Cat. No. X100).

Para realização das imunomarcações foram utilizados o reagente ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Cat. No. P36930) e os seguintes anticorpos: anti-PrP^C mouse 1:100, anti-STIP1 rabbit 1:100 (alíquota), anti-βIII-tubulin mouse 1:100 (Cell Signaling, Cat. No. 4466S), anti-βIII-tubulin rabbit 1:100 (Cell Signaling, Cat. No. 5568S), anti-GFAP mouse 1:100 (Cell Signaling, Cat. No. 3670X/3670S), anti-GFAP rabbit 1:400 (Dako, Cat. No. Z0334), anti-O4 mouse 1:100 (Millipore, Cat. No. MAB345), DAPI 1:1000 (Invitrogen, Cat. No. D1306), Alexa Fluor Anti-mouse 488 1:500 (Invitrogen, Cat. No. A21200), Alexa Fluor anti-mouse 546 1:500 (Invitrogen, Cat. No. A10037), Alexa Fluor anti-rabbit 488 1:500 (Invitrogen, Cat. No. A21441) e anti-rabbit 546 1:500 (Invitrogen, Cat. No. A10040).

4.2 Animais

Camundongos jovem-adultos de dois a quatro meses de idade foram utilizados neste trabalho, abrigando-se até o máximo de cinco animais por gaiola. Camundongos tipo-selvagens (*Prnp*^{+/+}) e nocautes (*Prnp*^{-/-}) para o gene codificante da PrP^C, linhagem 129/SV C57BL/6J, foram gentilmente fornecidos pela Dra. Vilma Martins – AC Camargo Cancer Center, SP. As colônias desses animais foram expandidas no biotério de Experimentação do Departamento de

Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob condições de luz (12 h claro/escuro) e temperatura controladas. Os animais foram utilizados para realização da cultura primária de adNSCs, descrita no próximo item como “ensaio de formação de neuroesferas”.

Todos experimentos realizados obtiveram aprovação do Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (protocolo registrado sob número 016 nas folhas 03 do livro 03) e todos os esforços para minimizar o número e sofrimento dos animais foram adotados. As células dos animais geneticamente modificados (AnGM) foram manipuladas em salas NB1 devidamente certificadas (Número CQB-046-98).

4.3 Ensaio de Formação de Neuroesferas

As adNPCs foram isoladas da V-SVZ dos animais de ambos os genótipos (2-4 meses de idade), *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-}, usualmente três animais do mesmo genótipo para o estabelecimento de uma cultura celular e posteriores experimentos funcionais (fig. 3). Os animais foram sacrificados por saturação em câmara de CO₂ e seus cérebros foram removidos para retirada dos explantes da V-SVZ. Para retirada dos cérebros e explantes, o material cirúrgico foi esterilizado em fluxo laminar através da luz ultravioleta por vinte minutos, e então a assepsia foi realizada com álcool 70%. Foi realizada antissepsia da região cefálica dos animais após eutanásia, e a pele que recobre esta região foi removida para exposição da calota craniana. Uma incisão foi realizada no limite do bulbo olfatório, e através dessa incisão a calota craniana foi removida lateralmente com cautela para não danificar o cérebro. O neuro-eixo foi rompido, bem como o quiasma óptico, e o cérebro foi acondicionado em tampão PBS, sob gelo.

Para a remoção dos explantes da V-SVZ (microdissecção), adotou-se o uso de um estereomicroscópio de médio aumento (ZEISS Discovery.V8, fig. 4). Os cérebros foram seccionados em plano sagital mediano com bisturi descartável estéril, e ambos os hemisférios cerebrais foram posicionados para visualização da face medial. Dois cortes foram realizados no córtex logo acima da V-SVZ (fig. 5), para facilitar a exposição da parede lateral dos ventrículos laterais. Os explantes foram acondicionados em tampão HBSS, e posteriormente dissociados em 1 ml de tripsina-EDTA 0,05% por um minuto, hidromecanicamente, através de movimentos “up and down” com uma ponteira de mil microlitros previamente pré-humedecida internamente para

que os explantes não aderissem em sua superfície interna. Após este tempo, os explantes foram acondicionados em um Thermomixer (Eppendorf) durante 5 minutos, 37 °C, 700 rpm. Novamente, os explantes foram dissociados hidromecanicamente durante 3 minutos, e a atividade da tripsina foi bloqueada pelo neutralizador de tripsina (1:1), e as células centrifugadas por 3 minutos, 2000 rpm. Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200 µl de meio DMEM/F-12 completo (DMEM/F-12, B-27 2%, heparina 2%, penicilina/streptomicina 200 U/ml, gentamicina 50 µg/ml, EGF e bFGF 20 ng/ml) e, utilizando-se de uma ponteira de 200 µl, aproximadamente dez movimentos “up and down” foram realizados. Acrescentou-se 5 ml de HBSS e a solução com células foi então filtrada para um tubo Falcon de 50 ml através do Cell Strainer 40 µl (BD Falcon, Cat. No. 352340), e centrifugadas por 3 minutos a 2400 rpm. Uma vez que o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 2 ml de meio DMEM/F12 completo e plaqueadas em placas multi-poços convencionais de 6 poços, sendo acondicionadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Metade do meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias, e após uma semana as células foram transferidas para uma placa de baixa aderência (Corning, Cat. No. CLS3471-24EA). As neuroesferas formadas entre uma e duas semanas foram dissociadas (cf. próximo item) para realização dos experimentos funcionais ou culturas secundárias. Todas as soluções, meios e tampões, continham antibióticos.

Figura 3 – Ensaio de formação de neuroesferas. Animais jovens-adultos de ambos os genótipos (*Prnp*^{-/-} e *Prnp*^{+/+}) foram utilizados para o isolamento das adNSPCs. Na presença dos fatores de crescimento, as adNSPCs cresceram formando agregados celulares denominados de neuroesferas. As neuroesferas formadas foram então utilizadas diretamente ou dissociadas novamente em células isoladas para realização dos experimentos funcionais.

Figura 4 – Estereomicroscópio. Lupa utilizada na separação dos hemisférios cerebrais (corte sagital mediano) (ZEISS Discovery.V8). À direita, inferior, placa de Petri contendo PBS gelado com antibióticos e as amostras (encéfalos) para microdissecção.

Figura 5 – V-SVZ murina. Vista medial do hemisfério cerebral murino. Possível visualizar uma estrutura composta por substância branca em forma de “V deitado”, que compreende o corpo caloso e o fórnix. Entre estas estruturas se encontra o ventrículo lateral e, portanto, a parede lateral dos ventrículos laterais (V-SVZ) (Extraído e adaptado de ZNZ, 2013).

4.4 Passagem e manutenção das Neuroesferas em cultura

A cultura de neuroesferas foi transferida da placa multi-poços para um tubo Falcon de 15 ml, onde foi acrescido 5 ml de HBSS, e as neuroesferas foram centrifugadas a 700rpm por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, as neuroesferas foram dissociadas hidromecanicamente em 1 ml de StemPro Accutase através do uso de uma ponteira de mil microlitros, por 3-5 minutos, e permaneceram imersas na solução de StemPro Accutase por mais 5 minutos. 5 ml de HBSS foi acrescentado à solução, e as células então isoladas uma das outras foram centrifugadas a 2000rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 1 ml de meio completo, e então quantificadas pela câmara de Neubauer, sendo as células não viáveis excluídas pelo corante supravital Trypan Blue. As células isoladas foram utilizadas na caracterização da cultura, nos experimentos funcionais (autorrenovação, proliferação e migração), ou estabelecimento de culturas secundárias, terciárias, etc.

4.5 Cultura Celular em Monocamada

Pelo menos um dia antes do plaqueamento celular, os poços das placas multi-poços foram tratados com poli-L-lisina 10 µg/ml, seguidos por três lavagens com água Milli-Q estéril, e então tratadas com de laminina 5 µg/ml, de um dia para o outro. A laminina foi removida no dia do plaqueamento das adNPCs, e as placas foram deixadas para secar a temperatura ambiente. Neuroesferas secundárias foram dissociadas conforme descrito no item anterior, ressuspensas e plaqueadas sob meio DMEM/F-12 completo, incluindo os fatores de crescimento EGF e bFGF.

4.6 Ensaio de Autorrenovação Celular

Neuroesferas primárias foram dissociadas (item 3.4) e plaqueadas em densidade clonal de 2000 células por poço, em uma placa de 96 poços, previamente tratadas com meio de cultura DMEM/F-12 para diminuir a tensão superficial do plástico, evitando a adesão das células/neuroesferas. As adNPCs foram plaqueadas nas condições controle ou tratadas com STIP1 recombinante – 0,5 µM e 1 µM, certificando-se que apenas células isoladas fossem plaqueadas, sem neuroesferas remanescentes. Novo meio de cultura e STIP1 foram adicionados a

cada 2-3 dias, e no sétimo dia de cultura as neuroesferas formadas foram fotografadas (ZEISS Primo Vert) e quantificadas pelo software ZEN 2012 (ZEISS Microscopy). Todos experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Ensaio de Proliferação Celular

Neuroesferas primárias foram dissociadas (item 3.4) e plaqueadas em uma densidade de 1.104 células por poço, em uma placa de 96 poços. As células foram submetidas ao tratamento de STIP1 0,5 μ M, ou não (controle), para o ensaio de proliferação celular por incorporação de BrdU, realizado pelo Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) Kit (Roche, Cat. No. 11647229001) de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Ensaio de Migração Celular

Neuroesferas secundárias com o diâmetro médio de 150 μ m foram plaqueadas em baixa densidade em placas multi-poços de 24 poços, previamente revestidas com poli-l-lisina 10 μ m/ml e laminina 5 μ g/ml. Após 24 horas, as neuroesferas foram fotografadas (ZEISS Vert.A1) e o diâmetro das neuroesferas, bem como o halo de migração, foram mensurados pelo software ZEN 2012 (ZEISS Microscopy). Para quantificar a percentagem de migração, subtraiu-se o valor da mensuração do diâmetro da neuroesferas do halo total de migração, a fim de avaliar apenas a percentagem de migração, quando comparada ao tamanho original da neuroesfera.

4.9 Ensaio de Imunofluorescência

As adNPCs foram plaqueadas, isoladas ou em forma de neuroesfera, em lamínulas redondas pré-revestidas com poli-L-lisina 10 μ g/ml e fixadas com paraformaldeído 4% durante vinte minutos, a fim de analisar os marcadores celulares – GFAP para astrócitos e adNPCs; nestina para progenitores neurais; NeuN, DCX e β III-tubulina para neurônios; e O4 para oligodendrócitos, além da sonda DNA-específico DAPI para visualização dos núcleos. As células foram submetidas à solução de bloqueio – BSA 5%, Triton 0,3%, PBS – por 1 h e incubadas com os anticorpos primários (vide item 3.1), de um dia para o outro, na temperatura de 4 °C. A

solução de diluição dos anticorpos, primários e secundários, consistiu em PBS, BSA 1% e Triton 0,3%, e a incubação com ambos os anticorpos foi realizada em câmara húmida protegida da luz. Os anticorpos primários foram removidos por três lavagens de PBS, e as células foram submetidas à incubação com os anticorpos secundários (item 3.1) por 1 h em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários foram removidos por três lavagens sucessivas de PBS. Após a remoção dos anticorpos secundários, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro através do uso do reagente ProLong Antifade Reagent, e foram alocadas em câmaras secas protegidas da luz para secar em temperatura ambiente. A análise das imagens foi realizada no microscópio de fluorescência da ZEISS (ZEISS Vert.A1), e seu respectivo programa, ZEN 2012 Software (ZEISS Microscopy).

4.10 Análise Estatística

O ensaio de autorrenovação foi utilizado pelo teste ordinário two-way ANOVA. Houve uma diferença significativa entre os dois grupos celulares – *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} (p= 0.0073).

5 RESULTADOS

5.1 Padronização e Caracterização da Cultura Celular

As adNSCs foram isoladas da V-SVZ de camundongos jovem-adultos (2-4 meses) *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-}. Na presença dos fatores de crescimento EGF e bFGF, foi possível observar a formação de neuroesferas em ambos grupos experimentais (fig. 6 A-D). A cultura primária de neuroesferas, quando dissociada, gerou neuroesferas secundárias com sucesso até sete dias em cultura. As neuroesferas exibiram um padrão típico de neuroesferas saudáveis, apresentando alta taxa de células em proliferação na borda da neuroesferas e, conforme o tamanho da neuroesferas, um escurecimento na região central, provavelmente devido à grande quantidade de células alocadas nesta região. Observou-se essas características em todas as culturas, sugerindo uma ferramenta de estudo confiável para o estudo do comportamento de adNSCs in vitro.

Além da cultura de neuroesferas em suspensão, teve-se como objetivo padronizar e caracterizar a cultura em monocamada, para que as adNSCs fiquem aderidas e permaneçam com as características convencionais de adNSCs. Tem-se relatado na literatura que a cultura de neuroesferas consiste em uma excelente ferramenta para analisar o número e potencial das adNPCs, além de ser uma ferramenta útil na análise dos fatores intrínsecos e extrínsecos pela simplicidade de adicionar fatores e observar a resposta (WALKER; KEMPERMANN, 2014). Contudo, as neuroesferas possuem uma natureza celular demasiadamente heterogênea, uma vez que se estabelece seu próprio microambiente na esfera (GÖRITZ; FRISÉN, 2012). Neste aspecto, a cultura em monocamada fornece uma ferramenta propícia para o estudo a avaliação de mecanismos de sinalização, uma vez que apresenta uma população mais homogênea de adNSCs. Quando plaqueadas em placas multi-poços de 24 poços, previamente revestidas com laminina (fig. 6E), observou-se uma população rica em adNSPCs, duplamente positiva para os marcadores de Nestina e GFAP (fig. 6F). A expressão de nestina também foi verificada em neuroesferas inteiras ou dissociadas (fig. 6G, H). Através de ensaios de imunofluorescência indireta, foi observada também a expressão endógena das proteínas PrP^C e STIP1 nas células provenientes de neuroesferas tipo-selvagens, *Prnp*^{+/+}, para confirmação de seu genótipo (fig. 7).

Figura 6 – Caracterização da cultura celular de adNSPCs da V-SVZ. (A – D) Microscopia de luz, (G) microscopia de contraste de fase, e (E, F e H) microscopia de fluorescência. (A-B) Cultura primária de neuroesferas. Após 7 dias do isolamento de adNSCs, sob sinalização dos mitógenos (EGF e bFGF), pôde-se observar o aparecimento de neuroesferas primárias. (A) e (B) mostram neuroesferas *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} no aumento de 40X, respectivamente. (C-D) Cultura secundária de neuroesferas. Quando dissociadas, as células derivadas da cultura primária de neuroesferas cresceram formando neuroesferas secundárias. (C) e (D) mostram *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} no aumento de 200X, respectivamente. Notar pequenas colônias de células proliferativas (cabeça da seta) e *micro-spikes* evidentes (seta) na periferia da neuroesfera na figura D, grande aumento. (E-F) Progenitores neurais nestina⁺. Neuroesferas (E) e células isoladas provenientes da dissociação das neuroesferas (F) expressam nestina, demonstrado em vermelho pelo uso de anticorpo nestina-específico. Aumento de 200X. (G) Imagem representativa de adNSPCs cultivadas em condições aderentes. Neuroesferas primárias foram dissociadas e plaqueadas em placas previamente pré-revestidas com poli-L-lisina 10µg/ml e laminina 5µg/ml, aumento de 100X. (H) Colocalização de GFAP (verde) e nestina (vermelho) em adNSPCs cultivadas em monocamada (G). Os núcleos foram identificados com DAPI (azul). A cor amarela representa a sobreposição dos marcadores GFAP e nestina. Aumento de 200X.

Figura 7 – Expressão de PrP^C e STIP1. Neuroesferas *Prnp*^{+/+} foram marcadas com anti-PrP^C (vermelho, painel superior) e STIP1 (verde, painel inferior). Os núcleos estão marcados em azul (DAPI). Aumento de 400X e 200X, painel superior e inferior, respectivamente.

Uma vez confirmado o padrão típico do ensaio da formação de neuroesferas no modelo utilizado neste trabalho, e etapa conseguinte consistiu em confirmar a multipotência de adNSPCs. Para determinar a multipotência, adotou-se a técnica de imunofluorescência para marcadores específicos de precursores neurais, astrócitos, neurônios e oligodendrócitos (Fig. 8). Sob sinalização contínua de EGF e bFGF, observou-se uma grande quantidade de células Nestina⁺ e GFAP⁺ (fig. 6 E-F e H). Na ausência dos fatores de crescimento, as neuroesferas apresentaram diversas células GFAP⁺ semelhantes aos astrócitos (fig. 8 A-C). Para a identificação de neurônios e oligodendrócitos, manteve-se as células em cultura por sete dias, também na ausência dos fatores de crescimento. A fim de visualizar neurônios, utilizou-se os anticorpos contra NeuN, DCX e β III-tubulina (fig. 8 D-H). Para a identificação de oligodendrócitos, foi utilizado anticorpo anti-O4, marcador de superfície dos progenitores de oligodendrócitos (fig. 8 I). As adNPCs de ambos os grupos experimentais (*Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-}) foram capazes de se diferenciar em todas as linhagens neurais (dados não mostrados).

5.2 PrP^C Aumenta a Autorrenovação de adNPCs

A literatura científica tem demonstrado uma influência positiva da PrP^C sobre autorrenovação e proliferação de adNSPCs, durante as fases embrionária e adulta (PRODOMIDOU et al., 2013; SANTOS et al., 2011; STEELE et al., 2006). Durante o desenvolvimento embrionário, PrP^C interage com STIP1 para promover a autorrenovação e proliferação de adNSPCs, porém ainda não existem quaisquer relatos dessa interação da fase adulta (SANTOS et al., 2011). A figura 9 mostra que PrP^C é crucial para a manutenção de adNSPCs, uma vez que sua ausência (*Prnp*^{-/-}) causou um decréscimo na taxa da autorrenovação celular quando comparado aos animais tipo-selvagens. As figuras representativas de neuroesferas *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} estão apresentadas na figura 9A. Após confirmar o envolvimento de PrP^C na autorrenovação de adNSPCs, avaliou-se a possibilidade de STIP1 participar deste processo. Surpreendentemente, demonstrou-se que STIP1 recombinante não apresentou quaisquer efeitos significativos na autorrenovação das células *Prnp*^{+/+} ou *Prnp*^{-/-} (fig. 9C). Durante o desenvolvimento, no entanto, foi observado que a secreção endógena de STIP1 pelos NSPCs é necessária para a sua própria manutenção (SANTOS et al., 2011), de modo que experimentos que visam bloquear a secreção endógena de STIP1 são requeridos para tal observação também na fase adulta.

Figura 8 – Multipotência das adNSPCs derivadas da V-SVZ. (A – I) Imagens de imunofluorescência. (A-C) Células semelhantes aos astrócitos GFAP⁺ estão marcadas em verde, enquanto seus núcleos foram marcados com DAPI (azul). Aumentos de 200X, 400X e 630X, respectivamente. (D-H) Neurônios recém-formados. (D) e (E) mostram neurônios pós-mitóticos marcados para NeuN (vermelho), GFAP (verde) e DAPI (azul) nos aumentos de 200X e 400X, respectivamente. Notar a dupla marcação para NeuN e GFAP na imagem E. (F) Neurônios pós-mitóticos doublecortin⁺ marcados em verde, núcleos marcados com DAPI em azul; aumento de 400X. (G-H) Neurônios pós-mitóticos βIII-tubulina⁺ marcados em verde (G) ou vermelho (H) no aumento de 400X. (I) Oligodendrócitos O4⁺ marcados em verde e núcleos marcados com DAPI em azul, aumento de 400X.

A função de PrP^C e STIP1 na proliferação de adNPCs foi analisada por meio do ensaio de incorporação de BrdU. A molécula de BrdU é um análogo da timidina, incorporada em níveis detectáveis durante a fase S do ciclo celular. A figura 10 mostra que STIP1 recombinante não surtiu efeito na proliferação de adNPCs em ambos os grupos experimentais. Independentemente de STIP1 exógeno, as células *Prnp*^{-/-} apresentam uma menor taxa de proliferação quando comparada às células *Prnp*^{+/+}. No entanto, experimentos adicionais serão necessários para confirmar estes achados.

Figura 9 – PrP^C promove a autorrenovação de adNSPCs provenientes da V-SVZ. (A) Imagens representativas de neuroesferas *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} após sete dias em cultura, aumento de 40X. Observar o maior número de neuroesferas formadas no grupo controle *Prnp*^{+/+}. (B) O gráfico mostra a quantificação das neuroesferas formadas. Barras: desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. (C) Neuroesferas *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} foram tratadas com concentrações crescentes de STIP1. Após sete dias em cultura sob sinalização dos mitógenos EGF e bFGF, as neuroesferas foram fotografadas e quantificadas pelo software Zen Microscopy 2012. O gráfico mostra a quantificação das neuroesferas derivadas da V-SVZ. Barras: desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata (n= 1 para a condição STIP1 0,05 μM).

Em conjunto, estes resultados demonstram que PrP^C promove a autorrenovação e proliferação de adNSPCs, e que STIP1, ao contrário do que se esperava baseado no artigo que estudou o desenvolvimento embrionário (SANTOS et al., 2011), não possui efeito nestes fenômenos biológicos na fase adulta. No entanto, experimentos adicionais serão necessários para confirmar esses achados.

Figura 10 – PrP^C promove a proliferação de adNSPCs proveniente da V-SVZ. Neuroesferas primárias, *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-}, foram dissociadas e plaqueadas como células isoladas na densidade celular de 1.10^4 . Assim, as células foram tratadas ou não (controle) com STIP1 0,5 µM ou 1 µM, e então incubadas por 24h. Duas horas antes de completar o período de recuperação/tratamento (22 h), as células foram incubadas com BrdU (10 µM). O gráfico mostra um experimento realizado em triplicata (n= 1).

5.3 PrP^C Promove a Migração de adNPCs

A migração dos neuroblastos gerados na V-SVZ ao bulbo olfatório consiste em um mecanismo de suma importância na neurogênese adulta do nicho neurogênico V-SVZ. Desta forma, buscou-se testar se PrP^C e/ou STIP1 desempenha um papel na migração de adNPCs na V-SVZ in vitro. Para responder esta questão, neuroesferas de tamanho médio (~150 µm) foram plaqueadas em baixa densidade em poços de uma placa multi-poços de 24 poços, previamente pré-revestidos com poli-L-lisina 5 µg/ml (1 h) e laminina 10 µg/ml (~24 h). Após 24 h, o halo de migração das neuroesferas *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} foram mensurados. As neuroesferas *Prnp*^{+/+} apresentaram uma taxa maior de migração quando comparadas com as células *Prnp*^{-/-}, revelando pela primeira vez um papel de PrP^C na migração de adNSPCs (fig. 11). A proteína STIP1 recombinante também não apresentou efeito no processo de migração celular (fig. 11). Interessantemente, a laminina, utilizada como substrato neste experimento, consiste em um ligante da PrP^C (COITINHO et al., 2006; GRANER et al., 2000a; GRANER et al., 2000b), o que levanta a hipótese de que a interação entre PrP^C-laminina possa estar mediando a migração de adNSPCs. Portanto, pode-se concluir com estes resultados que PrP^C promove a migração de

adNSPCs independentemente de STIP1, e aponta a laminina como um alvo em potencial pelo qual PrP^C atua na migração celular dentro da V-SVZ, e possivelmente RMS e OB.

Figura 11 – PrP^C promove a migração de adNSPCs. À esquerda, imagens representativas das neuroesferas secundárias *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{-/-} em processo de migração celular. O halo de migração está delimitado pela linha vermelha. À direita, o gráfico mostra a percentagem de migração celular das neuroesferas sob camada de laminina 10 μg/ml, na ausência (controle) ou presença de STIP1 0,5 μM, exógeno (n= 1, realizado em duplicata).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi investigado se PrP^C e seu principal ligante, STIP1, são capazes de promover algumas das etapas cruciais para a neurogênese adulta. Com isso, foram apresentadas evidências de apontam PrP^C como uma molécula-chave na autorrenovação, proliferação e migração celular das adNSPCs derivadas da V-SVZ, e também que STIP1 não participa de nenhum destes eventos celulares no modelo de estudo que foi adotado.

Primeiramente foram confirmadas as características essenciais da cultura da adNSPCs *in vitro*, a fim de validar o modelo de estudo utilizado neste projeto. Para este propósito, os animais de experimentação foram previamente expandidos sob controle da quantidade, idade e sexo; todos os dados dos animais foram preservados. Após sete dias em cultura primária, as adNPCs isoladas da V-SVZ de animais jovem-adultos, nocautes e tipo-selvagens para a PrP^C, cresceram formando neuroesferas típicas, como previamente descrito desde sua descoberta por Reynolds e Weiss (1992) e pelas pesquisas que os sucederam (fig. 6). As adNSPCs isoladas da V-SVZ apresentaram expressão de nestina, marcador de progenitores neurais, tanto na cultura de neuroesferas em suspensão quando na cultura de adNSPCs cultivadas em monocamada (fig. 6F, G e H). A cultura de adNSPCs em monocamada foi realizada conforme o protocolo descrito por Walker e Kempermann (2014). Adicionalmente, confirmou-se a multipotência através da diferenciação das células da neuroesfera em astrócitos, neurônios e oligodendrócitos (fig. 8). Em todos os protocolos utilizados para diferenciação, as células foram plaqueadas em meio DMEM/F-12 na ausência dos fatores de crescimento EGF e bFGF. Para obtenção de uma cultura mais rica em neurônios, as células foram tratadas no dia em que foram plaqueadas com ácido retinoico 1 μ M (RA, do inglês, retinoic acid) e 1% de soro fetal bovino (BFS, do inglês, bovine fetal serum), permanecendo de cinco a sete dias em cultura sem quaisquer tratamentos adicionais. Apesar disso, não houve um elevado número de neurônios formados (fig. 8 D-H). Esse fato pode ser explicado porque apesar do RA promover a diferenciação neuronal (JANESICK; WU; BLUMBERG, 2015), sem associação com outras moléculas, sua influência não seja tão significativa em adNSPCs derivadas da V-SVZ, uma vez que Hsieh et al. (2004) demonstrou uma elevada taxa de diferenciação neuronal nestas células associando RA com IGF-1. Além disso, sabe-se que muito menos neurônios são gerados na V-SVZ, quando comparados com outros nichos neurogênicos, como o giro dentado hipocampal (GUO et al., 2012; WALKER;

KEMPERMANN, 2014). Para diferenciação astrocítica foi utilizado 20% se SFB e, mesmo com apenas 1%, houve um elevado número de células GFAP+ semelhante aos astrócitos (fig. 8 A-C), embora deve-se ressaltar que células-tronco neurais também expressam a proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês, glial fibrillary acid protein) (TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014; VADODARIA; GAGE, 2014), o que explica a colocalização das proteínas GFAP e Nestina na fig. 6F, indicando uma possível transição de células-tronco para células progenitoras (cf. revisão de literatura, item. 2.1.2.2). A diferenciação em oligodendrócitos foi induzida por IGF-1 500nM, conforme padronizado no protocolo de Hsieh e colaboradores (2004). Apesar do protocolo utilizado, poucos oligodendrócitos foram identificados (fig. 8 I). Por fim, alguns autores têm levantado algumas características específicas que indicam que as neuroesferas estejam saudáveis, como, por exemplo, a presença de células proliferativas na borda das neuroesferas e micro-spikes em sua periferia, averiguada em grande aumento (AZARI et al., 2010; AZARI et al., 2011), o que pôde-se observar nas culturas realizadas neste projeto (fig. 6D). A expressão endógena de PrP^C e STIP1 foi verificada através de anticorpos específicos contra estas proteínas, onde as células *Prnp*^{+/+} apresentaram expressão de ambas as proteínas (fig. 7), confirmando seu genótipo. Em conjunto, estas características observadas na cultura celular indicam uma ferramenta confiável para realização dos experimentos funcionais propostos.

Após a cultura celular ser devidamente caracterizada, procurou-se testar a participação de PrP^C e STIP1 nas etapas primordiais da neurogênese adulta: autorrenovação e proliferação de adNSPCs, bem como migração celular. Steele et al. (2006) foram os primeiros a demonstrar uma correlação direta entre a PrP^C e a neurogênese embrionária e adulta. Contudo, seus resultados referentes à neurogênese adulta são escassos, demonstrando apenas que a influência de PrP^C na proliferação de células presentes na V-SVZ e DG. Em 2011, Santos et al. (2011) demonstraram que o tratamento com STIP1 recombinante promove a autorrenovação e proliferação de NSPCs durante o desenvolvimento embrionário. Recentemente, Prodomidou e colaboradores (2014) publicaram um extenso trabalho mostrando que PrP^C promove autorrenovação, proliferação e diferenciação neuronal de adNSPCs na V-SVZ. De acordo com estes autores, o presente trabalho confirma o papel de PrP^C como um fator-chave na autorrenovação e proliferação de adNSCs no nicho neurogênico da V-SVZ. Nesta investigação, a ausência de PrP^C também prejudicou a formação de neuroesferas (fig. 9) e a taxa de proliferação celular (fig. 10). Embora tenha sido demonstrado que a interação PrP^C-STIP1 aumenta a taxa de

autorrenovação e proliferação durante o desenvolvimento embrionário (SANTOS et al., 2011), o presente trabalho demonstrou que o mesmo não ocorre durante a fase adulta, uma vez que STIP1 não surtiu quaisquer efeitos nos eventos celulares aqui analisados: autorrenovação, proliferação e migração celular (fig. 9,10,11). No entanto, réplicas experimentais devem ser realizadas para confirmar esses achados. De fato, STIP1 é essencial para o desenvolvimento neural, como recentemente demonstrado por Beraldo et al. (2013), onde estes pesquisadores avaliaram camundongos nocautes para o gene codificante de STIP1, e observaram que estes animais sobrevivem apenas até o décimo primeiro dia do desenvolvimento embrionário, sofrendo severas malformações no tubo neural, além dos artigos que apontam sua função na neuroproteção e neuritogênese in vitro (LOPES et al., 2005; SAKUDO et al., 2005), bem como retenção das memórias de curta e longa duração (COITINHO et al., 2007). Além disso, foi demonstrado recentemente que animais geneticamente modificados com baixa expressão de STIP1 apresentam hiperatividade e déficit de atenção (BERALDO et al., 2015). Interessantemente, a interação entre PrP^C e STIP1 parece não atuar diretamente nas adNSPCs, embora o papel de tal relação na diferenciação não foi aqui estudada. Com base nos conhecimentos na literatura de que a neurogênese promove o aprendizado, mas não a retenção da memória, pode-se supor que o complexo PrP^C-STIP1 atue nos neurônios já formados e integrados na circuitaria neuronal, promovendo sua sobrevivência e possibilitando a retenção das memórias de curto e longo prazo. Desta forma, ensaios de sobrevivência celular dos neurônios recém-formados são necessários para esclarecer esta questão.

Na área de estudo da neurogênese, está bem estabelecido o processo pelo qual novos neurônios são formados na V-SVZ e DG. Células-tronco podem se dividir assimetricamente gerando uma célula-tronco e/ou células progenitoras, e estas possuem uma taxa elevada de proliferação e estão comprometidas com a diferenciação, em um curto prazo. Na V-SVZ, os progenitores neurais comprometidos com a linhagem neuronal se diferenciam em neuroblastos que migram para o bulbo olfatório através da via migratória rostral, e lá completam sua maturação e se integram na circuitaria local, tornando-se interneurônios glomerulares ou periglomerulares, e participam da olfação (BRETON-PROVENCHER; SAGHATELYAN, 2012; LAZARINI; LLEDO, 2011; LLEDO et al., 2006). Interessantemente, o conhecimento nesta área progrediu de tal maneira que tem sido identificado a dinâmica molecular da maturação das adNPCs por meio do sequenciamento de RNA em célula-única tanto na V-SVZ quanto no DG

hipocampal (LINNARSSON, 2015; LLORENS-BOBADILLA et al., 2015; SHIN et al., 2015). No estudo publicado por Prodomidou et al. (2014) não foi observado participação de PrP^C na migração de adNSPCs provenientes da V-SVZ. No entanto, no presente trabalho foi demonstrado de forma notável (embora sem estatística) que PrP^C, independentemente de STIP1, regula positivamente a migração de adNSPCs provenientes da V-SVZ sobre uma camada de laminina (fig. 11). Interessantemente, diversas evidências demonstram a importância da interação entre PrP^C e γ -laminina em fenômenos de plasticidade neural. PrP^C é capaz de se ligar a cadeia de γ 1-laminina e mediar neuritogênese manutenção dos neuritos formados (BERALDO et al., 2011; GRANER et al., 2000a; GRANER et al., 2000b; SANTOS et al., 2013). Interessantemente, a cadeia de γ 1-laminina forma um complexo com netrina-1 e integrina $\alpha 6 \beta 1$ a fim de ativar a via de sinalização MAPK, o que resulta na migração de adNSPCs na RMS (STAQUICINI et al., 2009). Ainda, tem-se observado que a laminina é altamente expressa na RMS de camundongos adultos e representa um substrato-chave que oferece suporte à migração dos neuroblastos (BELVINDRAH et al., 2007; CAPILLA-GONZALEZ et al., 2015; STAQUICINI et al., 2009). Assim, os mecanismos que medeiam a interação entre os neuroblastos durante seu percurso de migração ao OB devem ainda ser elucidados, e nossos resultados, conjuntamente com os dados sobre laminina previamente publicados, apontam PrP^C como uma molécula-alvo na biologia de adNSPCs via interação com laminina. A figura 12 ilustra os achados deste projeto, e as perspectivas levantadas.

Figura 12 – Perspectivas de estudo para PrP^C na neurogênese adulta. Neste trabalho foi confirmada a ação de PrP^C na autorrenovação e proliferação de adNSPCs, e demonstrado pela primeira vez, seu envolvimento na migração destas células na V-SVZ de mamíferos adultos. Adicionalmente, inferiu-se a possibilidade de STIP1 exógeno não participar deste processo por meio de sua interação com PrP^C (faltam dados estatísticos). No quesito migração celular, a laminina surge como uma proteína relevante da matriz extracelular (MEC) pela qual pode-se sugerir que atue juntamente com PrP^C para promover a migração de adNSPCs provenientes da V-SVZ, uma vez que a laminina é altamente expressa na RMS e interage com PrP^C na promoção de outros eventos no SNC. Ilustração adaptada do banco de imagem da Servier, Servier Medical Art, disponível em: <http://www.servier.com/>

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho confirmaram que a PrP^C possui um papel fundamental na autorrenovação e proliferação de adNSPCs na V-SVZ. De forma inédita, demonstrou-se que a PrP^C atua na promoção da migração das adNPCs, amplamente conhecidas pelo seu amplo percurso de migração na via migratória rostral. Adicionalmente, levanta-se a possibilidade de que STIP1 não seja a proteína responsável por estes processos celulares, e apontamos outra molécula como alvo pelo qual PrP^C promove a migração celular: laminina. Desta forma, sugere-se que PrP^C seja uma molécula crucial para diversas etapas que culminam na neurogênese adulta, independentemente de STIP1.

REFERÊNCIAS

- ABBAS-TERKI, T.; BRIAND, P. A.; DONZÉ, O.; PICARD, D. The Hsp90 co-chaperones Cdc37 and Sti1 interact physically and genetically. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 9, p. 1335-1342, set. 2002.
- AGUZZI, A.; LAKKARAJU, A. K. Cell biology of prions and prionoids: a status report. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 40-51, jan. 2016.
- AHMED, S. The culture of neural stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 1-6, jan. 2009.
- AIMONE, J. B.; LI, Y.; LEE, S. W.; CLEMENSON, G. D.; DENG, W.; GAGE, F. H. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 991-1026, out. 2014.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell** 5. ed. New York: Garland Science, 2002. 1392 p.
- ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, v. 135, p. 1127-1128, n. 3509, mar. 1962.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 124, n. 3, p.319-335, jun. 1965.
- ARANTES, Camila Pinto. **Avaliação da expressão de PrP^C na interação neurônio-glia, em astrócitos e os mecanismos de secreção de STI1**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- AZARI, H.; RAHMAN, M.; SHARIFIFAR, S.; REYNOLDS, B. A. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 45, p. 2393, nov. 2010.
- AZARI, H.; SHARIFIFAR, S.; RAHMAN, M.; SAEED, A.; REYNOLDS, B. A. Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 47, p. 2457, jan. 2011.
- BACHOR, T. P.; SUBURO, A. M. Neural stem cells in the diabetic brain. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 820790, nov. 2012. doi: 10.1155/2012/820790.
- BAINBRIDGE, J.; WALKER, K. B. The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. **Immunology Letters**, v. 96, n. 1, p. 147-150, jan. 2005.

BELLENCHI, G. C.; VOLPICELLI, F.; PISCOPO, V.; PERRONE-CAPANO, C.; di PORZIO, U. Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 2, p. 159-167, jan. 2013.

BELVINDRAH, R.; HANKEL, S.; WALKER, J.; PATTON, B. L.; MÜLLER, U. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 10, p. 2704-2717, mar. 2007.

BELZUNG, C.; WIGMORE, P. **Neurogenesis and neural plasticity**. Current Topics in Behavioral Neuroscience vol. 15. New York: Springer, 2013. 401 p.

BERALDO, F. H.; ARANTES, C. P.; SANTOS, T. G.; MACHADO, C. F.; ROFFE, M.; HAJJ, G. N.; LEE, K. S.; MAGALHÃES, A. C.; CAETANO, F. A.; MANCINI, G. L.; LOPES, M. H.; AMÉRICO, T. A.; MAGDESIAN, M. H.; FERGUSON, S. S.; LINDEN, F.; PRADO, M. A.; MARTINS, V. R. Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin $\gamma 1$ chain. **FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 265-279, jan. 2011.

BERALDO, F. H.; SOARES, I. N.; GOÇALVES, D. F.; FAN, J.; THOMAS, A. A.; SANTOS, T. G.; MOHAMMAD, A. H.; ROFFÉ, M.; CALDER, M. D.; NIKOLOVA, S.; HAJJ, G. N.; GUIMARAES, A. L.; MASSENSINI, A. R.; WELCH, I.; BETTS, D. H.; GROS, R.; DRANGOVA, M.; WATSON, A. J.; BARTHA, R.; PRADO, V. F.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB Journal**, v. 27, n. 9, p. 3594-3607, set. 2013.

BERALDO, F. H.; THOMAS, A.; KOLISNYH, B.; HIRATA, P. H.; DE JAEGER, X.; MARTYN, A. C.; FAN, J.; GONÇALVES, D. F.; COWAN, M. F.; MASSOD, T.; MARTINS, V. R.; GROS, R.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. Hyperactivity and attention deficits in mice with decreased levels of stress-inducible phosphoprotein 1 (STIP1). **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 11, p. 1457-1466, nov. 2015.

BRANN, J. H.; FIRESTEIN, S. J. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 182, jun. 2014. doi: 10.3389/fnins.2014.00182.

BRENTANI, R. R. Biological implications of complementary hydropathy of amino acids. **Journal of Theoretical Biology**, v. 135, n. 4, p. 495-499, dez. 1988.

BRETON-PROVENCHER, V.; SAGHATELYAN, A. Newborn neurons in the adult olfactory bulb: unique properties for specific odor behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 2, p. 480-489, fev. 2012.

BRIBIÁN, A.; FONTANA, X.; LLORENS, F.; GAVIN, R.; REINA, M.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; TORRES, J. M.; CASTRO, F. DE; RÍO, J. A. DEL. Role of the Cellular Prion Protein in Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Differentiation in the Developing and Adult Mouse CNS. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e33872, abr. 2012.

BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H. P.; DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S. B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 577-582, abr. 1992.

CAIATI, M. D.; SAFIULINA, V. F.; FATTORINI, G.; SIVAKUMARA, S.; LEGNAME, G.; CHERUBINI, E. PrPC controls via protein kinase A the direction of synaptic plasticity in the immature hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 7, p. 2973-2983, fev. 2013.

CAPILLA-GONZALEZ, V.; LAVELL, E.; QUIÑONES-HINOJOSA, A.; GUERRERO-CAZARES, H. Regulation of subventricular zone-derived cells migration in the adult brain. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 853, p. 1-21, 2015.

CHENG, M. F. Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, n. 3, p. 167-178, ago. 2013.

CHESEBRO, B.; RACE, R.; WEHRLY, K.; NISHIO, J.; BLOOM, M.; LECHNER, D.; BERGSTROM, S.; ROBBINS, K.; MAYER, L.; KEITH, J. M.; GARON, C.; HAASE, A. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. **Nature**, v. 315, n. 6017, p. 331-333, mai. 1985.

COITINHO, A. S.; FREITAS, A. R.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; ROESLER, R.; WALZ, R.; ROSSATO, J. I.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 3255-3264, dez. 2006.

COITINHO, A. S.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; ROSSATO, J. I.; FREITAS, A. R.; CASTO, C. C.; CAMMAROTA, M.; BRENTANI, R. R.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 1, p. 282-290, abr. 2007.

DERBY, C. D. Why have neurogenesis in adult olfactory systems? The presidential symposium at the 2006 AChemS conference. **Chemical Senses**, v. 32, n. 4, p. 361-363, mai. 2007.

DIAMOND, Marian C. Response of the brain to enrichment. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 73, n. 2, p. 211-220, jun. 2001.

DOETSCH, F. The glial identify of neural stem cells. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1127-1134, nov. 2003.

DOETSCH, F.; CAILLÉ, I.; LIM, D. A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cell**, v. 97, n. 6, p. 703-716, jun. 1999.

ELRLICH, R. B.; KAHN, S. A.; LIMA, F. R.; MURAS, A. G.; MARTINS, R. A.; LINDEN, R.; CHIARINI, L. B.; MARTINS, V. R.; MOURA NETO, V. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia**, v. 55, n. 16, p. 1690-1698, dez. 2007.

ERIKSSON, P. S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A. M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D. A.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313-1317, nov. 1998.

ERNST, A.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; PERL, S.; TISDALE, J.; POSSNERT, G.; DRUID, H. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. **Cell**, v. 156, n. 13, p. 1072-1083, fev. 2014.

EUSTACE, B. K.; JAY, D. G. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle**, v. 3, n. 9, p. 1098-1100, set. 2004.

FELICIANO, D. M.; BORDEY, A.; BONFATI, L. Noncanonical sites of adult neurogenesis in the mammalian brain. **Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.**, v. 7, n. 10, a.018846, set. 2015.

FUENTEALBA, L. C.; OBERNIER, K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Adult neural stem cells bridge their niche. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 698-708, jun. 2012.

GABRIEL, J. M.; OESCH, B.; KRETZSCHMAR, H.; SCOTT, M.; PRUSINER, S. B. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 89, n. 19, p. 9097-9101, out. 1992.

GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult brain. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 612-613, fev. 2002.

GAGE, F. H.; TEMPLE, S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 588-601, out. 2013.

GAJDUSEK, D. C.; GIBBS C. J.; ALPERS, M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. **Nature**, v. 209, n. 5025, p. 794-796, fev. 1966.

GAJDUSEK, D. C.; ZIGAS, V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. **The New England Journal of Medicine**, v. 257, n. 20, p. 974-978, nov. 1957.

GIL-PEROTÍN, S.; DURAN-MORENO, M.; CEBRIÁN-SILLA, A.; RAMÍREZ, M.; GARCÍA-BELDA, P.; GARCÍA-VERDUGO, J. M. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. **The Anatomical Record**, v. 296, n. 9, p. 1435-1452, set. 2013.

GOLDMAN, S. A.; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 80, n. 8, p. 2390-2394, abr. 1983.

GÖRITZ, C.; FRISÉN, J. Neural stem cells and neurogenesis in the adult. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 657-659, jun. 2012.

GOULD, E.; REEVES, A. J.; GROSS, C. G. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 548-552, out. 1999.

GRAF, T. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 6, p. 504-516, dez. 2011.

GRANER, E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; FORLENZA, O. V.; CABRAL, A. L.; VEIGA, S. S.; JULIANO, M. A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain. Res. Mol. Brain. Res.**, v. 76, n. 1, p. 85-92, mar. 2000a.

GRANER, E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R.; JAY, D. G.; BRENTANI, R. R. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Letters**, v. 482, n. 3, p. 257-260, out. 2000b.

GRIFFITH, J. S. Self-replication and scrapie. **Nature**, v. 215, n. 2105, p. 1043-1044, set. 1967.

GROSS, C. H. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 1, p. 67-73, out. 2000.

GUO, W.; PATZLAFF, N. E.; JOBE, E. M.; ZHAO, X. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. **Nature Protocols**, v. 7, n. 11, p. 2005-2012, nov. 2012.

HAJJ, G. N.; ARANTES, C. P.; DIAS, M. V.; ROFFÉ, M.; COSTA-SILVA, B.; LOPES, M. H.; PORTO-CARREIRO, I.; RABACHINI, T.; LIMA, F. R.; BERALDO, F. H.; PRADO, M. A.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 70, n. 17, p. 3211-3227, set. 2013.

HAJJ, G. N.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; SANTOS, T. G.; RIBEIRO, K. C.; JULIANO, M. A.; JACCHIERI, S. G.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 11, p. 1915-1926, jun. 2007.

HAN, D. W.; TAPIA, N.; HERMANN, A.; KATHRIN, H.; HÖING, S.; ARAÚZO-BRAVO, M. J.; ZAEHRES, H.; WU, G.; FRANK, S.; MORITZ, S.; GREBER, B.; YANG, J. H.; LEE, H. T.; SCHWAMBORN, J. C.; STORCH, A.; SCHÖLER, H. R. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 4, p. 465-472, abr. 2012.

HARTMANN, C. A.; MARTINS, V. R.; LIMA, F. R. High levels of cellular prion protein improve astrocyte development. **FEBS Letters**, v. 587, n. 2, p. 238-244, jan. 2013.

HERCULANO-HOUZEL, Suzana. **O cérebro nosso de cada dia** 2. ed. Rio de Janeiro: Vieira Lent, 2012. 224p.

HERRUP, K.; YANG, Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 368-378, mai. 2007.

HSIEH, J.; AIMONE, J. B.; KASPAR, B. K.; KUWABARA, T.; NAKASHIMA, K.; GAGE, F. H. IGF-1 instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 1, p. 111-122, jan. 2004.

HU W.; QIU, B.; GUAN, W.; WANG, Q.; WANG, M.; LI, W.; GAO, L.; SHEN, L.; HUANG, Y.; XIE, G.; ZHAO, H.; JIN, Y.; TANG, B.; YU, Y.; ZHAO, J.; PEI, G. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 2, p. 204-212, ago. 2015.

IHRIE, R. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Lake-front property: a unique germinal niche by the ventricles of the adult brain. **Neuron**, v. 4, p. 674-686, mai. 2011.

INTA, D.; CAMERON, H. A.; GASS, P. New neurons in the adult striatum: from rodents to humans. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 9, p. 517-523, set. 2015.

JANESICK, A.; WU, S. C.; BLUMBERG, B. Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 72, n. 8, p. 1559-1576, abr. 2015.

JENSEN, J. B.; PARMAR, M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. **Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 3, p. 153-161, dez. 2006.

KAPLAN, M. S.; HINDS, J. W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**, v. 197, n. 4308, p. 1092-1094, set. 1977.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.**, v. 7, n. 9, a.018812, set. 2015.

KOKOEVA, M. V.; YIN, H.; FLIER, J. S. Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 505, n. 2, p. 209-220, nov. 2007.

KORNACK, D. R.; RAKIC, P. Cell Proliferation Without Neurogenesis in Adult Primate Neocortex. **Science**, v. 294, n. 5549, p. 2127-2130, dez. 2001.

KRIEGSTEIN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 32, p. 149-184, jul. 2009.

LANCASTER, G. L. FEBBRAIO, M. A. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 23349-23355, jun. 2005a.

LANCASTER, G. L. FEBBRAIO, M. A. Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. **Exercise Immunology Review**, v. 11, p. 46-52, 2005b.

LAZARINI, F.; LLEDO, P. M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 1, p. 20-30, jan. 2011.

LEAL, W. G. Neurogênese no cérebro adulto: a morte de um dogma e o sonho de Cajal. **Neurociências**, v. 5, n. 1, p. 16-19, jan-mar. 2009.

LEE, A.; KESSLER, J. D.; READ, T. A.; KAISER, C.; CORBEIL, D.; HUTTNER, W. B.; JOHNSON, J. E.; WECHSLER-REYA, R. J. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 723-729, mai. 2005.

LEE, D. A.; BLACKSHAW, S. Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 30, n. 8, p. 615-621, dez. 2012.

LEKER, R. R.; SOLDNER, F.; VELASCO, I.; GAVIN, D. K.; ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A. McKAY, R. D. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. **Stroke**, v. 38, n. 1, p. 153-161, jan. 2007.

LI, X.; ZUO, X.; JING, J.; MA, Y.; WANG, J.; LIU, D.; ZHU, J.; DU, X.; XIONG, L.; DU, Y.; XU, J.; XIAO, X.; WANG, J.; CHAI, Z. ZHAO, Y.; DENG, H. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 2, p. 195-203, ago. 2015.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Adult neural stem cells stake their ground. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 10, p. 563-571, out. 2014.

LIMA, F. R.; ARANTES, C. P.; MURAS, A. G.; NOMIZO, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2164-2176, dez. 2007.

LINDEN, R.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R. R. Physiology of the prion protein. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 673-728, abr. 2008.

LINNARSSON, S. Sequencing Single Cells Reveals Sequential Stem Cell States. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 3, p. 251-252, set. 2015.

LLEDO, P.; ALONSO, M.; GRUBB. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nature Reviews**, v. 7, n. 3, p. 179-193, mar. 2006.

LLORENS-BOBADILLA, E.; ZHAO, S.; BASER, A.; SAIZ-CASTRO, G.; ZWADLO, K.; MARTIN-VILLALBA, A. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 3, p. 329-340, set. 2015.

LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R. M.; RIBEIRO, K. C.; BRANTANI, R. R.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11330-11339, dez. 2005.

LOPES, M. H.; SANTOS, T. G. Prion potency in stem cells biology. **Prion**, v. 6, n. 2, p. 142-146, abr-jun. 2012.

LOPES, Marilene Hohmuth. **Envolvimento da proteína prion celular e seus ligantes nos mecanismos de plasticidade neuronal e neuroproteção**. 2005. 218 p. Tese (Doutorado em Neurociências) – Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2005.

MABBOT, N. A.; MACPHERSON, G. G. Prions and their lethal journey to the brain. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 201-211, mar. 2006.

MALLUCCI G.; DICKINSON, A.; LINEHAN, J.; KLOHN, P. C.; BRANDNER, S.; COLLINGE, J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science**, v. 302, n. 5646, p. 871-874, out. 2003.

MANSON, J. C.; CLARKE, A. R.; HOOPER, M. L.; AITCHISON, L.; McCONNELL, I.; HOPE, J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Molecular Neurobiology**, v. 8, n. 2-3, p. 121-127, abr. 1994.

MARSHALL, G. P.; REYNOLDS, B. A.; LAYWELL, E. D. Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 8, n. 3, p. 141-145, jun. 2007.

MARTINS, V. R.; BERALDO, F. H.; HAJJ, G. N.; LOPES, M. H.; LEE, K. S.; PRADO, M. A.; LINDEN, R. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 12, n. 2, p. 63-86, set. 2010.

MARTINS, V. R.; GRANER, R.; GARCIA-ABREU, J.; DE SOUZA, S. J.; ERCADANTE, A. F.; VEIGA, S. S.; ZANATA, S. M.; NETO, S. M.; BRENTANI, R. R. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1376-1382, dez. 1997.

MENDEZ-OTERO, R.; ZAVERUCHA-DO-VALLE, C.; GUBERT, F.; FREITAS, G. R.; SANTIAGO, M. F. Regulation and function of neurogenesis in the adult vertebrate brain. **Braz. J. Bio. Res.**, v. 38, n. 10, p. 1553-1559, out. 2005.

MERKLE, F. T.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Neural stem cells in mammalian development. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, n. 6, p. 704-709, dez. 2006

MING, G. L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687-702, mai. 2011.

MIRANDA, A.; PERICUESTA, E.; RAMÍREZ, M. Á.; GUITIERREZ-ADAN, A. Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. **PLoS One**, v. 6, n. 4, e18422, abr. 2011.

NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 9, p. 3638-3646, set. 1989.

NIH – National Institutes of Health. The Adult Stem Cell. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/pages/chapter4.aspx>> Acesso em: 10 de janeiro de 2016.

NORRBY, E. Prions and protein-folding diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 270, n. 1, p. 1-14, mai. 2011.

OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M.; MCKINLEY, M. P.; KENT, S. B.; BARRY, R. A.; TEMPST, P.; TELOW, D. B.; HOOD, L. E.; PRUSINER, S. B.; WEISSMANN, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, v. 40, n. 4, p. 735-746, abr. 1985.

OKANO, H.; SAWAMOTO, K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci.**, v. 363, n. 1500, p. 2111-2122, jun. 2008.

PAN, K. M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R. J.; COHEN, F. E.; PRUSINER, S. B. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 90, n. 23, p. 10962-10966, dez. 1993.

PAREDES, M. F.; SORRELLS, S. F.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Brain size and limits to adult neurogenesis. **The Journal of Comparative Neurology**, doi: 10.1002/cne.23896, set. 2015.

PARENT, J. M. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. **Neuroscientist**, v. 9, n. 4, p. 261-272, ago. 2003.

PASTRANA, E.; SILVA-VARGAS, V.; DOETSCH, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 8., n. 5, p. 486-498, mai. 2011.

PLUCHINO, S.; ZANOTTI, L.; DELEIDI, M.; MARTINO, G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. **Brain Research Reviews**, v. 48, p. 211-219, jan. 2005.

PRODOMIDOU, K.; PAPASTEFANAKI, F.; SKLAVIADIS, T.; MATSAS, R. Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1674-1687, jun. 2014.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, n. 4542, p. 136-144, abr. 1982.

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M. R.; DEARMOND, S. J.; COHEN, F. E. Prion protein biology. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 337-348, mai. 1998.

PUSHIE, M. J.; PICKERING, I. J.; MARTIN, G. R.; TSUTSUI, S.; JIRIK, F. R.; GEORGE, G. N. Prion protein expression level alters regional copper, iron and zinc content in the mouse brain. **Metallomics**, v. 3, n. 2, p. 206-214, fev. 2011.

RAKIC, P. Neuroscience: immigration denied. **Nature**, v. 427, n. 6976, p. 685-686, fev. 2004.

RAMASAMY, S.; NARAYANAN, G.; SANKARAN, S.; YU, Y. H.; AHMED, S. Neural stem cell survival factors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 534, n. 1-2, p. 71-87, mar. 2013.

RAMÓN y CAJAL, S. **Degeneration and Regeneration of the Nervous System**, 1928. *apud* GROSS, C. H. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 67-73, out. 2000.

REYNOLDS, B. A.; RIETZE, R. L. Neural stem cells and Neurospheres—re-evaluating the relationship. **Nature Methods**, v. 2, n. 5, p. 333-336, mai. 2005.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1707-1710, mar. 1992.

ROJCZYK-GOLEBIEWSKA, E.; PALASZ, A.; WIADERKIEWICZ, R. Hypothalamic subependymal niche: a novel site of the adult neurogenesis. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 34, n. 5, p. 631-642, jul. 2014.

SAKUDO, A.; LEE, D. C.; LIS, S.; NAKAMURA, T.; MATSUMOTO, Y.; SAEKI, K.; ITOHARA, S.; IKUTA, K.; NODERA, T. PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, n. 1, p. 14-19, mar. 2005.

SANTOS, T. G.; BERALDO, F. H.; HAJJ, G. N.; LOPES, M. H.; ROFFEE, M.; LUPINACCI, F. C.; OSTAPCHENKO, V. G.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; MARTINS, V. R. Laminin- γ 1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca²⁺ mobilization in dorsal root ganglia neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 124, n. 2, p. 210-223, jan. 2013.

SANTOS, T. G.; QUEIROZ, G. T.; LOPES, M. H. **Papel da interação STI1-PrP^C na biologia de células tronco neurais nos contextos fisiológico e neoplásico**. Ago, 2010. *No prelo*.

SANTOS, T. G.; SILVA, I. R.; COSTA-SILVA, B.; LEPIQUE, A. P.; MARTINS, V. R.; LOPES, M. H. Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1126-1136, jul. 2011.

SCHMID, A. B.; LAGLEDER, S.; GRÄWERT, M. A.; RÖHL, A.; HAGN, F.; WANDINGER, S. K.; COX, M. B.; DEMMER, O.; DEMMER, O.; DEMMER, O.; RICHTER, K.; GROLL, M.; KESSLER, H.; BUCHNER, J. The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. **THE EMBO Journal**, v. 31, n. 6, p. 1506-1517, mar. 2012.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J. Bras. Neurocirurg.**, v. 16, n. 1, p. 13-19, dez. 2005.

SERI, B.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; MCEWEN, B. S.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. **Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7153-7156, set. 2001.

SERI, B.; HERRERA, D. G.; GRITTI, A.; FERRON, S.; COLLADO, L.; VESCOVI, A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cerebral cortex**, v. 16, n. 1, p. 103-111, jul. 2006.

SHIN, J.; BERG, D. A.; ZHU, Y.; SHIN, JY.; SONG, J.; BONAGUIDI, M. A.; ENIKOLOPOV, G.; NAUEN, D. W.; CRHISTIAN, K. M. MING, G. L.; SONG, H. Single-cell rna-seq with waterfall reveals molecular cascades underlying adult neurogenesis. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 3, p. 360-372, set. 2015.

SILVA, I. S. Neurogênese no sistema nervoso adulto de mamíferos. **Rev. da Biol.**, v. 3, p. 9-14, dez. 2009.

SIRKO, S.; NEITZ, A.; MITTMANN, T.; HORVAT-BRÖCKER, A.; VON HOLST, A.; EYSEL, U. T.; FAISSNER, A. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. **Brain**, v. 132, p. 2252-2264, mar. 2009.

SOHUR, U. S.; EMSLEY, J. G.; MITCHELL, B. D.; MACKLIS, J. D. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 361, n. 1473, p. 1477-1497, set. 2006.

SONG, H.; STEVENS, C. F.; GAGE, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 39-44, mai. 2002.

SONG, Y.; MASISON, D. C. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 34178-34185, out. 2005.

STAQUICINI, F. I.; DIAS-NETO, E.; LI, J.; SNYDER, E. Y.; SIDMAN, R. L.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Discovery of a functional protein complex of netrin-4, laminin gamma1 chain, and integrin alpha6beta1 in mouse neural stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 106, n. 8, p. 2903-2908, fev. 2009.

STEELE, A. D.; EMSLEY, J. G.; OZDINLER, P. H.; LINDQUIST, S.; MACKLIS, J. D. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. **Proc. Natl. Sci. U S A.**, v. 103, n. 9, p. 3416-3121, fev. 2006.

TAJBAKHSH, S. Stem cell: what's in a name? **Nature Reports Stem Cells**, jun. 2009. doi:10.1038/stemcells.2009.90.

TONG, C. K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. SnapShot: adult neurogenesis in the V-SVZ. **Neuron**, v. 81, n. 1, p. 220-220, jan. 2014.

URBÁN, N.; GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. **Front. Cell Neurosci.**, 8:396, doi: 10.3389/fncel.2014.00396, nov. 2014.

URSO, E.; MANNO, D.; SERRA, A.; BUCCOLIERI, A.; RIZZELLO, A.; DANIELI, A.; ACIERNO, R.; SALVATO, B.; MAFFIA, A. Role of the cellular prion protein in the neuron adaptation strategy to copper deficiency. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 6; p. 989-1001, ago. 2012.

VADODARIA, K. C.; GAGE, F. H. SnapShot: adult hippocampal neurogenesis. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1114-1114, fev. 2014.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature**, v. 2, n. 3, mar. 1999.

WALKER, T. L.; KEMPERMANN, G. One mouse, two cultures: isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 83, e51225, fev. 2014.

XIONG, Y.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. **Curr. Opin. Investing. Drugs.**, v. 11, n. 3, p. 298-308, mar. 2010.

YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 678-684, jun. 2012.

YAMASHITA, T.; NINOMIYA, M.; ACOSTA, P. H.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ADACHI, K.; KOJIMA, T.; HIROTA, Y.; KAWASE, T.; ARAKI, N.; ABE, K.; OKANO, H.; SAWAMOTO, K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. **J. Neurosci.**, v.26, n. 24, p. 6627-6636, jun. 2006.

YAMASHITA, Y. M.; NAKASEKO, Y.; SAMEJIMA, I.; KUMADA, H.; MICHAELSON, D.; YANAGIDA, M. 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. **Nature**, v. 384, n. 6606, p. 276-279, nov. 1996.

ZANATA, S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; HAJJ, G. N.; CHIARINI, L. B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A. R.; CABRAL, A. L.; LEE, K. S.; JULIANO, M. A.; DE OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S. G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for

cellular prion that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307-3316, jul. 2002.

Zentrum für Neurowissenschaften Zürich – ZNZ. Neuroanatomy of the rodent brain: General introduction. Disponível em:
<http://www.neuroscience.ethz.ch/education/ZNZ_Advanced_Knuesel.pdf> Acesso em: 26 de novembro de 2013.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-660, fev. 2008.

ZHENG, L.; ROEDER, R. G.; LUO, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 255-66, jul. 2003.