

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**MÔNICA GARCIA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO  
NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO  
NEURONAL NAS LINHAGENS SH-SY5Y, NEURO2A E PC12**

**PONTA GROSSA**

**2021**

**MÔNICA GARCIA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO  
NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO  
NEURONAL NAS LINHAGENS SH-SY5Y, NEURO2A E PC12**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre na área de Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Michele Dietrich Moura Costa

**PONTA GROSSA**

**2021**

S237 Santos, Mônica Garcia dos  
Avaliação da redução da concentração do soro fetal bovino na expressão de proteínas envolvidas na diferenciação neuronal nas linhagens SH-SY5Y, Neuro2a e PC12 / Mônica Garcia dos Santos. Ponta Grossa, 2021.  
64 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa.

1. Neuritos. 2. Neuroblastoma. 3. Feocromocitoma. 4. PrP<sup>c</sup>. 5. STI1. I. Costa, Michele Dietrich Moura. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. III.T.

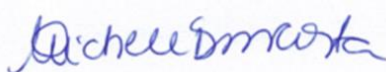
CDD: 574.87

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 08/2021, DA MESTRANDA Mônica Garcia dos Santos REALIZADO NO DIA 17 DE DEZEMBRO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

Aos dezessete dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte um, às 9h00min, em conformidade com o Art. 2º da portaria CAPES n. 36 de 19 de março de 2020, através do sistema de webconferencia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/UEPG, em seção pública, sob a presidência da Professora Dra Michele Dietrich Moura Costa reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda Mônica Garcia dos Santos na linha de pesquisa: Biologia Celular e Molecular do Desenvolvimento e de Processos Patológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Professora Drª Adriana Frohlich Mercadante (UFPR/PR) e Professor Dr José Rosa Gomes (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: “Expressão de proteínas envolvidas na neuritogênese em linhagens celulares sob redução de soro fetal bovino”. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADA. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Alteração de título: SIM

Sugestão: Avaliação da redução do soro fetal bovino na expressão de proteínas envolvidas na diferenciação neuronal nas linhagens celulares SHSY-5Y, Neuro2a e PC12.



---

Profª Drª Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR) – Presidente



---

Profª Drª Adriana Frohlich Mercadante (UFPR/PR) – Titular



---

Prof. Dr. José Rosa Gomes (DEBIO/UEPG/PR) – Titular

Ponta Grossa, 17 de dezembro de 2021.

Aos meus pais, Edival e Marly (*in  
memorian*), meus exemplos de vida.

E à minha família, Wal, Gabi e Gui, meu  
bem mais precioso.

À minha orientadora, pela oportunidade de sua valiosa orientação, contribuindo muito para meu crescimento.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela presença real em minha vida.

Aos meus pais, Edival e Marly (*in memoriam*) pelo amor e dedicação. Agradeço por me ensinar os verdadeiros valores da vida.

À minha família, meu esposo Waldemar por seu incentivo e apoio, mesmo nos momentos difíceis, e meus filhos, Gabriela e Guilherme, pela imensa alegria que me proporcionam e minha eterna gratidão por tê-los ao meu lado.

À Elizângela Gaioski, minha amiga que colaborou para o início da minha caminhada.

À minha orientadora Michele por sua atenção e paciência em transmitir seus conhecimentos durante todo o processo para concluir este trabalho.

Aos colegas, Ana Caroline Silva, por sua disposição em me ensinar as práticas do laboratório e Gabriel Elias Bueno, por prontamente me auxiliar nas rotinas do laboratório.

À Professora Kátia Sabrina Paludo por sua ajuda, tanto material quanto por suas dicas no laboratório. Ao Professor José Rosa Gomes por disponibilizar seu material.

Ao Professor Silvio Marques Zanata por nos ceder as linhagens celulares e anticorpos utilizados neste trabalho.

A todos do Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia pelo companheirismo e por compartilharem seus conhecimentos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização desta dissertação.

## Resumo

O processo de diferenciação celular nos neurônios envolve a neuritogênese, que é a formação de neuritos. Os neuritos são projeções do corpo celular que se transformam em dendritos e axônios. Quando essa mudança ocorre, a célula promove as sinapses, intercomunicando-se com as outras ao seu redor. Nos estudos *in vitro*, existem protocolos de diferenciação que usam fatores neurotróficos e/ou ácido retinóico, combinados com soro fetal bovino (SFB) em concentrações menores das usadas para manutenção celular. Entretanto, o papel da redução do SFB ainda precisa ser definido. Neste estudo, o objetivo foi avaliar se apenas a redução de 10% para 1% ou 0% SFB poderia alterar a expressão de proteínas envolvidas na diferenciação neuronal, da mesma forma que os protocolos já estabelecidos alteram. A proteína sinaptofisina, presente na membrana de vesículas sinápticas, foi utilizada por ser um marcador neuronal clássico. Este estudo também analisou a proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) e a proteína induzida por estresse 1 (STI1) como possíveis marcadores neuronais. Para isso, linhagens celulares de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), neuroblastoma murino (Neuro2a) e feocromocitoma de rato (PC12) foram cultivadas em condições normais de manutenção com 10% SFB, em condições de redução de SFB a 1% e 0% e em condições de diferenciação usando ácido retinóico (AR) para os neuroblastomas e fator de crescimento de nervo (NGF) para feocromocitoma. Após os tempos de diferenciação, as células foram processadas para obtenção dos extratos, que foram analisados por *western blot*, usando os seguintes anticorpos: anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup>, anti-STI1 e anti-actina. Nos experimentos com as células SH-SY5Y, a proteína sinaptofisina não foi detectada pelo anticorpo anti-sinaptofisina, indicando que não houve expressão desta proteína. Já a proteína PrP<sup>c</sup> apresentou resultados conflitantes, não sendo possível afirmar que sua expressão esteja envolvida na diferenciação. A linhagem Neuro2a apresentou maior expressão de sinaptofisina e de PrP<sup>c</sup> no grupo mantido a 1% SFB por 3 dias em relação ao grupo 10% SFB, tanto no ensaio de redução de SFB, como no ensaio de diferenciação com AR, mostrando-se independente de AR. No ensaio de redução de SFB, as células PC12 mantidas a 0% SFB apresentaram aumento na expressão das proteínas sinaptofisina e PrP<sup>c</sup> em relação ao grupo 10% SFB. No ensaio de diferenciação da linhagem PC12, foi possível observar o aumento de expressão de sinaptofisina nos grupos 1% SFB em relação ao grupo 10% SFB, mesmo sem NGF, e mostrou-se dependente de tempo. Porém, os grupos 1% SFB não apresentaram aumento na expressão de PrP<sup>c</sup> em relação ao grupo 10% SFB. Quanto à proteína STI1, não foi possível observar diferenças de expressão entre as condições, em nenhuma das linhagens. Conclui-se que, a redução de soro pode ser suficiente para indução da diferenciação nos estudos com PC12 mantidas a 0% SFB e em células Neuro2a nas condições de redução de SFB, mantidas a 1% SFB, utilizando como marcador neuronal sinaptofisina e, possivelmente, PrP<sup>c</sup> como novo marcador.

**Palavras-chave:** neuritos; neuroblastoma; feocromocitoma; PrP<sup>c</sup>; STI1.

## Abstract

Cell differentiation to neurons involves neuritogenesis, i. e., neurites formation. Neurites are protrusions of soma that become dendrites and axons. When this change occurs, cell promotes synapses, establishing neuronal connections. *In vitro* studies, there are differentiation protocols using neurotrophic factors and/or retinoic acid under fetal bovine serum (FBS) concentration reduction that differ normal conditions. However, the role of FBS reduction still needs to be defined. The aim of this study was to test whether only reduction of 10% to 1% or 0% FBS could alter proteins expression, likewise established protocols already alter. Synaptophysin, protein of synaptic vesicles, was used as classic neuronal marker. This study also analyzed cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) and stress inducible protein 1 (STI1) as possible neuronal markers. For this, human neuroblastoma (SH-SY5Y), murine neuroblastoma (Neuro2a) and rat pheochromocytoma (PC12) cell lines were cultivated under normal conditions with 10% FBS, FBS reduction conditions of 1% and 0% and differentiation conditions using retinoic acid (RA) for neuroblastomas and nerve growth factor (NGF) for pheochromocytoma. After differentiation time, cells were processed to obtain extracts, which were analyzed by western blot, using following antibodies: antisynaptophysin, anti-PrP<sup>c</sup>, anti-STI1 and anti-actin. In SH-SY5Y cells experiments, synaptophysin was not detected by antibody anti-synaptophysin, indicating there was no protein expression. PrP<sup>c</sup> protein presented conflicting results and it was not possible to say its involvement in differentiation. Neuro2a cell line presented higher expression of synaptophysin and PrP<sup>c</sup> in group maintained at 1% FBS for 3 days in relation to the 10% FBS group, both in FBS reduction assay, and in RA differentiation assay, showing to be independent of RA. In FBS reduction assay, PC12 cells maintained at 0% FBS showed an increase in the expression of synaptophysin and PrP<sup>c</sup> proteins in relation to 10% FBS group. In differentiation assay of PC12 cell line, it was possible to observe increase of synaptophysin expression in groups 1% FBS in relation to group 10% FBS, even without NGF, and it was shown to be time dependent. However, groups 1% FBS did not present an increase in PrP<sup>c</sup> expression in relation to group 10% FBS. Regarding STI1 protein, it was not possible to observe differences of expression between conditions, neither in cell lines. In conclusion, serum reduction can be sufficient to induce differentiation in studies with PC12 maintained to 0% FBS and in Neuro2a cells under FBS reduction conditions, maintained to 1% FBS, using synaptophysin as neural marker and possibly PrP<sup>c</sup> as a new marker.

**Key- words:** neurites; neuroblastoma; pheochromocytoma; PrP<sup>c</sup>; STI1.

## Sumário

|                                                                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução</b>                                                                                                                                                                | <b>10</b> |
| <b>2 Objetivos</b>                                                                                                                                                                 | <b>11</b> |
| 2.1 Objetivo Geral                                                                                                                                                                 | 11        |
| 2.2 Objetivos Específicos                                                                                                                                                          | 11        |
| <b>3 Revisão de Literatura</b>                                                                                                                                                     | <b>12</b> |
| 3.1 Neuritogênese                                                                                                                                                                  | 12        |
| 3.2 Linhagens Celulares como Modelos de Diferenciação Neuronal                                                                                                                     | 17        |
| 3.2.1 Estudos com neuroblastoma humano (SH-SY5Y)                                                                                                                                   | 20        |
| 3.2.2 Estudos com neuroblastoma murino (Neuro2a)                                                                                                                                   | 21        |
| 3.2.3 Estudos com feocromocitoma de rato (PC12)                                                                                                                                    | 22        |
| 3.3 Redução da Concentração de Soro Fetal Bovino no Processo de Diferenciação                                                                                                      | 24        |
| 3.4 Proteínas Expressas na Fase de Diferenciação                                                                                                                                   | 25        |
| <b>4 Material e Métodos</b>                                                                                                                                                        | <b>30</b> |
| 4.1 Linhagens Celulares                                                                                                                                                            | 30        |
| 4.2 Anticorpos                                                                                                                                                                     | 30        |
| 4.3 Validação dos Anticorpos Anti- sinaptofisina, Anti- PrP <sup>c</sup> e Anti- STI1                                                                                              | 31        |
| 4.4 Experimento para Análise de Expressão de Proteínas nas Linhagens Celulares sob Redução de Soro                                                                                 | 31        |
| 4.5 Ensaio de Diferenciação para as Linhagens de Neuroblastoma SH-SY5Y e Neuro2a Tratadas com Ácido Retinóico                                                                      | 32        |
| 4.6 Ensaio de Diferenciação da Linhagem de Feocromocitoma PC12 Tratada com Fator de Crescimento de Nervo (NGF)                                                                     | 34        |
| 4.7 Análise da Expressão de Sinaptofisina, PrP <sup>c</sup> e STI1 em Linhagens Celulares pelo Método de <i>Western Blot</i>                                                       | 35        |
| <b>5 Resultados</b>                                                                                                                                                                | <b>37</b> |
| 5.1 Avaliação dos Anticorpos Anti-sinaptofisina, Anti-prp <sup>c</sup> e Anti-STI1                                                                                                 | 37        |
| 5.2 Expressão de Sinaptofisina, PrP <sup>c</sup> e STI1 nas Linhagens Celulares em Condição de Redução de Soro Fetal Bovino por 3 Dias                                             | 38        |
| 5.3 Expressão de Sinaptofisina, PrP <sup>c</sup> e STI1 nas Linhagens de Neuroblastoma SH-SY5Y e Neuro2a Mantidas em DMEM 1% SFB e Comparação com o Tratamento com Ácido Retinóico | 40        |

|                                                                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.4 Expressão das Proteínas Sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na Linhagem de Feocromocitoma PC12 Mantidas a 1% SFB e Comparação com o Tratamento com NGF .....</b> | <b>43</b> |
| <b>6 Discussão .....</b>                                                                                                                                                  | <b>45</b> |
| <b>6.1 Perspectivas .....</b>                                                                                                                                             | <b>52</b> |
| <b>7 Conclusão .....</b>                                                                                                                                                  | <b>54</b> |
| <b>Referências .....</b>                                                                                                                                                  | <b>55</b> |

## 1 Introdução

Para que ocorra o desenvolvimento do sistema nervoso, as células recém formadas passam por um processo de diferenciação. As células que darão origem aos neurônios mudam seu formato, por meio de sinais, tornando-se assimétricas. Os sinais que induzem diferenciação são provenientes de moléculas chamadas neurotrofinas. As neurotrofinas ativam vias de sinalização, fazendo com que haja uma reorganização das proteínas do citoesqueleto. Este rearranjo do citoesqueleto, permite que a célula inicie a polarização neuronal, onde projeções do corpo celular se desenvolverão e formarão os neuritos. A formação dos neuritos é também denominada de neuritogênese. O processo de neuritogênese promove o crescimento dos neuritos até a sua maturação, originando dendritos ou axônios, que apresentam funções distintas.

Para o entendimento de processos de diferenciação, estudos *in vitro* utilizam linhagens celulares como neuroblastomas (SH-SY5Y e Neuro2a) e feocromocitoma (PC12) que, quando estimuladas com ácido retinóico (AR) e fator de crescimento de nervo (NGF), mimetizam a diferenciação neuronal. Para avaliar se o processo de diferenciação ocorre nessas linhagens, pode ser feita a análise da expressão de proteínas específicas de neurônios. Embora tais protocolos de diferenciação sejam bem estabelecidos, eles apresentam um alto custo por conta das drogas e/ou neurotrofinas necessárias. Sendo assim, neste trabalho foram realizados experimentos para avaliar se a redução de soro fetal bovino (SFB) poderia induzir a diferenciação das linhagens SH-SY5Y, PC12 e Neuro2a. Para validar o processo de diferenciação, a análise da expressão de proteínas como sinaptofisina, que é uma proteína específica de neurônios maduros, foi avaliada. Além da sinaptofisina, a expressão da proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) e da proteína induzida por estresse 1 (STI1) foram também avaliadas na tentativa de utilizar essas duas proteínas envolvidas com o processo de neuritogênese, como marcadores do processo de diferenciação neuronal.

As observações dos experimentos realizados neste trabalho apresentam resultados interessantes e promissores para algumas moléculas das linhagens avaliadas, indicando que poderão ser futuramente utilizados como estratégias para estudo de diferenciação neuronal *in vitro*.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à diferenciação neuronal nas linhagens celulares mantidas em redução da concentração de soro fetal bovino (SFB).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 em linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y; Neuro2a) e feocromocitoma (PC12) mantidas a 1% e 0% de soro fetal bovino.
- Analisar a expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e murino (Neuro2a) tratadas com ácido retinóico e comparar com células mantidas a 1% de SFB.
- Analisar a expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem de feocromocitoma (PC12) tratada com fator de crescimento de nervo (NGF) e comparar com células mantidas a 1% de SFB.
- Avaliar se PrP<sup>c</sup> e STI1 podem ser considerados marcadores da diferenciação neuronal.

### 3 Revisão de Literatura

#### 3.1 Neuritogênese

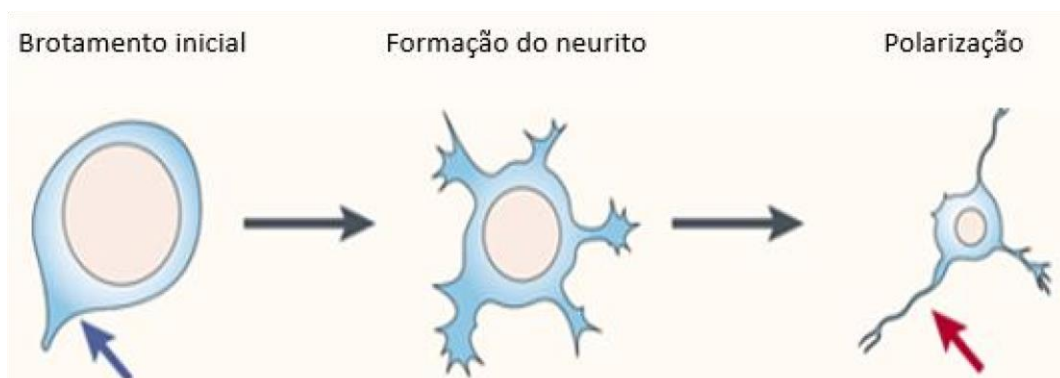
Durante o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, ocorre a migração e a diferenciação das células progenitoras neurais (YOUNG *et al.*, 2008). Através de sinais indutores, os neuroblastos (ou neurônios imaturos) migram do seu local de origem para seu destino final (KHODOSEVICH; MONYER, 2011). Durante esse processo de migração, os neuroblastos diferenciam-se e prolongamentos são projetados do corpo celular (AGRAWAL; WELSHHANS, 2021).

Os prolongamentos mudam a morfologia da célula, tornando-a assimétrica (FLYNN, 2013). Essa mudança da simetria tem como premissa a polarização, no qual a membrana plasmática apresentará regiões distintas (LOUBET *et al.*, 2012).

Essas extensões do corpo celular são chamadas de neuritos, que indicam o início do processo de diferenciação. O processo de formação dos neuritos é denominado neuritogênese (YOSHIMURA; ARIMURA; KAIBUCHI, 2006).

A neuritogênese é caracterizada por três estágios (Figura 1): brotamento, formação do neurito, onde ocorrerá o seu alongamento, e polarização, com a maturação da sinapse (XIAO; LIU, 2003). Esse processo leva a intercomunicação neuronal durante o desenvolvimento embrionário (MEUR; MOHEBIANY; O'CONNOR, 2009) e também possibilita a regeneração pós- injúria (KUDO *et al.*, 2015).

Figura 1- Desenho esquemático do processo de neuritogênese

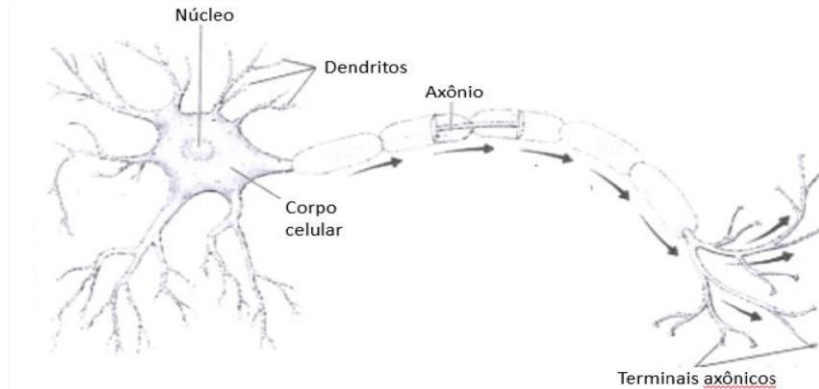


Fonte: Adaptado de SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3. p. 694-704, 2002.

Nota: O processo de neuritogênese apresenta as fases de brotamento (seta azul), formação do neurito e polarização da célula nervosa, isto é, formação do axônio (seta vermelha) e dendritos.

Essas projeções originam os dendritos e os axônios (Figura 2) (ZHAO *et al.*, 2019). Os dendritos são prolongamentos curtos e ramificados que partem de todas as regiões do corpo celular e os axônios são prolongamentos longos cuja porção final se ramifica, formando os terminais axônicos (MOULSON; NELSON, 2008).

Figura 2- Representação de um neurônio apresentando os dendritos e axônio



Fonte: Adaptado de MOULSON, M. C.; NELSON, C. A. Neurological Development. **Elsevier**, p.414-424, 2008.

Através das sinapses, os axônios e dendritos realizam a comunicação com outras células, pela liberação de moléculas sinalizadoras, denominadas neurotransmissores. Os axônios fazem parte da região pré-sináptica, enviando esses neurotransmissores para os dendritos. E os dendritos fazem parte da região pós-sináptica pelo qual captam esses sinais através de receptores da membrana, continuando a transmissão e estabelecendo a rede neuronal (MOULSON; NELSON, 2008; TORRES; INESTROSA, 2018).

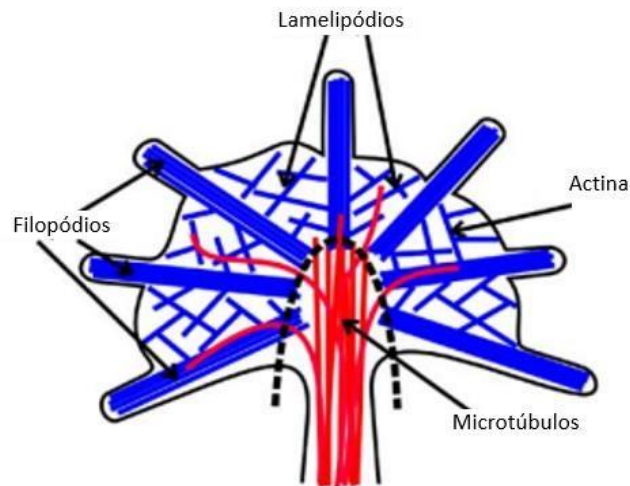
A morfologia celular diferenciada dos neurônios requer que proteínas necessárias para transmissão de tais sinais sejam produzidas nas regiões pré- e pós-sinápticas, que são locais afastados do corpo celular, a fim de garantir uma resposta rápida (RAJGOR; WELLE; SMITH, 2021).

Durante o processo de neuritogênese, o que leva o neurito se tornar axônio ou dendrito é a regulação dos canais iônicos, bem como a reorganização do citoesqueleto e dos processos de endocitose e exocitose, promovendo sua elongação e estabilidade (MELDONESI, 2011).

O rearranjo do citoesqueleto acontece por meio da dinâmica dos filamentos de actina e disposição dos microtúbulos (FLYNN, 2013). A força interna gerada por essas proteínas conduz à protrusão do neurito (SILVA; DOTTI, 2002).

Esta reorganização, primeiramente, gera a formação dos filopódios e dos lamelipódios (Figura 3). Os filopódios e lamelipódios são estruturas citoplasmáticas com formato pontiagudo e de leque, respectivamente (MOULSON; NELSON, 2008).

Figura 3- Desenho esquemático da organização estrutural do citoesqueleto formando lamelipódios e filopódios



Fonte: Adaptado de TOJIMA, T.; ITO, E. Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 183–193, 2004.

Contribuindo para a polarização da célula, os filamentos de actina formam estas estruturas, que são dependentes da ativação de determinadas proteínas (as Rho GTPases) (TOJIMA; ITO, 2004). Para gerar a resposta celular, é necessária a ativação de proteínas como a proteína de ciclo de divisão celular 42 (Cdc 42), substrato C3 da toxina botulínica relacionada à Ras 1 (Rac 1) e da proteína Ras (Rho) (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001). A ativação de Cdc42 gera a formação dos filopódios, Rac 1 forma os lamelipódios e Rho as fibras de estresse (HALL, 1998).

A nucleação e a elongação, etapas da polimerização da actina, são realizadas por proteínas que se ligam aos filamentos, contribuindo para estabelecer sua organização (SAINATH; GALLO, 2015). A dinâmica das proteínas como, por exemplo, as proteínas relacionadas à actina (Arp2/3), conduzem os filamentos de actina em direção à membrana (FLYNN, 2013). A estrutura formada pela actina garante várias funções: manutenção do formato, adesão e migração (SHIGETA *et al.*, 2006).

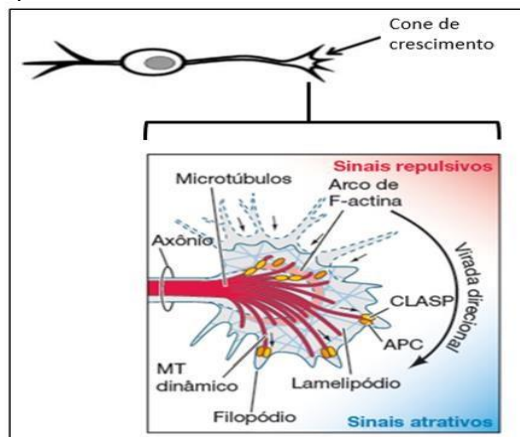
O equilíbrio entre a montagem e desmontagem dos filamentos actina corroboram para o sucesso da neuritogênese (FLYNN, 2013). Logo, proteínas

incumbidas na polimerização, como também as que exercem o papel na despolimerização, proporcionam este equilíbrio necessário durante a reorganização da disposição do citoesqueleto (SAINATH; GALLO, 2015).

Assim como nos filamentos de actina, os microtúbulos recebem sinais e se inserem na estrutura do filopódio, interagem com esses filamentos, sendo este, outro passo muito importante para o crescimento do neurito (SAINATH; GALLO, 2015). Os microtúbulos também são regulados por proteínas como as proteínas associadas aos microtúbulos (MAP2) e se organizam formando feixes nos locais da iniciação do neurito, consolidando o formato desta estrutura (FLYNN, 2013).

Com esta reorganização do citoesqueleto, forma uma região que está na extremidade do neurito, chamada cone de crescimento (Figura 4) (KHODOSEVICH; MONYER, 2011). Os receptores do cone de crescimento reagem ao ambiente extracelular; assim, ora são atraídos, ora repelidos (AGRAWAL; WELSHHANS, 2021). Os sinais podem vir da matriz extracelular ou de células vizinhas (MOULSON; NELSON, 2008), direcionando o cone de crescimento ao alvo (AGRAWAL; WELSHHANS, 2021).

Figura 4- Representação esquemática do direcionamento do cone de crescimento



Fonte: Adaptado de GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019 e de TOJIMA, T.; ITO, E. Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 183–193, 2004.

Nota: As proteínas CLASP e APC nas extremidades dos microtúbulos promovem sua extensão ou inibem o crescimento, de acordo com o estímulo.

Os neurônios além de apresentarem morfologia que reflete sua função, apresentam também compartimentalização especializada. Durante a neuritogênese, a célula promove processos de endocitose e exocitose realizados pela atividade das

RabGTPases do Complexo de Golgi, como também RabGTPases de endossomos precoces, tardios e de reciclagem. O efeito das RabGTPases depende do tipo de proteína, podendo estar envolvidas no tráfego de membrana, realocização da actina e também na regulação de receptores da membrana (VILLARROEL-CAMPOS *et al.*, 2014).

Em modelos usando a linhagem feocromocitoma de rato (PC12), tratadas com o fator de crescimento de nervo (NGF), pode-se observar que vesículas de núcleos densos que secretam aminas se mantêm nas extremidades dos neuritos, facilitando a sua rápida reciclagem, analogamente às vesículas sinápticas (BAUER *et al.*, 2004).

O NGF, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina 4/5 (NT-4/5) são substâncias que participam ativamente do processo de diferenciação dos neurônios (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001; PANDINI *et al.*, 2016), contribuindo para a manutenção fisiológica dos neurônios, através da regulação da expressão de neurotransmissores, canais iônicos e receptores (HUANG; REICHARDT, 2001). Essas substâncias influenciam no crescimento dos neuritos e também na reparação dos neurônios (SHUKLA; TEKWANI, 2020).

A função das neurotrofinas ou fatores neutróficos (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5) é gerar o estímulo e orientação para o cone de crescimento dos neurônios. Entretanto, há casos em que BDNF e NT-3 podem promover o colapso do cone de crescimento, sendo dependente dos níveis de AMP cíclico (cAMP) (LYKISSAS *et al.*, 2007).

Para gerar a resposta, é necessária a ligação dessas moléculas na membrana do neurônio por meio dos receptores de neurotrofinas (NTR) (EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2004). Existem duas classes de NTR: receptores tirosina cinases e receptor p75<sup>NTR</sup> (LEE *et al.*, 2001; PANDINI *et al.*, 2016).

Receptores tirosina cinases fazem a ligação específica para cada fator neurotrófico. Assim temos que, TrkA é ativado por NGF, TrkB por BDNF e NT-4 e TrkC por NT-3. Esta última neurotrofina também se liga à TrkA e TrkB, porém a ativação não é muito eficaz (HUANG; REICHARDT, 2001).

Já p75<sup>NTR</sup> é o receptor que tende a combinar-se com todos os fatores neurotróficos (BEGLOVA *et al.*, 2000). Assim sendo, por exemplo, o NGF age tanto em TrkA quanto p75<sup>NTR</sup> (YOUNG *et al.*, 2008).

Após a ligação do NGF ao seu receptor, ocorre a endocitose desse complexo ligante/receptor, podendo estes serem degradadas ou reciclados (BOTHWELL, 2016; PANDINI *et al.*, 2016).

A afinidade do complexo ligante- receptor é adquirida através de sequências de aminoácidos presentes ou a falta delas no domínio do receptor, contribuindo para o reconhecimento da específica neurotrofina (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001). Sem este reconhecimento, não haveria resposta de sinalização para proliferação, sobrevivência, compartimentalização, organização do citoesqueleto e diferenciação neuronal (HUANG; REICHARDT, 2001).

### **3.2 Linhagens Celulares como Modelos de Diferenciação Neuronal**

O uso de modelos celulares possibilita entender melhor os processos de diferenciação neuronal que acontecem durante o desenvolvimento embrionário. Como modelo de estudo, alguns grupos utilizam as células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (HU *et al.*, 2010) e as células progenitoras neurais humanas (hNPC) para ensaios de proliferação e de diferenciação, porém, necessitam de consentimento ético (PANSRI *et al.*, 2021).

Modelos de linhagens celulares (Quadro 1) permitem que o estudo científico seja facilitado, pois não requer o crivo da bioética como nas culturas de células neuronais primárias (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; KRISHNA *et al.*, 2014).

As linhagens celulares são denominadas imortais, pois durante sua proliferação, geram clones com crescimento indefinido se as condições de cultivo forem adequadas (LODISH *et al.*, 2014). Não somente as condições da cultura celular, mas também a aplicabilidade da concentração de substâncias químicas reflete no uso e na eficácia das células *in vitro* (FALSAFI *et al.*, 2019).

Quadro 1- Lista de algumas linhagens celulares para estudo de diferenciação.

| Linhagem celular | Doença/oranismo        | Referências                     |
|------------------|------------------------|---------------------------------|
| SH-SY5Y          | neuroblastoma humano   | XIE; HU; LI, 2010               |
| HTB-11           | neuroblastoma humano   | HARASYM; MCANDREW; GOMEZ, 2017  |
| IMR-32           | neuroblastoma humano   | HARASYM; MCANDREW; GOMEZ, 2017  |
| SK-N-BE          | neuroblastoma humano   | SILVAGNO <i>et al.</i> , 2002   |
| Neuro2a          | neuroblastoma humano   | DICKEY <i>et al.</i> , 2004     |
| PC12             | feocromocitoma de rato | MULLENBROCK; SHAH; COOPER, 2011 |

Fonte: Adaptado de DICKEY, C. A.; MESQUITA, D. D.; MORGAN, D.; PENNYPACKER, K. R. Induction of memory-associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells. **Neuroscience Letters**, v.366, p. 10–14, 2004, HARASYM, E.; MCANDREW, N.; GOMEZ, G. Sub-micromolar concentrations of retinoic acid induce morphological and functional neuronal phenotypes in SK-N-SH neuroblastoma cells. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal**, v. 53, p. 798–809, 2017, MULLENBROCK, S.; SHAH, J.; COOPER, G. M. Global Expression Analysis Identified a Preferentially Nerve Growth Factor-induced Transcriptional Program Regulated by Sustained Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and AP-1 Protein Activation during PC12 Cell Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 45131–45145, 2011, SILVAGNO, F.; GUARNIERI, V.; CAPIZZI, A.; PESCARMONA, G. P. Synergistic effect of retinoic acid and dehydroepiandrosterone on differentiation of human neuroblastoma cells. **FEBS Letters**, v. 532, p. 153-158, 2002 e XIE, H.; HU, L.; LI, G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chin Med J**, v. 123, n. 8, p.1086-1092, 2010.

O estudo com essas linhagens celulares permite entender detalhes sobre vias de sinalização e expressão gênica relacionados a diferenciação neuronal (CANTELLI *et al.*, 2002).

No quadro 2 estão alguns exemplos de protocolos de diferenciação destas três linhagens em outros trabalhos, demonstrando a possibilidade da utilização tanto de substâncias químicas como o ácido retinóico (AR) e/ou fatores neurotróficos como NGF e BDNF, como dos marcadores neuronais.

Quadro 2- Relação de exemplos de protocolos das linhagens celulares escolhidas

| Linhagens celulares | Protocolo de diferenciação | Marcadores neuronais            | Referências                     |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| SH-SY5Y             | NGF                        | MAP, Tau, sinaptofisina         | LO PRESTI <i>et al.</i> , 1992  |
| SH-SY5Y             | AR e BDNF                  | GAP-43, NSE, NF-H, MAP2, Tau    | ENCINAS <i>et al.</i> , 2000    |
| SH-SY5Y             | AR                         | sinaptofisina                   | BORSANI <i>et al.</i> , 2020    |
| SH-SY5Y             | AR e BDNF                  | MAP2, Tau, PSD95, sinaptofisina | HROMADKOVA <i>et al.</i> , 2020 |
| Neuro2a             | AR                         | Tub                             | BLANCO; CAMELO; CARRI, 2001     |
| Neuro2a             | NGF                        | GAP-43                          | DICKEY <i>et al.</i> , 2004     |
| Neuro2a             | AR                         | sinaptofisina, NeuN             | CHAUDHARI; RAVANAN, 2018        |
| Neuro2a             | AR                         | MAP2                            | YOU <i>et al.</i> , 2020        |
| PC12                | NGF                        | GAP-43, Tub, sinaptofisina      | MEUR; MOHEBIANY; O'CONNOR, 2009 |
| PC12                | NGF                        | NF                              | MULLENBROCK; SHAH; COOPER, 2011 |
| PC12                | NGF                        | DCX, NeuN                       | WIATRAC <i>et al.</i> , 2020    |

Fonte: BLANCO, V.; CAMELO, J. L.; CARRI, N. G. Growth inhibition, morphological differentiation and stimulation of survival in neuronal cell type (Neuro-2a) treated with trophic molecules. **Cell Biology International**, v. 25, n. 9, p. 909–917, 2001, BORSANI, E.; BUFFOLI, B.; BONAZZA, V.; BRUNELLI, G.; MONINI, L.; INCHINGOLO, F.; BALLINI, A.; REZZANI, R.; RODELLA, L. F. In vitro effects of concentrated growth factors (CGF) on human SH-SY5Y neuronal cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 304-314, 2020, CHAUDHARI, N.; RAVANAN, P. Bardoxolone methyl induces neuritogenesis in Neuro2a cells. **Pharmacological Reports**, v. 70, p. 730–736, 2018, DICKEY, C. A.; MESQUITA, D. D.; MORGAN, D.; PENNYPACKER, K. R. Induction of memory-associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells. **Neuroscience Letters**, v.366, p. 10–14, 2004, ENCINAS, M.; IGLESIAS, M.; LIU, Y.; WANG, H.; MUHAISEN, A.; CEÑA, V.; GALLEGU, C.; COMELLA, J. X. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 991-1003, 2000, HROMADKOVA, L.; BEZDEKOVA, D.; PALA, J.; WEISS, S. S.; TJERNBERG, L. O.; HOSCHL, C.; OVSEPIAN, S. V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive neurons. **Molecular Cell Research**, v.1867, p. 1-11, 2020, LO PRESTI, P.; POLUHA, W.; POLUHA, D. K.; DRINKWATER, E.; ROSS, A. H. Neuronal differentiation triggered by blocking cell proliferation. **Cell Growth and Differentiation**, v. 3. p. 627-635, 1992, MEUR, A. M.; MOHEBIANY, A. N.; O'CONNOR, T. P. Varicones and Growth Cones: Two Neurite Terminals in PC12 Cells. **Plos One**, v. 4, 2009, MULLENBROCK, S.; SHAH, J.; COOPER, G. M. Global Expression Analysis Identified a Preferentially Nerve Growth Factor-induced Transcriptional Program Regulated by Sustained Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and AP-1 Protein Activation during PC12 Cell Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 45131–45145, 2011, WIATRAC, B.; KUBIS-KUBIAK, A.; PIWOWAR, A.; BARG, E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, v. 9, n. 958, p. 1-15, 2020 e YOU, Q.; GONG, Q.; HAN, Y.; PI, R.; DU, Y.; DONG, S. Role of miR-124 in the regulation of retinoic acid-induced Neuro-2A cell differentiation. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 6, p. 1133-1139, 2020.

Nota: Abreviações: Fator de crescimento de nervo (NGF), fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), ácido retinóico (AR), proteína associada aos microtúbulos (MAP), proteína tau (Tau), sinaptofisina, proteína associada ao crescimento axonal (GAP-43), enolase específica neuronal (NSE), neurofilamento (NF), proteína de densidade pós-sináptica (PSD95), tubulina (Tub), doublecortina (DCX), proteína nuclear neuronal (NeuN).

No que diz respeito aos modelos de diferenciação neuronal, no trabalho aqui apresentado, as linhagens celulares utilizadas foram a SH-SY5Y, Neuro2a e PC12, todas cedidas pelo professor Sílvia Marques Zanata- Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### 3.2.1 Estudos com neuroblastoma humano SH-SY5Y

A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, subclone de SK-N-SH (BIEDLER; HELSON; SPENGLER, 1973), é uma linhagem celular proveniente de um neuroblastoma infantil (HROMADKOVA *et al.*, 2020).

O uso desta linhagem em protocolos acrescidos de NGF, por exemplo, nem toda população se diferencia, pois algumas células continuam se proliferando. E com a retirada desta neurotrofina, os neuritos regredem. Para uma eficaz diferenciação, utiliza-se a neurotrofina e afidicolina, proveniente de fungos, contribuindo para efeito sinérgico (LO PRESTI *et al.*, 1992). Tal circunstância do efeito de NGF pode ser devida à baixa expressão do receptor TrkA nestas células (EGGERT *et al.*, 2000).

Assim, alguns protocolos que usam a linhagem SH-SY5Y, é utilizada outra molécula indutora, o ácido retinóico (AR). A diferenciação usando AR leva a um aumento no nível da expressão do receptor TrkB, sendo que este receptor é capaz de se ligar ao BDNF e promover a diferenciação (ENCINAS *et al.*, 2000). O AR é uma substância que age tanto na proliferação celular quanto na diferenciação de neuroblastomas (TIBERIO *et al.*, 1997). Seu efeito inibitório na proliferação celular resulta no aparecimento de neuritos. Porém, o AR também pode proporcionar efeito apoptótico (HARASYM; MCANDREW; GOMEZ, 2017).

Foi demonstrado que a neuritogênese em SH-SY5Y induzida pelo tratamento com ácido retinóico (AR) é resultante da ativação da transglutaminase tissular (TGase), Rac1, Cdc42 e inibição do gene *N-myc*, pois a amplificação deste gene está associada a proliferação celular (JOSHI *et al.*, 2007). Da mesma forma que o AR, outras substâncias efetivam a diferenciação destas células, sendo elas: 12- O-tetradecanoil- forbol- 13 acetato (TPA) e dibutilil AMP cíclico (dbcAMP) (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Há também o polipeptídeo ativador da adenilato ciclase da pituitária 38 (PACAP- 38) que está envolvido na diferenciação de SH-SY5Y, sendo dependente de AMP cíclico (cAMP), ativando ERK e p38 MAPK (MONAGHAN *et al.*, 2008).

Além disso, o tratamento com AR acrescido do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) induz a maturação neuronal pela via de sinalização fosfoinosítídeo 3-cinase (PI3K), AKT e proteína de ligação a CRE (CREB) (YANG *et al.*, 2020). Assim como a associação de AR e somatostatina (SST) resulta em um fenótipo neuronal,

pela via de sinalização de ERK, expressando proteínas de associação a microtúbulos como Tau e MAP2, que são marcadores neuronais (HROMADKOVA *et al.*, 2020; PAIK; SOMVANSI; KUMAR, 2019). O AR também induz proteínas de neurofilamento (NF), outro neuromarcador, que contribui na análise da organização axonal (SHIGETA *et al.*, 2006; TEPPOLA *et al.*, 2016).

Encinas *et al.* (1999) demonstraram que quando células SH-SY5Y são tratadas com AR, ocorre a ativação dos receptores TrkB e TrkC e, ao adicionar aditivos como BDNF, NT4/5, e NT-3 ao meio de cultivo, ocorre a ativação de proteínas cinases (MAPK/ERKs) e PI3K que ativa a proteína cinase B (Akt ou PKB), induzindo a neuritogênese e sobrevivência.

### 3.2.2 Estudos com neuroblastoma murino (Neuro2a)

Outro tipo de neuroblastoma usado para estudo de diferenciação neuronal é a linhagem Neuro2a, proveniente de *Mus musculus* (ATCC- CCL131). Este neuroblastoma é derivado da crista neural e, por ocasião da diferenciação, apresenta características fenotípicas neuronais (TREMBLAY *et al.*, 2010).

É possível observar o início do desenvolvimento dos neuritos nessas células mesmo submetidas às condições normais, na qual é acrescentado ao meio de cultivo 10% de soro fetal bovino (BRYAN; CAI; LIU, 2006).

Contudo, há protocolos de diferenciação que fazem uso de neurotrofinas. Nessa linhagem estão disponíveis os receptores TrkB, TrkC e p75<sup>NTR</sup>, não sendo expresso o receptor TrkA (EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2004).

Dessa forma, em condições normais de cultivo (meio contendo 10% soro fetal bovino), o NGF se liga ao receptor p75<sup>NTR</sup>, gerando a sobrevivência e a proliferação. O aumento da sobrevivência nestas células dá-se também por BDNF, NT-3 e NT-4/5 (EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2004).

A diferenciação das células Neuro2a pode ser induzida pelo tratamento com AR, que inibe a proliferação e conduz à uma maior adesão ao substrato resultando no surgimento de neuritos (BLANCO; CAMELO; CARRI, 2001). O AR induz a organização dos microtúbulos, ao qual as estruturas formadas se assemelham aos dendritos (BRYAN; CAI; LIU, 2006). You *et al.* (2020) demonstraram que, em células

Neuro2a tratadas com AR, ocorre um aumento na expressão da proteína MAP2, proteína necessária para iniciação do neurito.

A indução da neuritogênese dessa linhagem tratada com AR ocorre com o aumento da expressão de genes, como *Calmin* (Clnn), que agem na regulação de proteínas envolvidas no ciclo celular (MARZINKE; CLAGETT-DAME, 2012). Já quando se utiliza NGF na diferenciação das células Neuro2a, o NGF desencadeia a ativação de genes relacionados à memória e plasticidade neuronal (DICKY *et al.*, 2004).

A diferenciação da linhagem Neuro2a foi possível de ser observada com o tratamento dos reagentes isobutilmetilxantina (IBMX) e forskolina, que elevam os níveis do AMP cíclico (cAMP). O cAMP é uma molécula intracelular que promove a formação de neuritos, sendo mediada pela proteína cinase A (PKA) (LEUNG *et al.*, 2011).

Outra opção para diferenciar as células Neuro2a é com o tratamento de dibutilil AMP cíclico (dbcAMP), que induz a formação da estrutura neurítica pela disposição dos microtúbulos tornando-a semelhante ao axônio (BRYAN; CAI; LIU, 2006). O dbcAMP também eleva os níveis de expressão de tirosina hidroxilase (TH), enzima que aumenta os níveis de dopamina, acarretando, assim, na produção de neurônios dopaminérgicos (TREMBLAY *et al.*, 2010).

### 3.2.3 Estudos com feocromocitoma de rato PC12

Feocromocitoma é um tumor que se desenvolve na medula da adrenal (VAUDRY *et al.*, 2002), logo, a linhagem celular PC12 apresenta caracteres fenotípicos tanto das células de cromafim (medula da adrenal) quanto de feocromocitoma (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). As células de cromafim são originadas a partir das células da crista neural, sendo assim, a linhagem PC12 tem a mesma origem embriológica proveniente do folheto germinativo ectoderma, tornando claro seu uso em estudos de diferenciação neuronal (GILBERT, 2019).

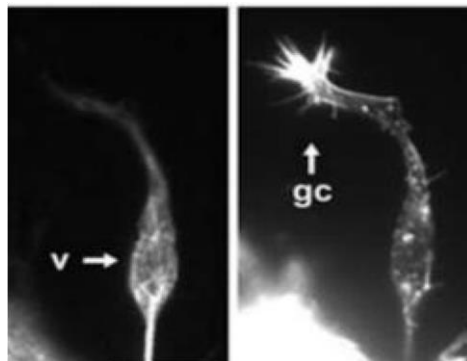
É uma linhagem conhecida por ser de fácil cultivo (WIATRAK *et al.*, 2020) possibilitando ensaios de diferenciação, proliferação e sobrevivência devido à ativação de vias de sinalização específicas (VAUDRY *et al.*, 2002).

O primeiro estudo foi realizado em 1976, sobre o estabelecimento de uma linha clonal noradrenérgica com essas células que respondem ao fator de crescimento do nervo (NGF) (FUJITA; LAZAROVICI; GUROFF, 1989). Logo, essas células possuem a capacidade de sintetizar noradrenalina, como também dopamina. Devido essas características bioquímicas, as células PC12 tratadas com o NGF apresentam características morfológicas de neurônios simpáticos (WIATRAK *et al.*, 2020).

Quando células PC12 são tratadas com NGF, ocorre a inibição da proliferação e a promoção da diferenciação (WIATRAK *et al.*, 2020). Além disso, o tratamento com NGF facilita a formação do potencial de ação elétrico e promove a expressão da proteína neuronal neurofilamento (MULLENBROCK; SHAH; COOPER, 2011).

O tratamento com NGF promove a formação de neuritos, que podem apresentar regiões intermediárias abauladas, chamadas de varicones (Figura 5) e, nas extremidades, os cones de crescimento. O que diferencia estas regiões é a organização citoesquelética; os cones de crescimento são formados por tubulina e actina e os varicones apresentam somente tubulina (MEUR; MOHEBIANY; O'CONNOR, 2009).

Figura 5- Varicones e cones de crescimento.



Fonte: Adaptado de MEUR, A. M.; MOHEBIANY, A. N.; O'CONNOR, T. P. Varicones and Growth Cones: Two Neurite Terminals in PC12 Cells. **Plos One**, v. 4, 2009.

Nota: Imagem de fluorescência da célula PC12 mostrando varicones (v) e cone de crescimento (gc).

A fim de buscar alternativas na inferência da neuritogênese, o estudo com PC12 e o alcalóide claulansina F apresentou efeito similar em comparação ao NGF, com a ativação da via de sinalização de MAPK/ERK, promovendo expressão da proteína GAP-43, que é um marcador de diferenciação neuronal (MA *et al.*, 2013).

Uma substância que auxilia também no estudo da diferenciação é o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). O PMA leva às vias de sinalização que culminam com a

resposta de reorganização do citoesqueleto e altera a morfologia celular (ALTUNGULTEKIN; WAGNER, 1996). O uso do PMA concomitante ao NGF leva à migração neuronal rápida (YOUNG *et al.*, 2008).

Outra alternativa é o efeito de 5-hidroxi-3,6,7,8,39, 49-hexametoxiflavona (5-OHHxMF), pois em células PC12 ocasiona a neuritogênese, expressando GAP-43, sendo dependente de cAMP/PKA/CREB e independente de TrkA (LAI *et al.*, 2011).

Embora não comum, o ensaio de diferenciação das PC12 pode ocorrer sem fator neurotrófico, mas com estimulação térmica repetida controlada pela temperatura (TRTS) a 39.5 °C, cessando a proliferação e induzindo a neuritogênese, sugerindo como mecanismo o envolvimento de MAPK (MEK/ERKs e p38) sem a ativação de TrkA (KUDO *et al.*, 2015).

### **3.3 Redução da Concentração de Soro Fetal Bovino no Processo de Diferenciação**

Linhagens celulares, normalmente, são mantidas em meio de cultivo acrescido de 10 a 15% de soro fetal bovino, para que, elas sejam estimuladas a se dividirem. Em processos de diferenciação, a redução do soro fetal bovino (SFB) faz-se necessária, pois no SFB há nutrientes, hormônios, fatores de crescimento, entre outras substâncias que corroboram para processo de proliferação celular (COLLODI; RAWSON; BARNES, 1991; EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2005).

Tais componentes do SFB são requisitados entre a fase de crescimento celular e síntese de proteínas (fase G1) e a fase de síntese de DNA (fase S), identificando se as condições do ambiente celular são favoráveis, como uma razoável quantidade de nutrientes, para prosseguir na divisão celular (WARD, 2002).

Assim, para o controle da proliferação celular, faz-se necessário um meio livre de SFB (COLLODI; RAWSON; BARNES, 1991), ou, ao menos, a redução dele. Isso porque o SFB, pela presença dos fatores de crescimento em seu conteúdo, dificulta o acesso do sítio de ligação do receptor de neurotrofinas (NTR) (EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2004). Logo, a redução ou ausência de SFB permite diminuir as células tipo-S (adesão ao substrato). Essas células, encontradas no cultivo da linhagem SH-SY5Y, mantêm sua morfologia e continuam a se proliferar, mesmo com

a utilização de fatores indutores para diferenciação, influenciando nos resultados de diferenciação (ENCINAS *et al.*, 2000).

Com a redução do SFB, a célula se predispõe à diferenciação, isto é, ocorre a interrupção do ciclo celular, a célula para em G1, indo para a fase G0 (SAHIN *et al.*, 2021). Assim, a composição do meio de cultivo é importante para realização de experimentos, pois ele contribui para estimulação das características intrínsecas celulares (WIATRAK *et al.*, 2020). Logo, protocolos de diferenciação seguem esse padrão de ausência ou redução do soro, mesmo sabendo que a falta de soro seja um fator de dano como o estresse celular (JANTAS *et al.*, 2013).

Alguns estudos realizados com células Neuro2a na ausência de soro, demonstraram ocorrer uma superexpressão de proteínas beta estimuladoras de ligação a CCAAT (C/EBP $\beta$ ) que regulam a diferenciação, corroborando para o aparecimento de curtos neuritos (CANTELI *et al.*, 2002).

Outro estudo observou que, essas células não expressam neurogranina (Ng), uma proteína neuronal que está envolvida com a via de sinalização do cálcio. Células Neuro2a transfectadas expressando Ng (Neuro2a-Ng) foram comparadas com células Neuro2a, em relação ao processo de diferenciação, em condições de ausência de soro fetal bovino (SFB) por 24h. As células Neuro2a apresentaram inúmeros prolongamentos estabelecendo conexões, em contraste com as transfectadas, com no máximo 2 neuritos. Reforçando que, a privação de SFB é capaz de induzir diferenciação nesta linhagem (HAN *et al.*, 2007), ou, ao menos, o uso de SFB livre de lipoproteínas, pois essas moléculas podem inibir o processo de diferenciação (EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2005).

Estudos de diferenciação celular mostram que a célula passa por modificações que estão relacionadas diretamente a rede de proteínas. Algumas destas proteínas são utilizadas para avaliar o processo de diferenciação.

### **3.4 Proteínas Expressas na Fase de Diferenciação**

Para promover o crescimento do neurito, os sinais extracelulares, como os provenientes das neurotrofinas, são convertidos em sinais intracelulares transmitidos pelos segundos mensageiros AMP cíclico (cAMP) (MURAMATSU; UENO; YAMASHITA, 2009) e íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (HEINE; SYGNECKA; FRANKE, 2015), e

esses sinais induzem a expressão de genes para a produção das proteínas do citoesqueleto, receptores de membrana e outras proteínas que são necessárias para a resposta da neuritogênese (MURAMATSU; UENO; YAMASHITA, 2009). Sendo assim, trabalhos que estudam o processo de diferenciação neuronal usando linhagens celulares, normalmente, fazem a análise de proteínas que estão presentes em neurônios imaturos e maduros, denominadas de marcadores neuronais (ENCINAS *et al.*, 2000; BLANCO; CAMEL; CARRI, 2001; MEUR; MOHEBIANY; O'CONNOR, 2009).

O marcador neuronal GAP-43 é uma proteína associada ao crescimento axonal, fazendo transdução do sinal aos efetores (LAI *et al.*, 2011). Já o neurofilamento (NF) é uma proteína que está associada ao citoesqueleto, sendo um constituinte do axônio, logo, é utilizado como marcador axonal (SHIGETA *et al.*, 2006).

Há também o marcador neuronal enolase específica neuronal (NSE) que é uma enzima encontrada em neurônios que participa de glicólise, convertendo 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (ISGRÒ; BOTTONI; SCATENA, 2015).

Estes marcadores (GAP-43, NF e NSE) são expressos na fase final da diferenciação (AYACHI *et al.*, 2018).

Marcadores neuronais podem ser proteínas relacionadas aos microtúbulos, entre elas temos, a Tau, que é a proteína responsável na estabilização dos microtúbulos (MAHABADI; TAGHIBIGLOU, 2020), a proteína associada a microtúbulos 2 (MAP2), que é um marcador de neurônios maduros (ARAKI *et al.*, 2021) e a tubulina, que é a molécula que constitui os microtúbulos do citoesqueleto (MAHABADI; TAGHIBIGLOU, 2020). A tubulina  $\beta$ III (Tubb3) é um marcador de neurônio imaturo (ARAKI *et al.*, 2021), pois são proteínas que identificam o processo de formação de neuritos. Tubb3 junto de MAP2, possibilitam reconhecer o crescimento dos dendritos e axônios (HARRILL *et al.*, 2015).

Além destes marcadores, é possível utilizar a sinapsina, que é uma proteína que está presente nas vesículas sinápticas, que age na liberação dos neurotransmissores e a proteína de densidade pós-sináptica (PSD95) que participa da maturação neuronal (YANG *et al.*, 2020). Ambas proteínas citadas são expressas no final da diferenciação (AYACHI *et al.*, 2018).

Os protocolos de diferenciação podem ser verificados através da análise destas proteínas envolvidas na neuritogênese, comprovando sua expressão após o tratamento de cada linhagem celular. Nas células SH-SY5Y submetidas ao tratamento

de AR acrescido de BDNF, ocorre ativação da via de sinalização dependente de MEK, sendo possível observar a expressão de GAP-43, 6 horas após o tratamento (ENCINAS *et al.*, 1999). Este resultado foi corroborado por Joshi *et al.* (2007), onde esta mesma linhagem celular é mantida em tratamento somente com AR por 2 dias, não sendo possível observar a expressão GAP-43, nem da proteína Tau, indicando assim, a dependência da neurofonia.

Kovalevich e Langford (2013) demonstraram que células SH-SY5Y submetidas ao tratamento AR seguido de BDNF, após 1 dia de tratamento com a neurotrofina, passam a expressar GAP-43 e NSE. Encinas *et al.* (2000) já haviam demonstrado que, nesta mesma combinação de moléculas, após 1 dia de tratamento, era possível detectar as proteínas NF, Tau, MAP2, como também, GAP-43 e NSE. A expressão de NSE ocorre quando há a ativação da sinalização de PI3K e de ERK, vias requeridas para o processo de neuritogênese (HAQUE *et al.*, 2018).

Esta associação de tratamentos nas células SH-SY5Y, nos estudos de Hromadkova *et al.* (2020), mostra que a expressão da proteína Tau e da proteína associada a microtúbulos 2 (MAP2) está em regiões específicas, sendo que Tau aparece localizada ao longo de neuritos e corpo celular e MAP2 em neuritos menores.

A expressão de Tubb3, sinapsina e PSD95 também pode ser detectada nas células SH-SY5Y quando tratadas com AR e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (YANG *et al.*, 2020).

Células da linhagem PC12, quando tratadas com NGF e íons como cobre e zinco, há um aumento no perfil de expressão de MAP2, GAP-43 e de tubulina  $\beta$ III (Tubb3) (PANDINI *et al.*, 2016). Wiatrak *et al.*, (2020) demonstraram que, células PC12 após período de diferenciação com NGF, também expressam a proteína sinapsina durante o mecanismo da sinapse.

Dentre os marcadores, há outra proteína denominada sinaptofisina (proveniente do gene *SYP*), que é encontrada nas vesículas sinápticas (TARSA; BALKOWIEC, 2009; CHAUDHARI; RAVANAN, 2018), sendo um clássico marcador neuronal. Assim, a utilização desta proteína neurotípica sinaptofisina junto com GAP-43 são comumente estudadas em processos de diferenciação de PC12 (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Células da linhagem SH-SY5Y tratadas com ácido retinóico e BDNF, passam a expressar as proteínas sinaptofisina e PSD95, sendo que

essas proteínas localizam-se nos varícones e na extremidade do neurito (HROMADKOVA *et al.*, 2020).

As proteínas sinaptofisina e PSD95 são comumente usadas como marcadores de fase final da diferenciação, evidenciando o aparecimento de características específicas de neurônios nas células de linhagens (AYACHI *et al.*, 2018). No trabalho aqui apresentado, a proteína sinaptofisina foi escolhida como marcador de diferenciação neuronal.

Além dessas proteínas que são utilizadas como marcadores neuronais típicos, estudos demonstram mais duas proteínas relacionadas a neuritogênese: a proteína PrP<sup>c</sup> e STI1 (FONSECA *et al.*, 2021).

A proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) é uma proteína ancorada a face extracelular da membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) (LOUBET *et al.*, 2012) e pode também ser observada nas balsas lipídicas (PANTERA *et al.*, 2009) presente no sistema nervoso central (WULF; SENATORE; AGUZZI, 2017).

Essa proteína passa por modificações pós-transducionais, através do processo de glicosilação (LINDEN *et al.*, 2008). As diferentes formas são possíveis de serem observadas em amostras PC12 e em encéfalo de rato, e são denominadas da seguinte forma: não glicosilada (24 kDa), monoglicosilada (26–30 kDa) e diglicosilada (30–35 kDa) (ZAWLIK, 2006).

Em Neuro2a observou-se que PrP<sup>c</sup>, quando superexpressa, modifica a morfologia celular induzindo a formação de filopódios (SCHROCK; SOLIS; STUERMER, 2009). Em células PC12, o silenciamento de PrP<sup>c</sup> afeta a fase preliminar da neuritogênese, havendo falha no processo (LOUBET *et al.*, 2012). Nas células PC12, PrP<sup>c</sup> modula a neuritogênese, ligando-se a laminina (glicoproteína da lâmina basal), ativando Ras- Raf que é mediada pela caveolina- 1 (PANTERA *et al.*, 2009).

PrP<sup>c</sup> está envolvida tanto no surgimento do neurito como no alongamento e na constância da sua polaridade (ALLEAUME-BUTAUUX *et al.*, 2013).

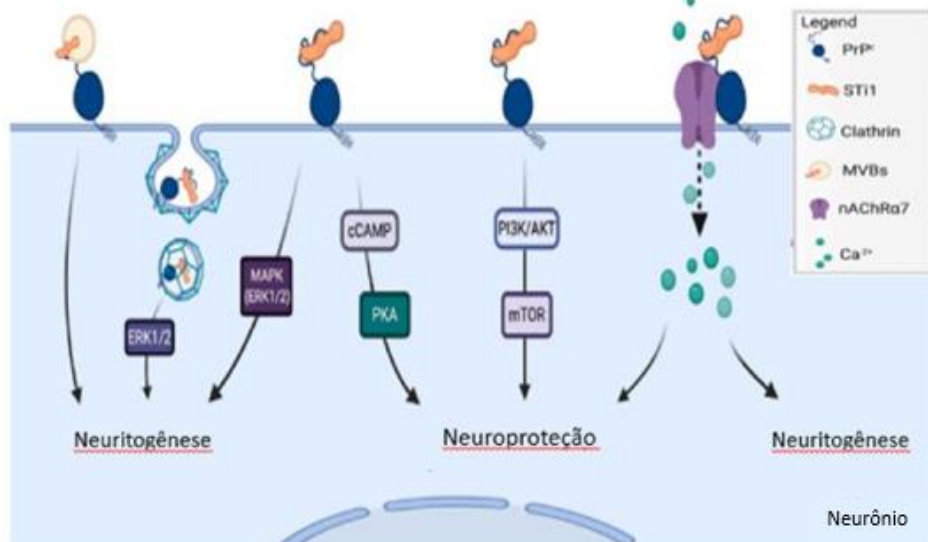
Há também a co-chaperona, denominada proteína induzida por estresse 1 (STI1). As co-chaperonas se associam com outras proteínas, auxiliando no dobramento e na regulação das atividades destas proteínas (EUSTACE; JAY, 2004; MAHABADI; TAGHIBIGLOU, 2020; FONSECA *et al.*, 2021). Em culturas de neuronais primárias, a interação da proteína STI1 com a proteína celular príon (PrP<sup>c</sup>) induz o processo de neuritogênese (Figura 6), sendo que este evento é desencadeado pela

sinalização via MAPK cinase (LOPES *et al.*, 2005). O processo de neuritogênese pode ocorrer a partir da associação de PrP<sup>c</sup> e STI1 na membrana da célula, seguido da endocitose do complexo, desencadeando a sinalização de ERK (CAETANO *et al.*, 2008). Após ser endocitada, a proteína STI1 se concentra nos endossomos tardios ou nos lisossomos (CAETANO *et al.*, 2008).

A interação de PrP<sup>c</sup> e STI1 contribui também para a ativação de PI3K e da proteína alvo da rampamicina em mamíferos (mTOR), induzindo o crescimento de neuritos (ROFFÉ *et al.*, 2010).

PrP<sup>c</sup> e STI1 também estão envolvidas em processos de neuroproteção, ativando PKA dependente de cAMP (LOPES *et al.*, 2005).

Figura 6- Neuritogênese e neuroproteção promovida pela associação de PrP<sup>c</sup> e STI1.



Fonte: Adaptado de FONSECA, A. C. C.; MATIAS, D.; GERALDO, L. H. M.; LESER, F. S.; PAGNONCELLI, I.; GARCIA, C.; AMARAL, R. F.; ROSA, B. G.; GRIMALDI, I.; MAGALHÃES, E. S. C.; COPPOLA-SEGOVIA, V.; AZEVEDO, E. M.; ZANATA, S. M.; LIMA, F. R. S. The multiple functions of the co-chaperone stress inducible protein 1. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 57, p. 73–84, 2021.

Nota: Neuritogênese promovida pela associação de PrP<sup>c</sup> e STI1 pela via de sinalização MAPK/ERK, via clatrina (*Clathrin*). Neuritogênese promovida pela associação de PrP<sup>c</sup>, STI1 e receptor acetilcolina nicotina alfa 7 (nAChRα7), por aumentar os níveis intracelulares de cálcio (Ca<sup>2+</sup>). Neuroproteção pela ativação de PKA, mTOR ou níveis de cálcio. Abreviações: Corpos multivesiculares (MVB).

Portanto, levando em consideração esses dados da literatura sobre neuritogênese e pela disponibilidade dos anticorpos anti-PrP<sup>c</sup> e anti-STI1 (cedidos pelo professor Sílvio Marques Zanata –UFPR), este trabalho analisou a expressão dessas duas proteínas durante o processo de diferenciação das linhagens celulares sob redução de soro fetal bovino, com intuito de verificar se são possíveis marcadores neuronais.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Linhagens Celulares

As linhagens de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), murino Neuro2a (ATCC CCL-131) e feocromocitoma adrenal de rato PC12 (ATCC CRL-1721) foram cedidas gentilmente pelo professor Sílvio Marques Zanata do Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e armazenadas a -80°C no laboratório de Histopatologia e Cultura Celular da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

As linhagens foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)- *High Glucose* (Gibco), contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Gibco). As células foram manipuladas no laboratório de Biologia Celular e Protozoologia da UEPG e mantidas em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 4.2 Anticorpos

Foram utilizados o anticorpo monoclonal anti-sinaptofisina produzido em camundongo (sc-17750, Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:1000, o anticorpo policlonal anti-PrP<sup>c</sup> produzido em camundongo (cedido pelo professor Sílvio Marques Zanata- UFPR) na diluição de 1:1000, o anticorpo policlonal anti-STI1 produzido em coelho (também cedido pelo professor Sílvio Marques Zanata- UFPR) na diluição de 1:3000 e o anticorpo policlonal anti-actina produzido em coelho (A2066, Sigma) na diluição de 1:1000. Foram utilizados os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (A4416, Sigma) na diluição de 1:3000, anti-IgG de coelho (Sigma) na diluição de 1:4000, ambos acoplados a peroxidase (HRP).

### 4.3 Validação dos Anticorpos Anti-sinaptofisina, Anti-PrP<sup>c</sup> e Anti-STI1.

Extrato proteico total de cerebello de rato (OHTA *et al.*, 1993; HAJJ *et al.*, 2009) (60 µg/poço) foi submetido à técnica de *western blot* descrita no item 4.7. Foram utilizados os anticorpos anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup> e anti-STI1 com intuito de avaliar suas condições para a realização dos experimentos.

### 4.4 Experimento para Análise de Expressão de Proteínas nas Linhagens Celulares sob Redução de Soro

As linhagens celulares SH-SY5Y, Neuro2A e PC12 foram cultivadas em meio DMEM- *High Glucose* contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100µg/ml), suplementado com 10% SFB (Gibco). Foram plaqueadas 2 x 10<sup>6</sup> células/ placa (100 mm de diâmetro, Kasvi) de cada linhagem (totalizando 9 placas para cada linhagem). Após 24 h, as placas de cada linhagem foram separadas em três grupos experimentais (3 placas/ grupo) (Figura 7):

Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo, meio DMEM 10% SFB)

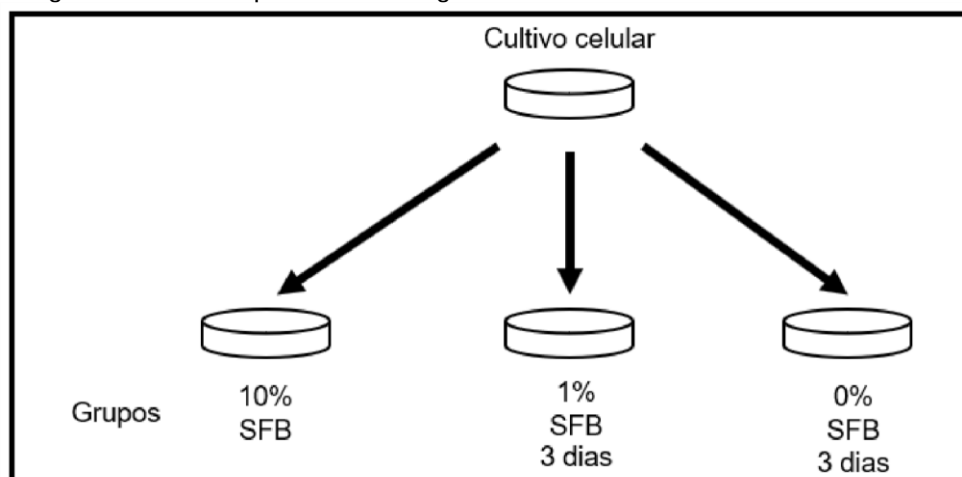
Grupo 2: 1% SFB (células mantidas em meio DMEM 1% SFB por 3 dias)

Grupo 3: 0% SFB (células mantidas em meio DMEM 0% SFB por 3 dias)

As células do grupo 1 (10% SFB) foram coletadas quando estavam em aproximadamente 80% de confluência. As placas contendo as células foram lavadas 3x com PBS e com auxílio de jato de PBS e rodinho, foram soltas e coletadas em tubo cônico de 15 ml. A suspensão celular foi centrifugada por 2 min a 3000 rpm. O precipitado celular obtido após a centrifugação foi mantido a -80°C até a obtenção dos precipitados celulares dos demais grupos.

No mesmo dia da coleta do grupo 1 (10% SFB), as demais placas tiveram seus meios descartados e novo meio contendo 1% SFB ou 0% SFB foi acrescido. As células foram mantidas por 3 dias em incubadora úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C na tentativa das células se diferenciarem. Após os 3 dias, as células foram retiradas da cultura, lavadas com PBS, centrifugadas e o precipitados celulares obtidos foram mantidos a -80°C até o momento da preparação do extrato proteico (descrito no item 4.7).

Figura 7- Diagrama do ensaio para cada linhagem.



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo, meio DMEM com 10% SFB); Grupo 2: 1% de SFB (células mantidas por 3 dias em meio DMEM com 1% de SFB); Grupo 3: 0% de SFB (células mantidas por 3 dias em meio DMEM com 0% de SFB).

#### 4.5 Ensaio de Diferenciação para as Linhagens de Neuroblastoma SH-SY5Y e Neuro2a Tratadas com Ácido Retinóico

As linhagens de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e murino (Neuro2a) foram cultivadas em meio DMEM- *High Glucose* contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 µg/ml), suplementado com 10% SFB (Gibco). Foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células/ placa (100 mm de diâmetro, Kasvi) de cada linhagem (15 placas/ linhagem). Após 24h, as placas de cada linhagem foram separadas em cinco grupos experimentais (3 placas/ grupo) (Figura 8):

Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo, meio DMEM 10% SFB)

Grupo 2: 1% SFB + dimetilsulfóxido (DMSO) (células mantidas por 3 dias em meio DMEM 1% SFB, acrescido do mesmo volume de DMSO usado no tratamento com ácido retinóico, ou seja, 8 µl de DMSO)

Grupo 3: 1% SFB + ácido retinóico (AR) (células mantidas por 3 dias em meio DMEM 1% SFB, acrescido de 10 µM de AR)

Grupo 4: 1% SFB + DMSO (células mantidas por 6 dias em meio DMEM 1% SFB, acrescido de 8 µl de DMSO)

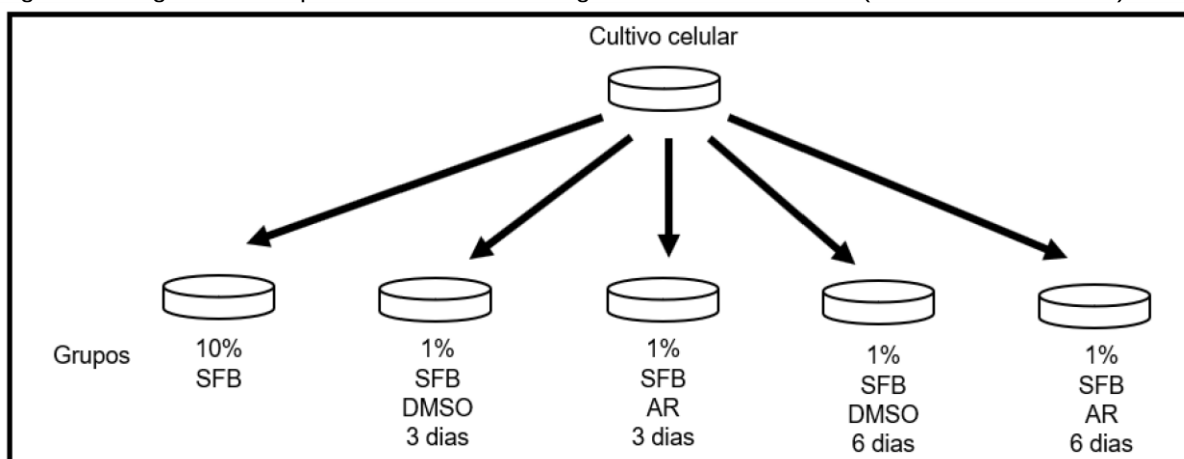
Grupo 5: 1% SFB + AR (células mantidas por 6 dias em meio DMEM 1% SFB, acrescido de 10 µM de AR)

Foi preparada uma solução estoque de 10 mM de ácido retinóico (AR, Laboratori Mag – S.P.A.), na qual o diluente usado foi o DMSO. Sendo assim, foi usada para as placas tratadas com AR, uma diluição de 1  $\mu$ l/ 1ml da solução estoque de AR, obtendo assim, a concentração de 10  $\mu$ M AR (KUNZLER *et al.*, 2016). Nos grupos que não foram tratados com AR, foi adicionado 8  $\mu$ l de DMSO aos 8 ml meio de cultura de cada placa.

As células do grupo 1 (10% SFB) foram coletadas quando estavam em aproximadamente 80% de confluência. As placas contendo as células foram lavadas 3x com PBS e com auxílio de jato de PBS e rodinho, foram soltas e coletadas em tubo cônico de 15 ml. A suspensão celular foi centrifugada por 2 min a 3000 rpm. O precipitado celular obtido após a centrifugação foi mantido a -80°C até a obtenção dos precipitados celulares dos demais grupos.

No mesmo dia da coleta do grupo 1 (10% SFB), o meio das demais placas foi substituído por meio DMEM acrescido de 1% SFB. Nos grupos 2 e 4 foi adicionado 8  $\mu$ l de DMSO e, nos grupos 3 e 5 foi adicionado 10  $\mu$ M AR. O meio das placas contendo os tratamentos foi renovado a cada 48h. As células foram coletadas após 3 e 6 dias de tratamento e o precipitado celular foi mantido a -80°C até o processamento para obtenção do extrato celular (descrito no item 4.7).

Figura 8- Diagrama do experimento com as linhagens de neuroblastoma (SH-SY5Y e Neuro2a).



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo); Grupo 2: 1% SFB + DMSO (células mantidas por 3 dias); Grupo 3: 1% SFB + de ácido retinóico (AR) (células mantidas por 3 dias); Grupo 4: 1% SFB + DMSO (células mantidas por 6 dias); Grupo 5: 1% SFB + de AR (células mantidas por 6 dias).

#### 4.6 Ensaio de Diferenciação da Linhagem de Feocromocitoma PC12 Tratada com Fator de Crescimento de Nervo (NGF)

A linhagem de feocromocitoma de rato (PC12) foi cultivada em meio DMEM-High Glucose contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100µg/ml), suplementado com 10% SFB (Gibco). Foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células/placa (100 mm de diâmetro, Kasvi) da linhagem PC12 (10 placas no total). Após 24h, as placas foram separadas em cinco grupos (2 placas/ grupo) (Figura 9):

Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo, DMEM 10% SFB)

Grupo 2: 1% SFB (células mantidas por 3 dias em meio DMEM 1% SFB)

Grupo 3: 1% SFB + 50 ng/ml de NGF (células mantidas por 3 dias em meio DMEM 1% SFB acrescido de 50 ng/ml de NGF)

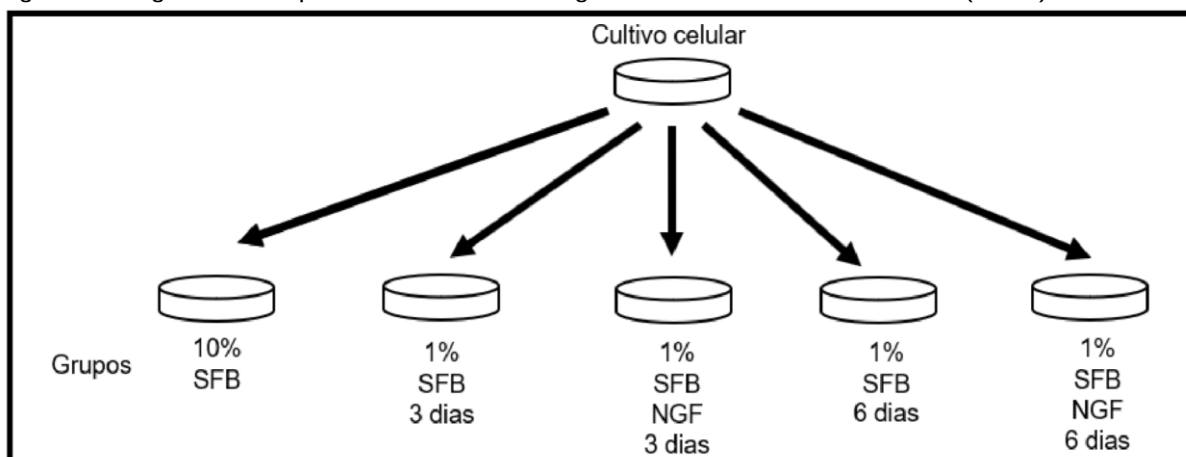
Grupo 4: 1% SFB (células mantidas por 6 dias em meio DMEM 1% SFB)

Grupo 5: 1% SFB + 50 ng/mL de NGF (células mantidas por 6 dias em meio DMEM 1% SFB acrescido de 50 ng/ml de NGF)

As células do grupo 10% SFB foram coletadas quando estavam em aproximadamente 80% de confluência. As placas contendo as células foram lavadas 3x com PBS e com auxílio de jato de PBS e rodinho, foram soltas e coletadas em tubo cônico de 15 ml. A suspensão celular foi centrifugada por 2 min a 3000 rpm. O precipitado celular obtido após a centrifugação foi mantido a -80°C até a obtenção dos precipitados celulares dos demais grupos.

Neste mesmo dia da coleta do grupo 10% SFB, o meio das demais placas foi substituído por meio fresco com 1% SFB e, nos grupos 3 e 5 foram adicionados 50 ng/ml de NGF (Gibco) (RYU *et al.*, 2015). O meio foi trocado no 3º dia nos grupos mantidos em cultura por 6 dias (grupo 4 e 5) e mais NGF foi adicionado ao grupo 5. Após o tratamento, as células foram coletadas da cultura, processadas e submetidas à técnica de *western blot* como descrito no item 4.7.

Figura 9- Diagrama do experimento com as linhagens de feocromocitoma de rato (PC12).



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo); Grupo 2: 1% SFB (células mantidas por 3 dias); Grupo 3: 1% SFB + NGF (células mantidas por 3 dias); Grupo 4: 1% SFB (células mantidas por 6 dias); Grupo 5: 1% SFB + NGF (células mantidas por 6 dias).

#### 4.7 Análise da Expressão de Sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 em Linhagens Celulares pelo Método de Western Blot

Extratos totais foram obtidos das linhagens celulares SH-SY5Y, Neuro2a e PC12 como descrito por Costa *et al.* (2009). As células foram lisadas em tampão de lise (50 mM Tris- HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% NP40; 0,2% de deoxicolato de sódio) acrescido de inibidores de proteases (1 mM PMSF, 1 mM fenantrolina, 1 mM NEM e 1 mM EDTA) e inibidores de fosfatase (1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e 1 mM NaF), deixadas em banho de gelo por 40 minutos e submetidas a ciclos de passagem por seringa de insulina (BD Ultra-Fine® II, agulha 0,25 mm de calibre). Após a incubação em gelo, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm durante 15 minutos a 4° C. A dosagem das proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976). Os complexos proteicos (80 µg) foram separados por eletroforese em gel desnaturante de 10% de poliacrilamida (SDS- PAGE), com aplicação de campo elétrico vertical segundo Sambrook & Russel (2001), usando o equipamento MiniVE (GE Healthcare Life Sciences do Brasil). Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante 16 horas sob voltagem de 25 V em tampão de transferência gelado (192 mM glicina; 25 mM Tris; 20% metanol; 0,037% SDS) em geladeira (4°C). As membranas foram coradas com Ponceau (0,1% de Ponceau em ácido acético) para verificação da transferência e então, o bloqueio das ligações inespecíficas foi feito durante 1 hora com TBS-T (150 mM NaCl; 50 mM de Tris- HCl

pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico- Nestlé). As membranas foram incubadas com os diferentes anticorpos primários (anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup> anti-STI1 e anticorpo anti-actina). Todos os anticorpos foram diluídos em tampão de bloqueio e incubados com as membranas por 16 horas a 4° C sob agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas cinco vezes de três minutos com TBS-T e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário (anti- IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho) conjugado a HRP. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Novamente, as lavagens com TBS-T foram realizadas. Em seguida, foi adicionado substrato quimiluminescente (kit ECL Prime Western blotting detection GE Healthcare) às membranas. A revelação foi evidenciada usando filme radiográfico apropriado Hyperfilm (GE Healthcare) ou Medical X-ray Green (Carestream).

Após a marcação com os anticorpos na membrana, foi realizado o procedimento de “*stripping*”, onde realizou-se a incubação das membranas em solução de 1M de NaOH por 2 minutos, para retirada dos anticorpos que estavam ligados aos antígenos. Após este tempo, a membrana foi lavada por 10 minutos em água corrente, equilibrada em TBS-T por 6 minutos e então submetida ao bloqueio com TBS-T contendo 5% de leite desnatado por 1 hora e posteriormente, incubada com os demais anticorpos de interesse.

## 5 Resultados

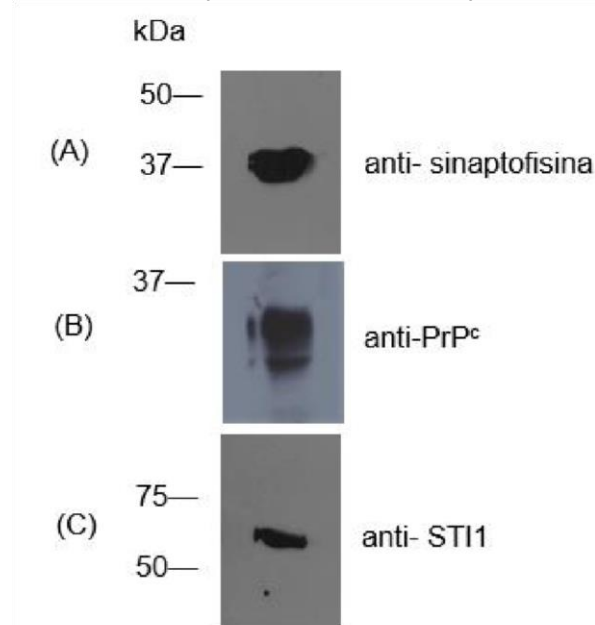
### 5.1 Avaliação dos Anticorpos Anti-sinaptofisina, Anti-PrP<sup>c</sup> e Anti-STI1

Os anticorpos anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup> e anti STI1 foram avaliados nas amostras de extrato total de proteínas de cerebello de rato (Figura 10), uma vez que este órgão expressa essas proteínas em grande quantidade (OHTA *et al.*,1993; HAJJ *et al.*,2009).

Foi possível observar as seguintes marcações: uma banda com massa de 38 kDa, correspondente a proteína sinaptofisina; bandas com massa entre 24-35kDa correspondentes às diferentes formas de glicosilação da proteína príon celular e uma banda com massa de 66 KDa, correspondente à proteína induzida por estresse 1. Essas marcações evidenciaram que os anticorpos reconhecem adequadamente as proteínas de interesse.

Sendo assim, foi possível usar esses anticorpos para evidenciar as proteínas de interesse expressas durante os ensaios de diferenciação.

Figura 10- Ensaio de *western blot* para validar os anticorpos anti- sinaptofisina, anti- PrP<sup>c</sup> e anti- STI1.



Fonte: A autora.

Nota: 60µg de extrato de proteínas totais de cerebello de rato foram utilizados no ensaio.

(A) Banda de 38 kDa corresponde à proteína sinaptofisina.

(B) Bandas entre 24-35 kDa correspondem à proteína príon celular.

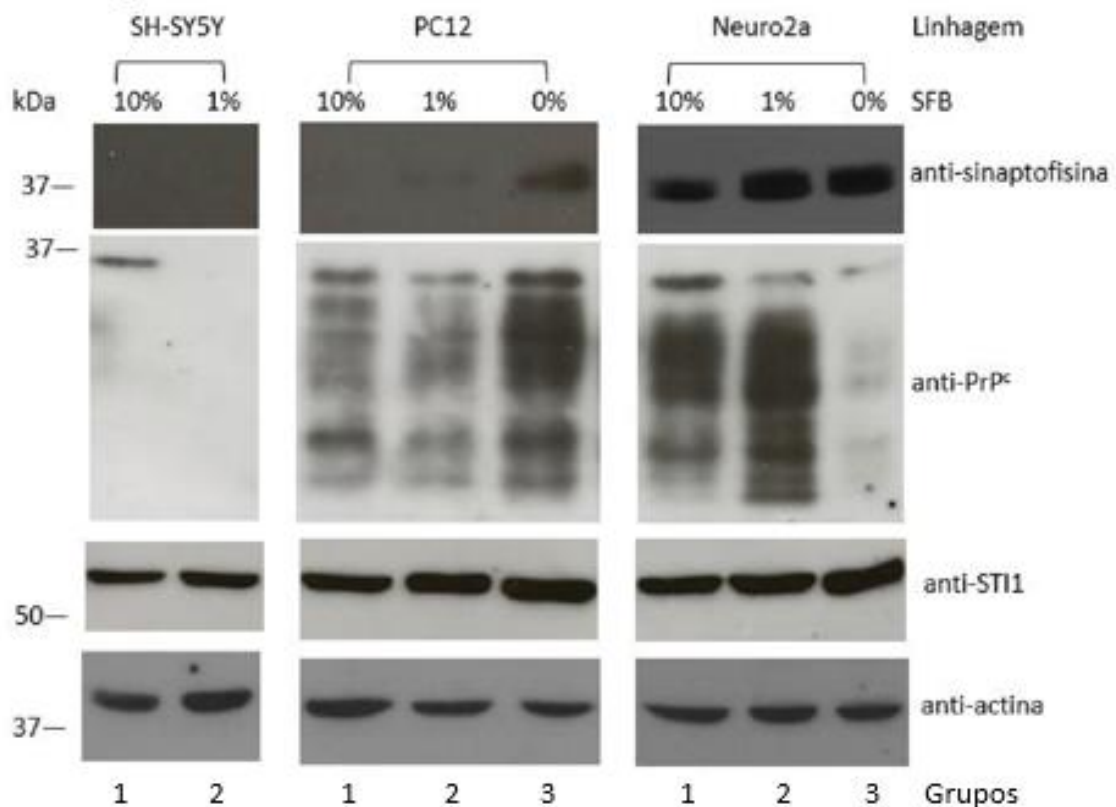
(C) Banda de 66 kDa corresponde à proteína induzida por estresse 1.

## 5.2 Expressão de Sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 nas Linhagens Celulares em Condição de Redução de Soro Fetal Bovino por 3 Dias

As linhagens celulares foram mantidas por 3 dias em meio DMEM 1% SFB e 0% SFB. Após este tempo, as células foram retiradas da cultura e observadas em microscópio invertido. Foi possível observar que no grupo 3 (0% SFB) da linhagem SH-SY5Y, as células estavam mortas, não podendo assim, serem processadas e analisadas.

A figura 11 mostra o resultado da expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 nas linhagens SH-SY5Y, Neuro2a e PC12 após 3 dias da redução do SFB.

Figura 11- Análise da expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 em SHSY5Y, PC12 e Neuro2a em condições de redução de soro fetal bovino.



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB corresponde as células mantidas em condição normal de cultivo, DMEM 10% SFB. Grupo 2: 1% SFB corresponde as células mantidas por 3 dias em DMEM 1% SFB. Grupo 3: 0% SFB corresponde as células mantidas por 3 dias em DMEM 0% SFB. Para as marcações foram usados como primários: anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup>, anti-STI1 e anti-actina. *Western blot* representativo de 1 ensaio.

Na linhagem SH-SY5Y, no grupo 1 (DMEM 10% SFB) e no grupo 2 (DMEM 1% SFB), a proteína sinaptofisina não foi detectada pelo anticorpo anti-sinaptofisina, indicando que não houve expressão desta proteína nestas condições.

Com relação à expressão da proteína PrP<sup>c</sup> para a linhagem SH-SY5Y, foi possível detectar uma banda na altura de 35 kDa apenas no grupo 1 (10% SFB).

Na linhagem PC12, foi possível observar que no grupo 1 (DMEM 10% SFB) não houve expressão de sinaptofisina. A análise visual nos grupos com redução de SFB (grupo 2 e 3), sugere que houve um aumento da expressão de sinaptofisina no grupo 3 (DMEM 0% SFB) em relação ao grupo 2 (DMEM 1% SFB).

Para a linhagem PC12, o grupo 2 (1% SFB) apresentou visualmente uma leve diminuição na expressão de PrP<sup>c</sup> em relação ao grupo 1 (10% SFB) e houve aumento na detecção da proteína PrP<sup>c</sup> no grupo 3 (0% SFB) quando comparado ao grupo 1 (10% SFB).

Na linhagem Neuro2a, todos os grupos apresentaram forte expressão de sinaptofisina em comparação às demais linhagens. Além disso, os grupos 2 e 3 apresentaram visualmente um aumento da expressão de sinaptofisina em relação ao grupo 1 (10% SFB). Porém, não houve diferença entre os grupos que tiveram o SFB reduzido (grupo 2 e 3).

A linhagem Neuro2a apresentou visualmente uma maior intensidade na banda correspondente à proteína PrP<sup>c</sup> no grupo 2 (1% SFB) em comparação ao grupo 1 (10% SFB), porém a expressão no grupo 3 (0% SFB) foi reduzida.

Quanto à proteína STI1, não foi possível observar diferenças visuais nas bandas em nenhuma das linhagens estudadas.

A análise da expressão da proteína de citoesqueleto actina foi realizada para demonstrar que a mesma quantidade de proteína (80 µg) foi utilizada para cada grupo experimental.

### **5.3 Expressão de Sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 nas Linhagens de Neuroblastoma SH-SY5Y e Neuro2a Mantidas em DMEM 1% SFB e Comparação com o Tratamento com Ácido Retinóico**

A figura 12 mostra o resultado da expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem SH-SY5Y mantida em DMEM 1% SFB e tratada como ácido retinóico.

Não foi possível observar a expressão da proteína sinaptofisina em nenhum dos grupos, nem mesmo no grupo que foi estimulado à diferenciação pelo tratamento com AR.

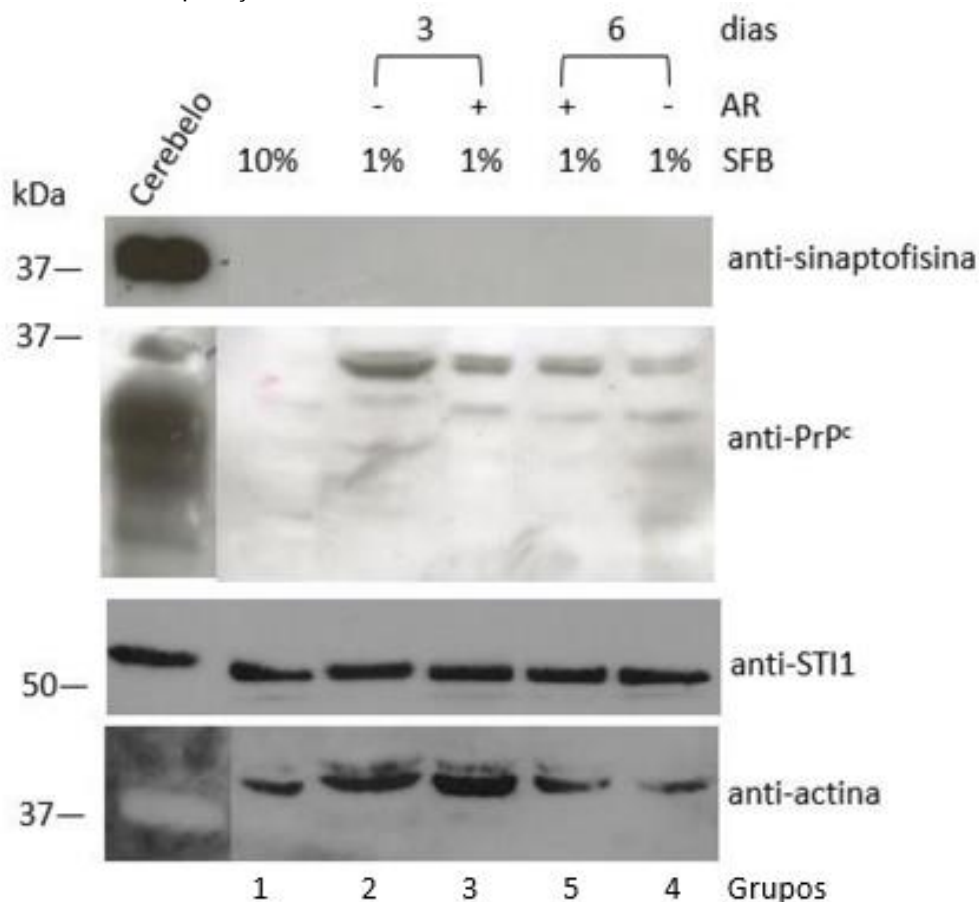
Quanto a expressão de PrP<sup>c</sup>, não foi detectada no grupo 1 (10% SFB) e verificou-se uma maior detecção no grupo 2 (1% SFB, 3 dias) comparação aos demais grupos.

Quanto a proteína STI1, não foi possível observar diferenças visuais entre os grupos mantidos a 1% SFB (grupos 2, 3, 4 e 5) em comparação ao grupo 10% SFB.

Neste ensaio é possível observar, na revelação da proteína actina, uma quantidade maior desta proteína nos grupos 2 e 3.

Durante o experimento, foi possível visualizar um grande número de células mortas nos grupos 4 e 5, observadas ao microscópio invertido (dados não mostrados). Foi também verificada a mudança de morfologia das células nos grupos que tiveram o soro reduzido a 1% quando comparadas as células do grupo 1 (10% SFB) (dados não mostrados). Nos grupos 2 a 5, foi possível observar que as células apresentavam morfologia mais afilada, já no grupo com 10% SFB as células apresentavam morfologia mais triangular.

Figura 12- Expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y mantidas a 1% SFB e comparação com o tratamento com ácido retinóico.



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo); Grupo 2: 1% SFB + DMSO, células mantidas por 3 dias; Grupo 3: 1% SFB + ácido retinóico (AR), células mantidas por 3 dias; Grupo 4: 1% SFB + DMSO, células mantidas por 6 dias; Grupo 5: 1% SFB + AR, células mantidas por 6 dias. Para as marcações foram usados como primários: anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup>, anti-STI1 e anti-actina. *Western blot* representativo de 1 ensaio.

A figura 13 mostra o resultado da expressão de sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem Neuro2a submetida a redução a 1% SFB e tratada como ácido retinóico.

Com relação a proteína sinaptofisina, é possível observar que os grupos 2 (1% SFB+ DMSO, 3 dias) e 3 (1% SFB + AR, 3 dias) apresentaram um aumento de expressão quando comparado com o grupo 1 (10% SFB). Nos grupos 4 (1% SFB+ DMSO, 6 dias) e 5 (1% SFB + AR, 6 dias) a detecção de sinaptofisina foi menor. Porém, quando se analisa a detecção do normalizador actina, observa-se que, também, há uma diminuição nesta proteína nos grupos (4 e 5) quando comparado com os demais.

Durante o experimento, foi possível visualizar um grande número de células mortas nos grupos 4 e 5, observadas ao microscópio invertido (dados não mostrados).

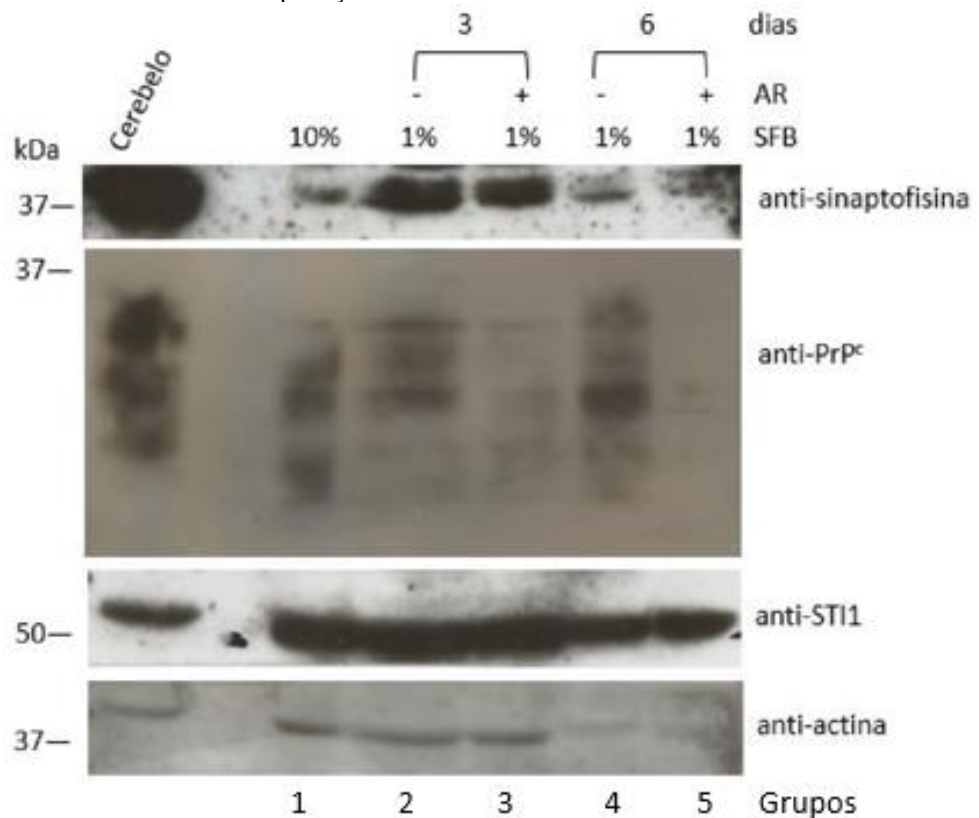
Foi também verificada a mudança de morfologia das células nos grupos que tiveram o soro reduzido a 1% quando comparadas as células do grupo 1 (10% SFB) (dados não mostrados).

Com relação a expressão da proteína PrP<sup>c</sup>, os grupos 2 e 4 (1% SFB + DMSO, 3 e 6 dias, respectivamente) apresentaram visualmente um aumento na expressão de PrP<sup>c</sup> em comparação aos demais grupos. Este aumento da expressão sugere ser dependente de tempo, pois após 6 dias em 1% de SFB (grupo 4), a expressão de PrP<sup>c</sup> foi maior que em 3 dias (grupo 2).

Quanto a proteína STI1, não foi possível observar diferenças visuais entre os grupos.

Neste ensaio é possível observar, na revelação da proteína actina, uma quantidade menor desta proteína nos grupos 4 e 5.

Figura 13- Expressão das proteínas sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem de neuroblastoma murino (Neuro2a) mantidas a 1% de SFB e comparação com o tratamento com ácido retinóico.



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo, DMEM 10% SFB); Grupo 2: 1% SFB + DMSO, células mantidas por 3 dias; Grupo 3: 1% SFB + AR, células mantidas por 3 dias; Grupo 4: 1% SFB + DMSO, células mantidas por 6 dias; Grupo 5: 1% SFB + AR, células mantidas por 6 dias. Para as marcações foram usados como primários: anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup>, anti-STI1 e anti-actina. *Western blot* representativo de 1 ensaio.

#### **5.4 Expressão das Proteínas Sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na Linhagem de Feocromocitoma PC12 Mantidas a 1% SFB e Comparação com o Tratamento com NGF**

A figura 14 mostra o resultado da expressão das proteínas sinaptofisina, PrP<sup>c</sup> e STI1 na linhagem PC12 submetida ao processo de diferenciação usando a neurotrofina NGF.

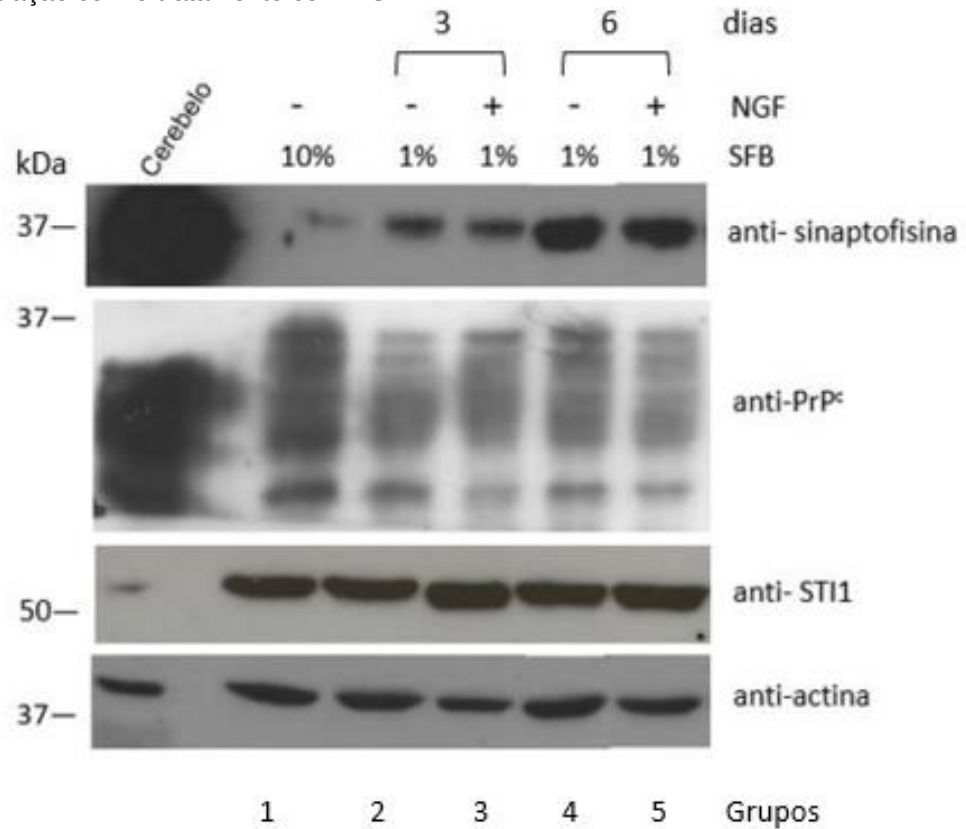
A análise visual indica que os grupos que foram mantidos com 1% SFB (grupos 2, 3, 4 e 5) tiveram um aumento na expressão de sinaptofisina em relação ao grupo 10% SFB (grupo 1). Não houve diferença na expressão da sinaptofisina entre os grupos 2 (1% SFB) e 3 (1% SFB + NGF) mantidos por 3 dias, nem entre os grupos 4 (1% SFB) e 5 (1% SFB + NGF) mantidos por 6 dias. Entretanto, é possível observar que, nos grupos 4 e 5, houve um aumento da expressão de sinaptofisina quando comparados com os grupos 2 e 3. Esse resultado demonstra ser dependente do fator tempo de diferenciação para o aumento da expressão da proteína sinaptofisina.

Nos grupos tratados com NGF (grupos 3 e 5), embora seja um fator neurotrófico usado em protocolos de diferenciação de células PC12, não demonstrou papel no aumento da expressão de sinaptofisina.

Com relação a expressão de PrP<sup>c</sup>, os grupos 1% SFB (grupos 2, 3, 4 e 5) visualmente apresentaram uma menor expressão em relação ao grupo 10% SFB (grupo 1). Não foi possível observar diferença entre os grupos 1% SFB (grupos 2 e 4) e os grupos 1% SFB + NGF (grupos 3 e 5). O fator tempo também não influenciou no padrão de expressão de PrP<sup>c</sup>.

Quanto a proteína STI1, não foi possível observar diferenças visuais entre os grupos.

Figura 14- Análise da expressão de sinaptofisina, PrPC e STI1 na linhagem de feocromocitoma de rato PC12 e comparação com o tratamento com NGF.



Fonte: A autora.

Nota: Grupo 1: 10% SFB (células mantidas em condição normal de cultivo, DMEM 10% SFB); Grupo 2: 1% SFB, células mantidas por 3 dias; Grupo 3: 1% SFB + NGF, células mantidas por 3 dias; Grupo 4: 1% SFB, células mantidas por 6 dias; Grupo 5: 1% SFB + NGF, células mantidas por 6 dias. Para as reações foram usados como primários: anti-sinaptofisina, anti-PrP<sup>c</sup>, anti-STI1 e anti-actina. *Western blot* representativo de 1 ensaio.

## 6 Discussão

O uso de linhagens celulares, bem como a combinação de moléculas, são estratégias usadas para estimular eventos de diferenciação neuronal e permitir um melhor entendimento de como este processo ocorre.

Para que haja a diferenciação neuronal, é necessário que aconteça o processo de neuritogênese, ou seja, a formação dos neuritos. Os neuritos são projeções do corpo celular, que se desenvolverão e se tornarão axônios e dendritos (YOSHIMURA; ARIMURA; KAIBUCHI, 2006).

Todo processo depende de sinais que desencadeiam a síntese de proteínas. Algumas dessas proteínas se reorganizam em direção a membrana plasmática, para a formação dos neuritos (MURAMATSU; UENO; YAMASHITA, 2009; MELDONESI, 2011).

A neuritogênese pode ser desencadeada em linhagens celulares específicas a partir do tratamento com ácido retinóico e/ou neurotrofinas (PANDINI *et al.*, 2016; HARASYM; MCANDREW; GOMEZ, 2017).

Para que o estímulo induzido pelo ácido retinóico e/ou pela neurotrofina seja eficiente, é necessário alterar as condições normais de cultivo das células, reduzindo a concentração de soro fetal bovino (SFB). A redução ou retirada total do soro do meio de cultivo das células faz com que a proliferação celular seja interrompida (COLLODI; RAWSON; BARNES, 1991; JANTAS *et al.*, 2013). Assim, a célula pode permanecer quiescente ou se diferenciar (SAHIN *et al.*, 2021).

Dentre as linhagens celulares usadas para estudo da diferenciação neuronal, estão as linhagens de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), neuroblastoma murino (Neuro2a) e feocromocitoma de rato (PC12), as quais foram usadas no trabalho aqui apresentado.

Levando em consideração este contexto, este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de proteínas relacionadas com a diferenciação neuronal, avaliando protocolos de baixo custo, nos quais foram feitos com a redução da concentração do soro fetal bovino (SFB) ou com a sua completa retirada do meio de cultivo. E ainda comparar a expressão dessas proteínas quando submetidas ao tratamento com ácido retinóico (AR) ou fator neurotrófico de nervo (NGF), que são protocolos já descritos na literatura, porém apresentam alto custo.

As proteínas analisadas neste trabalho foram a sinaptofisina, a proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) e a proteína induzida por estresse 1 (STI1). A sinaptofisina é uma proteína presente em vesículas pré-sinápticas, sendo usada como uma proteína marcadora de neurônio maduro (AYACHI *et al.*, 2018; HROMADKOVA *et al.*, 2020; MEUR; MOHEBIANY; O'CONNOR, 2009). Já as proteínas PrP<sup>c</sup> e STI1 não são consideradas proteínas marcadoras neuronais clássicas. Contudo, há alguns estudos que demonstram que essas duas proteínas participam no processo de neuritogênese (LOPES *et al.*, 2005; CAETANO *et al.*, 2008; ROFFÉ *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2021). Por levar em consideração essa informação e a disponibilidade dos anticorpos anti-PrP<sup>c</sup> e anti-STI1, resolveu-se analisar também essas duas proteínas nas células, submetidas aos protocolos de diferenciação.

Sabendo que o tecido nervoso apresenta alta expressão das três proteínas de interesse, foi feita uma validação dos anticorpos usando como amostra extrato de cerebelo de rato (OHTA *et al.*, 1993; HAJJ *et al.*, 2009) (Figura 10). O anticorpo anti-sinaptofisina reconheceu a proteína sinaptofisina expressa no tecido nervoso, a qual possui massa de 38 kDa. O anticorpo anti-PrP<sup>c</sup> foi capaz de reconhecer a forma da proteína com dois grupos glicosil (diglicosilada, ~35 kDa), a forma com um grupo glicosil (monoglicosilada, ~30 kDa) e a forma não glicosilada (~24 kDa, banda bem fraca) (ZAWLIK *et al.*, 2006). E o anticorpo anti-STI1 também reconheceu a proteína com massa de 66 kDa.

Uma vez validados os anticorpos, os mesmos foram usados nas análises das linhagens celulares submetidas a diferentes condições de diferenciação.

O primeiro ensaio realizado foi submeter as linhagens celulares a um meio de cultivo com redução da concentração de soro fetal bovino (1% e 0%) e analisar a expressão das proteínas de interesse nessas condições, comparando-as com a expressão nas condições normais de cultivo 10% SFB (Figura 11).

Na linhagem SH-SY5Y não foi possível observar a expressão da proteína sinaptofisina em nenhuma das condições experimentais. Este resultado não era esperado, pois Borsani *et al.* (2020) demonstraram que, células SH-SY5Y mantidas em condições de cultivo com 10% SFB por 72 horas apresentam expressão da proteína sinaptofisina. O resultado da não detecção poderia ser por falha do anticorpo anti- sinaptofisina utilizado. Porém, a possibilidade de não estar em condições adequadas de uso foi descartada pela avaliação realizada com este anticorpo em

amostras de cerebelo de rato (Figura 10), bem como a detecção de sinaptofisina nas linhagens PC12 e Neuro2a (Figura 11). Talvez, a condição de lise usada neste trabalho pode não ter sido adequada para extrair a proteína de interesse, já que sinaptofisina é uma proteína transmembrana com quatro passagens pela membrana (ARTHUR; STOWELL, 2007), tornando mais difícil sua solubilização. Ou ainda, pode ser que a expressão desta proteína seja mais evidente quando há outros estímulos para que ocorra a diferenciação. Por isso, o ensaio de diferenciação com SH-SY5Y foi realizado usando 10  $\mu$ M de ácido retinóico como agente indutor de diferenciação como previamente descrito (KUNZLER *et al.*, 2016). Mesmo quando as células foram estimuladas com o ácido retinóico por 3 e 6 dias, o anticorpo não detectou a proteína sinaptofisina (Figura 12). Uma possível explicação para não detecção de sinaptofisina, seria o armazenamento da linhagem celular, pois o ideal seria manter as alíquotas de estoque em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Nessa temperatura a atividade celular cessa, inibindo, ou pelo menos evitando possíveis alterações no DNA que poderiam ocorrer em outras temperaturas (MOLINARO, 2010). Porém, a linhagem utilizada foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , devida a falta de estrutura na UEPG para o armazenamento correto.

Experimentos anteriores do grupo demonstraram que extratos proteicos provenientes de diferentes lotes congelados da linhagem Neuro2a, sendo um lote do armazenamento à  $-80^{\circ}\text{C}$  por 2 anos e o outro lote cedido pelo professor Silvio Marques Zanata do Laboratório de Neurobiologia da UFPR, apresentaram diferenças na expressão da proteína sinaptofisina (resultados não mostrados). No extrato proveniente do lote de células armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  não houve expressão de sinaptofisina e, nas amostras do lote oriundo da UFPR, havia uma alta expressão de sinaptofisina, indicando a importância do armazenamento.

Já a proteína príon celular, pode ser detectada no grupo 1 com células SH-SY5Y mantidas em condições normais de cultivo (DMEM 10% SFB) no primeiro ensaio (Figura 11), mas não foi detectada no grupo 2 (1% SFB) neste mesmo ensaio (Figura 11). Os estudos de Weiss *et al.* (2010) indicam que, com a superexpressão de  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , pode-se observar a regulação de várias proteínas ligadas às atividades celulares como sinalização, organização do citoesqueleto e dobramento de proteínas, mostrando que,  $\text{PrP}^{\text{C}}$  é uma proteína que tem um papel versátil na célula. Assim, podendo ser visualizada no grupo1 (10% SFB) com células indiferenciadas.

No ensaio de diferenciação com AR por 3 e 6 dias (Figura 12), foi observado que as células SH-SY5Y mantidas em condição de 10% SFB não expressaram a proteína PrP<sup>c</sup>, porém nas demais condições, onde houve redução do SFB a 1% (grupos 2 a 5), foi possível observar a expressão de PrP<sup>c</sup>. Há uma contradição entre os experimentos (Figura 11 e 12) que pode estar relacionada à questão da passagem em que a célula se encontrava na hora do experimento. Neste experimento com AR também há uma diferença entre o meio em que as células foram mantidas em relação ao experimento da redução de SFB apresentado na figura 11, que é a presença do DMSO. Os grupos que tiveram o SFB reduzido a 1%, tiveram a adição de DMSO, que é o solvente do AR. O DMSO, também conhecido como chaperona química, funciona como uma chaperona molecular, colaborando para o dobramento correto e estabilização de proteínas, mantendo a homeostase celular (TATZELT; PRUSINER; WELCH, 1996; FONSECA *et al.*, 2021). Quando há alteração metabólica, como foi o caso, pois a célula passou do meio contendo 10% SFB para o de 1%, este composto pode ter contribuído para a adaptação celular, podendo ter efeito na estrutura de PrP<sup>c</sup>. Desta maneira, o ideal seria ter feito a comparação de um grupo de células mantidas em meio 1% SFB com adição de DMSO e outro grupo sem a adição deste reagente.

A linhagem Neuro2a apresentou visualmente um aumento da expressão de sinaptofisina nos grupos (2 e 3) com redução de 1% SFB (Figura 11). Esta pesquisa corrobora com estudos com células Neuro2a mantidas em 0,01% SFB por 4 dias tendem a se diferenciar (EVANGELOPOULOS; WEIS; KRÜTTGEN, 2005), apresentando um aumento do comprimento e no nível de ramificação dos neuritos das células em condição de redução de SFB (KUMAR; KATYAL, 2018).

Esta linhagem também apresentou visualmente uma marcação mais intensa na banda correspondente à proteína PrP<sup>c</sup> no grupo 2 (1% SFB) em comparação ao grupo 1 (10% SFB) (Figura 11). Porém, para as células Neuro2a mantidas no grupo 3 (0% SFB), a expressão de PrP<sup>c</sup> foi reduzida (Figura 11), sugerindo que, para este caso, não seja adequada a retirada total do soro para a avaliação da expressão de PrP<sup>c</sup> ou necessite de mais tempo para induzir a diferenciação para esta linhagem.

Quando realizado a diferenciação com AR da linhagem Neuro2a (Figura 13), houve um aumento na expressão de sinaptofisina nos grupos com redução de SFB por 3 dias (grupo 2 e 3) em relação ao grupo 1 (10% SFB). Não houve diferença quando foi comparado o grupo 2 (1% SFB + DMSO) com o grupo 3 (1% SFB + AR),

indicando que somente a redução do soro já leva a diferenciação e, consequentemente a expressão de sinaptofisina.

Já nos grupos 4 (1% SFB + DMSO) e 5 (1% SFB + AR) mantidos por 6 dias, observou-se que a detecção da sinaptofisina foi menor. Fazendo uma comparação deste resultado com a análise visual da expressão da proteína actina, a detecção desta proteína também foi menor. Foi possível observar, com auxílio do microscópio invertido, que, durante os experimentos, muitas células destes grupos estavam mortas (dados não mostrados). No estudo de Magalingam *et al.* (2020), foi demonstrado que a redução de SFB e a adição de AR reflete em uma significativa diminuição da viabilidade, enquanto as demais células se diferenciam. Aqui, percebe-se que independente do tratamento, só a redução da concentração do SFB já contribuiu para ocorrência de mortes nas células mantidas por 6 dias, assim, a fraca expressão, nestes grupos, indica a degradação da actina.

Segundo a figura 13, nas células Neuro2a, a expressão da proteína PrP<sup>c</sup>, nos grupos 2 e 4 (1% SFB + DMSO), apresentou visualmente um aumento em comparação ao grupo 1 (10% SFB) e aos grupos tratados com ácido retinóico (grupos 3 e 5). Este resultado demonstra que, mesmo sabendo que os níveis de PrP<sup>c</sup> sejam aumentados quando as células Neuro2a são submetidas ao tratamento de AR (BATE; LANGEVELD; WILLIAMS, 2004), só a redução de SFB é capaz de induzir a expressão da proteína PrP<sup>c</sup>, independentemente do ácido retinóico. Assim, esses resultados sugerem que é possível induzir a diferenciação neuronal na linhagem Neuro2a, submetendo às células em meio de cultivo apenas com a redução de SFB a 1% por 3 dias. Entretanto, para se afirmar que o processo de diferenciação estaria ocorrendo nessa linhagem apenas com a redução de SFB, o ideal seria realizar experimentos para avaliar a formação dos neuritos. De acordo com Kumar e Katyal (2018), células Neuro2a mantidas a 0,1% SFB com o tratamento de AR, por 24h, apresentaram uma média de comprimento do neurito de quase o dobro em relação à condição de cultivo com a redução de 0,1% SFB. Já com a redução a 0,5% SFB, a média do número de neuritos é aproximada ao do tratamento com AR, confirmando que somente a redução do soro permite análise da neuritogênese (BRYAN; CAI; LIU, 2006). Desta maneira, os resultados aqui apresentados devem ser analisados frente as alterações morfológicas exibidas pelas células e, assim, poderia ser proposto um protocolo de diferenciação baseado apenas na redução do SFB, diminuindo os custos. E a proteína

PrP<sup>c</sup> poderia ser usada como marcador na linhagem Neuro2a, da mesma forma que sinaptofisina é usada.

Para a linhagem PC12, no primeiro ensaio realizado (Figura 11) observou-se que nos grupos 2 e 3, com redução de SFB (1% e 0% SFB), a proteína sinaptofisina foi expressa. Já na condição com 10% SFB (grupo 1) não houve expressão desta proteína. E ainda, no grupo com 0% SFB a expressão foi mais evidente que no grupo 1% SFB, mostrando assim, o papel da redução do SFB no processo de diferenciação da linhagem PC12.

Segundo Beglova *et al.* (2000), a falta de soro por 56-72 h pode acarretar em morte das células PC12, exceto se acrescentar ao meio um fator neurotrófico, como o NGF. Os resultados aqui apresentados contrariam os de Beglova *et al.* (2000), demonstrando que a redução de soro pode ser suficiente para indução da diferenciação destas células, não levando a morte, quando mantidas por 3 dias nessas condições.

Com relação a expressão de PrP<sup>c</sup> houve uma leve diminuição na expressão de PrP<sup>c</sup> no grupo 2 (1% SFB) e um aumento da expressão de PrP<sup>c</sup> no grupo 3 (0% SFB) quando comparado ao grupo 1 (10% SFB) (Figura 11). Este resultado indica que a ausência do soro fetal bovino também foi suficiente para o aumento da expressão de PrP<sup>c</sup>, de forma similar à sinaptofisina, sugerindo a possibilidade de PrP<sup>c</sup> ser um marcador de diferenciação de PC12. Além de considerar que, Loubet *et al.* (2012) já demonstraram que o silenciamento de PrP<sup>c</sup> leva a falhas no processo de diferenciação neuronal, mostrando a importância de PrP<sup>c</sup> neste processo.

Uma vez observada essa possibilidade das células se diferenciarem apenas com a redução do SFB, foi feita uma comparação com a diferenciação induzida por NGF, a qual já é estabelecida (WIATRAK *et al.*, 2020). Como o tempo de diferenciação iria também ser avaliado, optou-se por diferenciar a linhagem PC12 com a redução a 1% de SFB, para que não houvesse morte no maior tempo de diferenciação que seria 6 dias.

Os experimentos de diferenciação com a linhagem PC12 tratada com NGF (Figura 14) demonstraram que os grupos 2 a 5 (1% SFB) tiveram um aumento na expressão da sinaptofisina em relação ao grupo 10% SFB. E esse aumento ainda ficou mais evidente quando o tempo de diferenciação foi de 6 dias. Os resultados apresentados concordam como os de Lai *et al.* (2011), que com a redução do SFB e

adição de NGF, há a interrupção da proliferação, levando a formação dos neuritos. Entretanto, no trabalho aqui apresentado, as células tratadas com NGF não tiveram uma maior expressão de sinaptofisina. Desta maneira, a diminuição do SFB do meio para 1% foi o fator determinante para estimular a expressão da proteína sinaptofisina, bem como o tempo de diferenciação.

De acordo com estudos de Hu *et al.* (2018), o uso de diferentes meios, em diferentes concentrações de soro fetal bovino influenciam no comprimento do neurito das células PC12 tratadas com NGF. Demonstrando que, além da escolha do meio, o tempo é um fator preponderante para obter melhores resultados, que seria no caso 6 dias.

No ensaio usando NGF (Figura 14), a expressão de PrP<sup>c</sup> foi menor nos grupos 1% SFB (grupos 2 a 5) com relação ao grupo 10% SFB (grupo 1) e, mesmo com a adição do fator neurotrófico, não houve aumento na expressão de PrP<sup>c</sup>. Este resultado diverge dos experimentos de Zawlik *et al.* (2006) onde as células PC12, tratadas com NGF, mostram um aumento da expressão de PrP<sup>c</sup> pela via de sinalização de MAPK/MEK, que induz a neuritogênese.

Dentre as funções desta proteína, também pode-se observar seu envolvimento na proliferação de células cancerosas e migração (RICHARD; GHAZI; PUIG, 2021). Logo, por se tratar da linhagem feocromocitoma, as células do grupo 10% estão em intensa proliferação, sendo que o PrP<sup>c</sup> poderia estar envolvido nesta atividade nesta linhagem. Sendo assim, neste modelo de diferenciação de células PC12, PrP<sup>c</sup> não poderia ser usado como marcador de diferenciação neuronal.

Com relação a proteína STI1, uma alta expressão foi observada nas três linhagens. Seu padrão de expressão permaneceu inalterado em todas as condições avaliadas. Como não foi possível observar diferenças visuais na expressão de STI1, pode-se afirmar que sua expressão não sofre alterações em função da concentração do soro fetal bovino, nem com o tratamento de AR, nem com NGF.

Esperava-se que, durante os tratamentos de diferenciação das linhagens com RA ou NGF, um aumento na expressão da proteína STI1, por se tratar de uma proteína que ao interagir com PrP<sup>c</sup>, nas fases iniciais do processo de neuritogênese, promove a elongação do neurito (SOUZA *et al.*, 2014).

A interação destas proteínas deve-se por STI1 ser uma co-chaperona, ou seja, uma proteína que se associa à outra proteína, contribuindo para o dobramento

correto, modificando a sua função (EUSTACE; JAY, 2004; FONSECA *et al.*, 2021). Logo, STI1 e PrP<sup>c</sup> formam um complexo, que é endocitado para promover a neuritogênese (CAETANO *et al.*, 2008).

Nos modelos aqui estudados, pode ser que PrP<sup>c</sup> interaja com outras moléculas para atuar na neuritogênese. Além da associação com STI1, PrP<sup>c</sup> também interage com reggie, N-caderina (BODRIKOV; SOLIS; STUERMER, 2011), NCAM (ALLEAUME-BUTAUX *et al.*, 2013), laminina (MAHABADI; TAGHIBIGLOU, 2020) contribuindo para diferenciação neuronal, desencadeada pela ativação da via de sinalização MAPK (BODRIKOV; SOLIS; STUERMER, 2011).

Embora existam informações sobre o envolvimento de STI1 ligado à PrP<sup>c</sup> na neuritogênese, por se tratar de uma proteína que participa da importação de proteínas mitocondriais, atuando na manutenção celular (HOSEINI *et al.*, 2016) e com base nos resultados de expressão de STI1 neste estudo, é possível indicar que seja expressa constitutivamente, não podendo ser um marcador neuronal.

## 6.1 Perspectivas

Sabendo que, as células PC12 mostraram bons resultados na ausência de soro fetal bovino (0% SFB) (Figura 11), pois tanto sinaptofisina quanto PrP<sup>c</sup> tiveram um aumento na expressão, logo esta linhagem pode ser considerada promissora para trabalhos futuros de diferenciação, que poderiam ser realizados com a expansão do tempo de diferenciação.

Nas culturas de neurônios tratadas com NGF, ao qual foi observado por imunofluorescência, a proteína sinaptofisina se apresenta em regiões distintas do neurito, adjacente ao soma e na extremidade e, devido ao tráfego de vesículas sinápticas, há o aumento da expressão desta proteína na região do cone de crescimento (TARSA; BALKOWIEC, 2009). Assim, outra sugestão para a continuidade dos estudos seria utilizar a técnica de imunofluorescência, que corroboraria nos resultados sobre a expressão de sinaptofisina em PC12 mantidas na redução de SFB.

A linhagem modelo Neuro2a para estudos de diferenciação também obteve resultados promissores. Estes foram vistos em condição de 1% SFB por 3 dias, que

apresentou maior expressão das proteínas sinaptofisina e PrP<sup>c</sup> em comparação com as células tratadas com AR.

Para um melhor entendimento do processo de neuritogênese, ensaios usando microscopia e análise morfológica da formação dos neuritos tornam-se essenciais.

Neuroblastoma e feocromocitoma apresentam diferentes vias de sinalização para a diferenciação (por exemplo, a Trk) (EGGERT *et al.*, 2000). Estes receptores ativados estimulam vias de sinalização específicas que geram neuritogênese, podendo ocasionar diferenças de expressão de marcadores neuronais (EGGERT *et al.*, 2000). Os resultados obtidos com a linhagem feocromocitoma de rato (PC12) e neuroblastoma murino (Neuro2a) poderiam ser relacionados a sinalização, e também, pela mudança de protocolo (diferenciação com a redução da concentração de SFB) um estudo sobre a adesão ao substrato (WIATRAK *et al.*, 2020) é pertinente.

## 7 Conclusão

\*Para a linhagem Neuro2a, a redução de soro fetal bovino (1%SFB) foi suficiente para induzir aumento na expressão das proteínas sinaptofisina e PrP<sup>c</sup>.

\*Na linhagem PC12, a redução de soro fetal bovino (1%SFB) foi suficiente para induzir a expressão da proteína sinaptofisina, não sendo necessária a adição de NGF. Além disso, essa expressão mostrou-se ser tempo dependente. Já a ausência de soro fetal bovino (0%SFB) sugere ser suficiente para induzir a expressão das proteínas sinaptofisina e PrP<sup>c</sup> nesta linhagem.

\*Não houve alteração na expressão da proteína STI1 nas condições de diferenciação das linhagens avaliadas.

\*Apenas PrP<sup>c</sup> se mostra como um possível marcador de diferenciação neuronal em Neuro2a e PC12

## Referências

- AGRAWAL, M.; WELSHHANS, M. Local Translation Across Neural Development: A Focus on Radial Glial Cells, Axons, and Synaptogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 14, p. 717-170, 2021.
- ALLEAUME-BUTAU, A.; DAKOWSKI, C.; PIETRI, M.; RICHARD, S. M.; LAUNAY, J.; KELLERMANN, O.; SCHNEIDER, B. Cellular prion protein is required for neuritogenesis: fine-tuning of multiple signaling pathways involved in focal adhesions and actin cytoskeleton dynamics. **Cell Health and Cytoskeleton**, v. 5, p. 1-12, 2013.
- ALTUN-GULTEKIN, Z. F.; WAGNER, J. A. Src, ras, and rac mediate the migratory response elicited by NGF and PMA in PC12 cells. **Journal of neuroscience research**, v. 44, n. 4, p. 308-27, 1996.
- ARAKI, R.; NISHIDA, S.; NAKAJIMA, Y.; IWAKUMO, A.; TACHIOKA, H.; KITA, A.; YABE, T. Low folate induces abnormal neuronal maturation and DNA hypomethylation of neuronal differentiation-related genes in cultured mouse neural stem and progenitor cells. **Heliyon**, v. 7, p. 1-13, 2021.
- ARTHUR, C. P.; STOWELL, M. H. B. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL domain channel protein. **Structure**, v. 15, p. 707–714, 2007.
- AYACHI, I. E.; ZHANG, J.; ZOU, X. Y.; LI, D.; YU, Z.; WEI, W.; O'CONNELL, K. M. S.; HUANG, G. T. J. Human dental stem cell derived transgene-free iPSCs generate functional neurons via embryoid body-mediated and direct induction methods. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 12, n. 4, p. 1-30, 2018.
- BATE, C.; LANGEVELD, J.; WILLIAMS, A. Manipulation of PrPres production in scrapieinfected neuroblastoma cells. **Journal of Neuroscience Methods**, v.138, p. 217–223, 2004.
- BAUER, R. A.; KHERA, R. S.; LIEBER, J. L.; ANGLESON, J. K. Recycling of intact dense core vesicles in neurites of NGF-treated PC12 cells. **FEBS Letters**, v. 571. p. 107–111, 2004.
- BEGLOVA, N.; MALIARTCHOUK, S.; EKIEL, I.; ZACCARO, M. C.; SARAGOV, H. U.; GEHRING, K. Design and Solution Structure of Functional Peptide Mimetics of Nerve Growth Factor. **J. Med. Chem**, v. 43, p. 3530-3540, 2000.
- BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and growth, Tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. **Cancer Research**, v. 33, p. 2643–2652, 1973.
- BLANCO, V.; CAMELO, J. L.; CARRI, N. G. Growth inhibition, morphological differentiation and stimulation of survival in neuronal cell type (Neuro-2a) treated with trophic molecules. **Cell Biology International**, v. 25, n. 9, p. 909–917, 2001.

BODRIKOV, V.; SOLIS, G. P.; STUERMER, C. A. O. Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 49, p. 18013–18025, 2011.

BORSANI, E.; BUFFOLI, B.; BONAZZA, V.; BRUNELLI, G.; MONINI, L.; INCHINGOLO, F.; BALLINI, A.; REZZANI, R.; RODELLA, L. F. In vitro effects of concentrated growth factors (CGF) on human SH-SY5Y neuronal cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 304-314, 2020.

BOTHWELL, M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. **F1000 Research**, v. 5, n. 1885, 2016.

BRYAN, B. A.; CAI, Y.; LIU, M. The Rho-family guanine nucleotide exchange factor GEFT enhances retinoic acid- and cAMP-induced neurite outgrowth. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, p. 1151–1159, 2006.

CAETANO, F. A.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N. M.; MACHADO, C. F.; ARANTES, C. P.; MAGALHÃES, A. C.; VIEIRA, M. P. B.; AMÉRICO, T. A.; MASSENSINI, A. R.; PRIOLA, S. A.; VORBERG, I.; GOMEZ, M. V.; LINDEN, R.; PRADO, V. F.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. M. Endocytosis of Prion Protein Is Required for ERK1/2 Signaling Induced by Stress-Inducible Protein. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 26, p. 6691– 6702, 2008.

CANTELI, M. C.; PIGNATELLI, M.; SANTOS, A.; CASTILLO, A. P. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5460–5467, 2002.

CHAUDHARI, N.; RAVANAN, P. Bardoxolone methyl induces neuritogenesis in Neuro2a cells. **Pharmacological Reports**, v. 70, p. 730–736, 2018.

COLLODI, P.; RAWSON, C.; BARNES, D. Serum-free culture of carcinoma cell lines. **Cytotechnology**, v. 5, p. 31-46, 1991.

COSTA, M. D. M.; PALUDO, K. S.; KLASSEN, G.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; MARTINS, V. R.; CAMARGO, A. A.; NAKAO, L. S.; ZANATA, S. M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461, p. 16-20, 2009.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 397–406, 2004.

DICKEY, C. A.; MESQUITA, D. D.; MORGAN, D.; PENNYPACKER, K. R. Induction of memory-associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells. **Neuroscience Letters**, v.366, p. 10–14, 2004.

EGGERT, A.; IKEGAKI, N.; LIU, X.; CHOU, T. T.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q.; BRODEUR, G. M. Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways

mediating differentiation in human neuroblastoma cells. **Oncogene**, v. 19, p. 2043-2051, 2000.

ENCINAS, M.; IGLESIAS, M.; LIU, Y.; WANG, H.; MUHAISEN, A.; CEÑA, V.; GALLEGU, C.; COMELLA, J. X. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 991-1003, 2000.

ENCINAS, M.; IGLESIAS, M.; LLECHA, N.; COMELLA, J. X. Extracellular-Regulated Kinases and Phosphatidylinositol 3-Kinase Are Involved in Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Survival and Neuriteogenesis of the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. **J. Neurochem**, v. 73, p. 1409–1421, 1999.

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

EVANGELOPOULOS, M. E.; WEIS, J.; KRÜTTGEN, A. Neurotrophin effects on neuroblastoma cells: correlation with Trk and p75NTR expression and influence of Trk receptor bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 66, p. 101–110, 2004.

EVANGELOPOULOS, M. E.; WEIS, J.; KRÜTTGEN, A. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation of EGFR. **Oncogene**, v. 24, p. 3309-3318, 2005.

FALSAFI, N.; SOLEIMANI, T.; FALLAHI, H.; AZADBAKHT, M. Regulatory networks upon neurogenesis induction in PC12 cell line by small molecules. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 18813–18824, 2019.

FLYNN, K. C. The cytoskeleton and neurite initiation. **BioArchitecture**, v. 3, n. 4, p. 86–109, 2013.

FONSECA, A. C. C.; MATIAS, D.; GERALDO, L. H. M.; LESER, F. S.; PAGNONCELLI, I.; GARCIA, C.; AMARAL, R. F.; ROSA, B. G.; GRIMALDI, I.; MAGALHÃES, E. S. C.; COPPOLA-SEGOVIA, V.; AZEVEDO, E. M.; ZANATA, S. M.; LIMA, F. R. S. The multiple functions of the co-chaperone stress inducible protein 1. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 57, p. 73–84, 2021.

FUJITA, K.; LAZAROVICI, P.; GUROFF, G. Regulation of the Differentiation of PC12 Pheochromocytoma Cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 80. p. 127-142, 1989.

GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

HAJJ, G. N. M.; SANTOS, T. G.; COOK, Z. S. P.; MARTINS, V. R. Developmental Expression of Prion Protein and Its Ligands Stress-Inducible Protein 1 and Vitronectin. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 517, p. 371–384, 2009.

HALL, A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 509–514, 1998.

HAN, N. R.; WEN, J.; LIN, Q.; TAN, P. L.; LIOU, Y.; SHEU, F. Proteomics Analysis of the Expression of Neurogranin in Murine Neuroblastoma (Neuro-2a) Cells Reveals Its Involvement for Cell Differentiation. **International Journal of Biological Sciences**, v.3, n. 5, p. 263-273, 2007.

HAQUE, A.; POLCYN, R.; MATZELLE, D.; BANIK, N. L. New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. **Brain Sci**, v. 8, n.33, p. 1-12, 2018.

HARASYM, E.; MCANDREW, N.; GOMEZ, G. Sub-micromolar concentrations of retinoic acid induce morphological and functional neuronal phenotypes in SK-N-SH neuroblastoma cells. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal**, v. 53, p. 798–809, 2017.

HARRILL, J. A.; ROBINETTE, B. L.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Media formulation influences chemical effects on neuronal growth and morphology. **In Vitro Cell.Dev.Biol.— Animal**, v. 51, p. 612–629, 2015.

HEINE, C.; SYGNECKA, K.; FRANKE, H. Purines in neurite growth and astroglia activation. **Neuropharmacology**, p. 1-17, 2015.

HOSEINI, H.; PANDEY, S.; JORES, T.; SCHMITT, A.; WACHTEL, M. F.; MACEK, B.; BUCHNER, J.; DIMMER, K. S.; RAPAPORT, D. The cytosolic co-chaperone Sti1 is relevant for mitochondrial biogenesis and morphology. **The FEBS Journal**, v.283, n.18, p. 3338– 3352, 2016.

HROMADKOVA, L.; BEZDEKOVA, D.; PALA, J.; WEISS, S. S.; TJERNBERG, L. O.; HOSCHL, C.; OVSEPIAN, S. V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive neurons. **Molecular Cell Research**, v.1867, p. 1-11, 2020.

HU, B. Y.; WEICK, J. P.; YU, J.; MA, L. X.; ZHANG, X. Q.; THOMSON, J. A.; ZHANG, S. C. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. **PNAS**, v. 107, n. 9, p. 4335- 4340, 2010.

HU, R. G.; CAO, Q.; SUN, Z. Q.; CHEN, J.; XIAO, F. A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41. p. 195-201, 2018.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 24, p. 677–736, 2001.

ISGRÒ, M. A.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 867, p. 125–143, 2015.

JANTAS, D.; ROMAN, A.; KUSMIERCZYK, J.; LORENC-KOCI, E.; KONIECZNY, J.; LENDA, T.; LASON, W. The Extent of Neurodegeneration and Neuroprotection in Two Chemical In Vitro Models Related to Parkinson's Disease is Critically Dependent on Cell Culture Conditions. **Neurotox Res**, v. 24, p. 41–54, 2013.

JOSHI, S.; GULERIA, R. S.; PAN, J.; DIPETTE, D.; SINGH, U. S. Heterogeneity in retinoic acid signaling in neuroblastomas: Role of matrix metalloproteinases in retinoic acid-induced differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 1093–1102, 2007.

KHODOSEVICH, K.; MONYER, H. Signaling in migrating neurons: from molecules to networks. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, n. 28, p. 1-9, 2011.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. **Methods Mol Biol**, v. 1078, p. 9–21, 2013.

KRISHNA, A.; BIRYUKOV, M.; TREFOIS, C.; ANTONY, P. M. A.; HUSSONG, R.; LIN, J.; HEINÄNIEMI, M.; GLUSMAN, G.; KÖGLSBERGER, S.; BOYD, O.; VAN DEN BERG, B. H. J.; LINKE, D.; HUANG, D.; WANG, K.; HOOD, L.; THOLEY, A.; SCHNEIDER, R.; GALAS, D. J.; BALLING, R.; MAY, P. Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1154, p. 2- 21, 2014.

KUDO, T.; KANETAKA, H.; MOCHIZUKI, K.; TOMINAMI, K.; NUNOME, S.; ABE, G.; KOSUKEGAWA, H.; ABE, T.; MORI, H.; MORI, K.; TAKAGI, T.; IZUMI, S. Induction of Neurite Outgrowth in PC12 Cells Treated with Temperature-Controlled Repeated Thermal Stimulation. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 1-15, 2015.

KUMAR, M. K.; KATYAL, A. Data on retinoic acid and reduced serum concentration induced differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. **Data in Brief**, v. 21, p. 2435-2440, 2018.

KUNZLER, A.; CHULIÁ, F. Z.; GASPAROTTO, J.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; PETIZ, L. L.; BORTOLIN, R. C.; ROSTIROLLA, D. C.; ZANOTTO FILHO, A.; PASQUALI, M. A. B.; DICKSON, P.; DUNKLEY, P.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. **Mol Neurobiol**, p. 114, 2016.

LAI, H.; WU, M.; CHEN, P.; SHEU, T.; CHIU, S.; LIN, M.; HO, C.; YEN, J. Neurotrophic Effect of Citrus 5-Hydroxy-3,6,7,8,39,49- Hexamethoxyflavone: Promotion of Neurite Outgrowth via cAMP/PKA/CREB Pathway in PC12 Cells. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 1-14, 2011.

LEE, R.; KERMANI, P.; TENG, K. K.; HEMPSTEAD, B. L. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. **Science**, v. 294, p. 1945-1947, 2001.

LEUNG, Y.; HUANG, C.; CHAO, C.; LU, D.; KUO, C.; CHENG, T.; CHANG, L.; CHOU, C. Voltage-Gated KR Channels Play a Role in cAMP-Stimulated Neuritogenesis in Mouse Neuroblastoma N2A Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, p. 1090–1098, 2011.

LINDEN, R.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. M., CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R. R. Physiology of the Prion Protein. **Physiol Ver**, v. 88, p. 673–728, 2008.

LO PRESTI, P.; POLUHA, W.; POLUHA, D. K.; DRINKWATER, E.; ROSS, A. H. Neuronal differentiation triggered by blocking cell proliferation. **Cell Growth and Differentiation**, v. 3. p. 627-635, 1992.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A.; SCOTT, M. P. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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

LOUBET, D.; DAKOWSKI, C.; PIETRI, M.; PRADINES, E.; BERNARD, S.; CALLEBERT, J.; OSORIO, H. A.; RICHARD, S. M.; LAUNAY, J.; KELLERMANN, O.; SCHNEIDER, B. Neuritogenesis: the prion protein controls 1 integrin signaling activity. **FASEB Journal**, v. 26, p. 678–690, 2012.

LYKISSAS, M. G.; BATISTATOU, A. K.; CHARALABOPOULOS, K. A.; BERIS, A. E. The Role of Neurotrophins in Axonal Growth, Guidance, and Regeneration. **Current Neurovascular Research**, v. 4, p. 143-151, 2007.

MA, Y.; NING, N.; HE, W.; LI, J.; HU, J.; CHU, S.; CHEN, N. Claulansine F promotes neuritogenesis in PC12 cells via the ERK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, p. 1499–1507, 2013.

MAGALINGAM, K. B.; RADHAKRISHNAN, A. K.; SOMANATH, S. D.; MD, S.; HALEAGRAHARA, N. Infuence of serum concentration in retinoic acid and phorbol ester induced diferentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 8775–8788, 2020.

MAHABADI, H. M.; TAGHIBIGLOU, C. Cellular Prion Protein (PrPc): Putative Interacting Partners and Consequences of the Interaction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7058, p. 1-38, 2020.

MARZINKE, M. A.; CLAGETT-DAME, M. The all-trans retinoic acid (atRA)-regulated gene Calmin (Cimn) regulates cell cycle exit and neurite outgrowth in murine neuroblastoma (Neuro2a) cells. **Experimental Cell Research**, v. 318, p. 85 – 93, 2012.

MELDONESI, J. Neurite outgrowth: This process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. **Brain Research Reviews**, v. 66. p. 246-255, 2011.

MEUR, A. M.; MOHEBIANY, A. N.; O'CONNOR, T. P. Varicones and Growth Cones: Two Neurite Terminals in PC12 Cells. **Plos One**, v. 4, 2009.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV IOC, 2010.

MONAGHAN, T. K.; MACKENZIE, C. J.; PLEVIN, R.; LUTZ, E. M. PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, p. 74–88, 2008.

MOULSON, M. C.; NELSON, C. A. Neurological Development. **Elsevier**, p.414-424, 2008.

MULLENBROCK, S.; SHAH, J.; COOPER, G. M. Global Expression Analysis Identified a Preferentially Nerve Growth Factor-induced Transcriptional Program Regulated by Sustained Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and AP-1 Protein Activation during PC12 Cell Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 45131–45145, 2011.

MURAMATSU, R.; UENO, M.; YAMASHITA, T. Intrinsic regenerative mechanisms of central nervous system neurons. **BioScience Trends**, v. 3, n. 5, p. 179-183, 2009.

OHTA, M.; KITAMOTO, T.; IWAKI, T.; OHGAMI, T.; FUKUI, M.; TATEISHI, J. Immunohistochemical distribution of amyloid precursor protein during normal rat development. **Developmental Brain Research**, v. 75, p. 151-161, 1993.

PAIK, S.; SOMVANSHI, R. K.; KUMAR, U. Somatostatin-Mediated Changes in Microtubule Associated Proteins and Retinoic Acid–Induced Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells. **J Mol Neurosci**, v. 68, p. 120–134, 2019.

PANDINI, G.; SATRIANO, C.; PIETROPAOLO, A.; GIANI, F.; TRAVAGLIA, A.; LA MENDOLA, D.; NICOLETTI, V. G.; RIZZARELLI, E. The Inorganic Side of NGF: Copper(II) and Zinc(II) Affect the NGF Mimicking Signaling of the N-Terminus Peptides Encompassing the Recognition Domain of TrkA Receptor. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 569, p. 121, 2016.

PANSRI, P.; PHANTHONG, P.; SUTHPRASERTPORN, N.; KITIYANANT, Y.; TUBSUWAN, A.; DINNYES, A.; KOBOLAK, J.; KITIYANANT, N. Brain-derived neurotrophic factor increases cell number of neural progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cell. **Peer J**, v. 9, p. 1-15, 2021.

PANTERA, B.; BINI, C.; CIRRI, P.; PAOLI, P.; CAMICI, G.; MANAO, G.; CASELLI, A. PrPc activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, p. 194–207, 2009.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, p. 272–280, 2001.

RAJGOR, D.; WELLE, T. M.; SMITH, K. R. The Coordination of Local Translation, Membranous Organelle Trafficking, and Synaptic Plasticity in Neurons. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 711446, p. 1-14, 2021.

RICHARD, S. M.; GHAZI, A.; PUIG, P. L. The Cellular Prion Protein and the Hallmarks of Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 5032, p. 1-18, 2021.

ROFFÉ, M.; BERALDO, F. H.; BESTER, R.; NUNZIANTE, M.; BACH, C.; MANCINI, G.; GILCH, S.; VORBERG, I.; CASTILHO, B. A.; MARTINS, V. R.; HAJJ, G. N. M. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **PNAS**, v. 107, n. 29, p. 13147–13152, 2010.

RYU, H.; CHUNG, M.; DOBRZYNSKI, M.; FEY, D.; BLUM, Y.; LEE, S.S.; PETER, M.; KHOLODENKO, B. N.; JEON, N. L.; PERTZ, O. Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate. **Molecular Systems Biology**, v. 11, p. 838-852, 2015.

SAHIN, M.; ONCÜ, G.; YILMAZ, M. A.; OZKAN, D.; SAYBASILI, H. Transformation of SHSY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. **Neuroscience Letters**, v. 745, n. 135628, p. 1-8, 2021.

SAINATH, R.; GALLO, G. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. **Cell Tissue Res**, v. 359, p. 267–278, 2015.

SCHROCK, Y.; SOLIS, G. P.; STUERMER, C. A. O. Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrPc). **FEBS Letters**, v. 583, p. 389– 393, 2009.

SHIGETA, M.; SHIBUKAWA, Y.; IHARA, H.; MIYOSHI, E.; TANIGUCHI, N.; GU, J.  $\beta$  1,4- N-Acetylglucosaminyltransferase III potentiates  $\alpha$ 1 integrin-mediated neuritogenesis induced by serum deprivation in Neuro2a cells. **Glycobiology**, v. 16, n. 6, p. 564–571, 2006.

SHUKLA, S.; TEKWANI, B. L. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 537, p. 1-20, 2020.

SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3. p. 694-704, 2002.

SILVAGNO, F.; GUARNIERI, V.; CAPIZZI, A.; PESCARMONA, G. P. Synergistic effect of retinoic acid and dehydroepiandrosterone on differentiation of human neuroblastoma cells. **FEBS Letters**, v. 532, p. 153-158, 2002.

SOUZA, L. E. R.; COSTA, M. D. M.; BILEKA, E.S.; LOPES, M. H.; MARTINS, V. R.; PÜSCHELF, A. W.; MERCADANTE, A. F.; NAKAO, L. S.; ZANATA, S. M. STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Experimental cell research**, v. 324, p. 84 – 91, 2014.

TARSA, D. D. S. L.; BALKOWIEC, M. D. A. Nerve Growth Factor Regulates Synaptophysin Expression in Developing Trigeminal Ganglion Neurons in Vitro. **Neuropeptides**, v. 43, n. 1, p. 47–52, 2009.

TATZELT, J.; PRUSINER, S. B.; WELCH, W. J. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. **The EMBO Journal**, v.15, n. 23, p. 6363-6373, 1996.

TEPPOLA, H.; SARKANEN, J.; JALONEN, T. O.; LINNE, M. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. **Neurochem Res**, v. 41, p. 731–747, 2016.

TIBERIO, A.; FARINA, A. R.; TACCONELLI, A.; CAPPABIANCA, L.; GULINO, A.; MACKAY, A. R. Retinoic acid-enhanced invasion through reconstituted basement membrane by human SK-N-SH neuroblastoma cells involves membrane-associated tissue-type plasminogen activator. **Int. J. Cancer**, v. 73, p. 740–748, 1997.

TOJIMA, T.; ITO, E. Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 183–193, 2004.

TORRES, V. I.; INESTROSA, N. C. Vertebrate Presynaptic Active Zone Assembly: a Role Accomplished by Diverse Molecular and Cellular Mechanisms. **Mol Neurobiol**, v. 55, p. 4513–4528, 2018.

TREMBLAY, R. G.; SIKORSKA, M.; SANDHU, J. K.; LANTHIER, P.; LUTKIEWICZ, M. R.; YAGHOUB, M. B. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 186, p. 60–67, 2010.

VAUDRY, D.; STORK, P. J. S.; LAZAROVICI, P.; EIDEN, L. E. Signaling Pathways for PC12 Cell Differentiation: Making the Right Connections. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1648-1649, 2002.

VILLARROEL- CAMPOS, D.; GASTALDI, L.; CONDE, C.; CACERES, A.; GONZALEZ-BILLAULT, C. Rab- mediated trafficking role in neurite formation. **Journal of Neurochemistry**, v.129, p. 240–248, 2014.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v.46, n. 4, p.351-360, 2002.

WEISS, E.; RAMLJAK, S.; ASIF, A. R.; CIESIELCZYK, B.; SCHMITZ, M.; GAWINECKA, J.; SCHAEFFER, W. S.; BEHRENS, C.; ZERR, I. Cellular prion protein overexpression disturbs cellular homeostasis in SH-SY5Y neuroblastoma cells but does not alter p53 expression: a proteomic study. **Neuroscience**, v. 169, p. 1640 – 1650, 2010.

WIATRAC, B.; KUBIS-KUBIAK, A.; PIWOWAR, A.; BARG, E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, v. 9, n. 958, p. 1-15, 2020.

WULF, M. A.; SENATORE, A.; AGUZZI, A. The biological function of the cellular prion protein: An update. **BMC Biology**, v. 15, n.34, p. 1–13, 2017.

XIAO, J.; LIU, Y. Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neuritogenesis: a study in a novel PC12 model system. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, p. 1516–1523, 2003.

XIE, H.; HU, L.; LI, G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chin Med J**, v. 123, n. 8, p.1086-1092, 2010.

YANG, J.; LIN, Y.; CHEN, W.; YANG, Y.; SUN, S.; CHEN, S. The Neurotrophic Function of Glucagon-Like Peptide-1 Promotes Human Neuroblastoma Differentiation via the PI3K-AKT Axis. **Biology**, v. 9, n. 348, p. 1-16, 2020.

YOSHIMURA, T.; ARIMURA, N.; KAIBUCHI, K. Signaling Networks in Neuronal Polarization. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 42, p. 10626 –10630, 2006.

YOU, Q.; GONG, Q.; HAN, Y.; PI, R.; DU, Y.; DONG, S. Role of miR-124 in the regulation of retinoic acid-induced Neuro-2A cell differentiation. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 6, p. 1133-1139, 2020.

YOUNG, J. J.; MEHDI, A.; STOHL, L. L.; LEVIN, L. R; BUCK, J.; WAGNER, J. A.; STESSIN, A. M. "Soluble" Adenylyl Cyclase-Generated Cyclic Adenosine Monophosphate Promotes Fast Migration in PC12 Cells. **Journal Neuroscience Res**, v. 86, n. 1, p. 118-124, 2008.

ZAWLIK, I.; WITUSIK, M.; BIGOSZEWSKA, K. H.; PIASKOWSKI, S.; SZYBKA, M.; GOLANSKA, E.; LIBERSKI, P. P.; RIESKE, P. Regulation of PrP<sup>C</sup> expression: Nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells. **Neuroscience Letters**, v. 400, p. 58–62, 2006.

ZHAO, Y.; LIU, D.; LI, J.; ZHANG, X.; WANG, X. L-NBP, a multiple growth factor activator, attenuates ischemic neuronal impairments possibly through promoting neurogenesis. **Neurochemistry International**, v.124, p.94-105, 2019.