

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Felipe Schmiddel

**EFEITOS DO AMP_c INTRACELULAR SOBRE A DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS**

Santa Maria, RS, Brasil
2022

Felipe Schmiddel

**EFEITOS DO AMPc INTRACELULAR SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS, Brasil
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Schmiddele, Felipe
EFEITOS DO AMPc INTRACELULAR SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS PROGENITORAS NEURALS / Felipe Schmiddele.- 2022.
61 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Fernando Mello
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2022

1. Neuroesferas 2. AMPc 3. Neuropsicofarmacologia I.
Mello, Carlos Fernando II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FELIPE SCHMIDDEL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Felipe Schmiddel

**EFEITOS DO AMPc INTRACELULAR SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS**

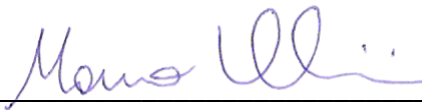
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2022



Carlos Fernando de Mello, Dr (UFSM)

Presidente (Orientador)



Mauro Schneider Oliveira, Dr (UFSM)



Karen Renata Herculano Matos Oliveira, Dra (UFPA)

Santa Maria, RS, Brasil
2022

RESUMO

EFEITOS DO AMPc INTRACELULAR SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIAS

AUTOR: Felipe Schmiddel

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Estímulos intrínsecos e extrínsecos contribuem para o crescimento e diferenciação de células progenitoras neurais (NPCs). Os estímulos extracelulares fazem com que as NPCs se diferenciem em células gliais e neurônios. Já no nível intracelular, as vias de sinalização, como os processos dependentes de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), também controlam a expressão gênica, a proliferação, a migração celular e o crescimento de neuritos. A produção de AMPc está diretamente relacionada com o aumento do crescimento de neuritos em diferentes linhagens celulares, mas os efeitos deste segundo mensageiro em NPCs embrionários ainda não foram totalmente esclarecidos. Para investigar o efeito do aumento do AMPc sobre a proliferação, diferenciação de NPCs, utilizamos um modelo de neuroesferas, que são agregados celulares flutuantes de NPCs, que contemplam a maior parte dos processos que ocorrem nos estágios iniciais do desenvolvimento neural. Este é, portanto, um excelente modelo de estudo *in vitro* para avaliar a influência das vias dependentes de AMPc nestes processos. Portanto, neste estudo investigamos o efeito do aumento do AMPc nos processos de desenvolvimento neural que contemplam a proliferação, o crescimento de neuritos, neurogênese, gliogênese e migração observados em NPCs *in vitro*. Observamos que a proliferação das NPCs é potencializada por forskolina, dibutilil AMPc (db-AMPc) e toxina pertussis (PTX). O db-AMPc aumentou a diferenciação das NPCs em neurônios, na medida em que aumentou a frequência de células neuronais positivas para beta-3-tubulina e MAP2⁺, além de promover o crescimento de neuritos. Observamos ainda, que a migração neural foi amplamente restrita em NPCs tratados com db-cAMP ou PTX em comparação com controles, evidenciado por um número reduzido de células que se distanciaram das neuroesferas. Concluímos que as vias de sinalização do AMPc estimulam o crescimento de neuritos e bloqueiam a migração de NPCs durante a diferenciação celular.

Palavras-chave: Monofosfato de adenosina. Neuroesferas. NPCs. Proliferação celular. Diferenciação de NPCs.

ABSTRACT

EFFECTS OF INTRACELLULAR cAMP ON DIFFERENTIATION OF NEURAL PROGENITOR CELLS

AUTHOR: Felipe Schmiddel

ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Intermediate and extrinsic intrinsic stimuli contribute to the growth of progenitor cells (NPCs). Extracellular stimuli cause NPCs to differentiate into glial cells and neurons. At the intracellular level, as signaling pathways, cyclic adenosine (cAMP) expression is also dependent on the control of gene expression, such as cell transition processes and neurite outgrowth. The production of cAMP is directly related to the increase in deneurite growth in different cell lines, but the effects of this second line of growth on NPCs are not yet fully understood. To investigate the effects of cAMP on an augmented model of NPCs, which are augmented of the model of NPCs, which increase the capacity of NPCs, which encompass the neurospheres of most neural processes that extend into the early stages of development. This is, therefore, an excellent in vitro study model to assess the influence of cAMP-dependent pathways on these processes. Therefore, in this study, we investigated the effect of cAMP in the study of cAMPs that contemplate an increase in the development of neurogenesis, neurogenesis, gliogenesis and migrations in NPCs in vitro. We observed that the cAMP of the NPCs is potentiated, dibutyryl cAMP (db-cAMP) and pertussis toxin (PTX). The db-cAMP increased the measurement, of the NPCs, in which it increased the frequency of neuronal positive for beta-3-tublin and MAP2+, neurite outgrowth cells. Neural migratory PTX was further configured in treated NPCs or with a reduced number of cells that have distanced themselves from neuroscience. It is concluded that cAMP signaling pathways stimulate neuron growth and stimulate NPC migrations during cell media.

Keywords: Adenosine monophosphate. Neurospheres. NPCs. Cell proliferation. NPCs differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- O monofosfato cíclico de adenosina (AMPc).....	15
Figura 02- Sequência de ativação da AC após a ativação de um receptor acoplado a proteína G.	16
Figura 03- Representação da atuação do AMPc como segundo mensageiro.....	20
Figura 04- Formação e diferenciação de neuroesfera.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilil Ciclase
AMPC	Monofosfato de Adenosina Cíclico- do inglês, <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CNG	do inglês, <i>cyclic nucleotide-gated channels</i>
DAPI	marcador nuclear-, 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPX	1,3-diethyl-8-phenyl xanthene
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	do inglês, <i>Biotrak Enzymeimmunoassay</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico - do inglês, <i>Epidermal growth factor</i>
EPAC	do inglês <i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
F-12	mistura de nutrientes
FBS	do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto- do inglês, <i>fibroblast growth factor</i>
GDP	Guanosina Difosfato
GF	do inglês, <i>Growth Factor</i>
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida- do inglês, <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GMPC	Monofosfato de guanosina 3-5-cíclico – do inglês, <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
HCN	do inglês, <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels</i>
HGG	do inglês, <i>High-grade glioma</i>
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NPCs	do inglês, <i>Neural progenitor cell</i>

NSCs	Células-tronco Neurais - do inglês, <i>Neural Stem Cells</i>
MAP ₂	do inglês, <i>Anti-microtubule-associated Protein 2</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PC12	linhagem celular – do inglês, <i>Rat pheochromocytoma cells</i>
PDE	Fosfodiesterase
PI	do inglês, <i>Propidium Iodide</i>
PKA	do inglês, <i>cAMP - dependent Protein Kinase</i>
PTX	do inglês, <i>Pertussis Toxin</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TMB	do inglês, <i>Tetramethylbenzidine</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	HIPÓTESE	12
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivo Geral	12
1.2.2	Objetivos Específicos	12
1.3	JUSTIFICATIVA	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	CÉLULAS-TRONCO E PROGENITORAS NEURAI.....	13
2.2	RESPOSTAS CELULARES A SINAIS EXTERNOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	14
2.3	MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO	14
2.3.1	As adenilil ciclases	17
2.3.2	Elementos de resposta ao AMPc (proteínas efetoras)	18
2.3.3	Proteína quinase A (PKA)	18
2.3.4	Proteínas trocadoras ativadas diretamente por AMPc (EPAC)	21
2.3.5	Fosfodiesterases	22
2.3.6	Toxina Pertussis	23
2.3.7	Forscolina	24
2.4	NEUROESFERAS.....	24
2.5	EFEITOS DO AMPc SOBRE PROLIFERAÇÃO NEURAL	26
3	ARTIGO CIENTÍFICO	27
3.1	INTRODUCTION	29
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	30
3.2.1	NPC Isolation and Neurosphere Cultur	30
3.2.2	Neurosphere Differentiation and Treatments	31
3.2.3	Determination of Intracellular cAMP Production	31
3.2.4	Measurement of Neurosphere Number and Size	32
3.2.5	Flow Cytometry	33
3.2.6	Immunocytochemistry	33
3.2.7	Neurite Outgrowth and Migration Assay	34
3.2.8	Statistical analysis	34
3.3	RESULTS	35
3.4	DISCUSSION	33
	REFERENCES	36
4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

APRESENTAÇÃO

O trabalho será organizado da seguinte forma: primeiramente são apresentados INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. As seções MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS encontram-se no artigo submetido no periódico *Current Medicinal Chemistry* e representam a íntegra deste trabalho. Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÕES encontrados no final desta dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho. O Item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente as citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes estímulos contribuem para o crescimento e diferenciação de células progenitoras neurais (NPCs – do inglês, *neural progenitor cell*). Entre eles, os fatores de transcrição são as principais proteínas que lideram os estágios iniciais do fluxo de informações biológicas durante o processo de desenvolvimento neural. As NPCs também respondem aos sinais provenientes do exterior das células e se diferenciam em células gliais e neurônios. Já no nível intracelular, as vias de sinalização, como os processos dependentes de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), também controlam a expressão gênica, a proliferação, a migração e o crescimento de neuritos (ERHARDT et al., 1995; NICOL et al., 2005; DWORKIN et al., 2009).

Estudos mostraram que a produção de AMPC está diretamente relacionada com o aumento do crescimento de neuritos em ambientes permissivos e inibitórios em diferentes linhagens celulares (BATTY, FENRICH e FOUAD, 2016; DUMAN, MALBERG e NAKAGAWA, 2001; MUÑOZ-LLANCAO et al., 2017), mas os efeitos deste segundo mensageiro em NPCs embrionários ainda não foram totalmente esclarecidos (HANSEN, REHFELD E NIELSEN, 2000).

As NPCs quando obtidas por cultura primária, mostram-se superiores às linhagens celulares imortalizadas como neuroblastoma e células PC12, pois permitem avaliar sua capacidade de mimetizar as condições fisiológicas. Desta forma, a pesquisa em neurogênese além de ser extremamente importante para o campo da ciência, é fundamental para caracterizar a presença de neurônios anormais com capacidade mínima de regeneração axonal e crescimento de neuritos que resultam no neurodesenvolvimento e doenças neurodegenerativas (BATTY, FENRICH E FOUAD, 2016).

Neuroesferas, são agregados celulares flutuantes de NPCs, que contemplam a maior parte dos processos que ocorrem nos estágios iniciais do desenvolvimento neural (PILLAT et al., 2015), sendo assim são um excelente modelo de estudo *in vitro* para avaliar a influência das vias dependentes de AMPC. Por tanto, neste estudo objetivamos investigar o papel do AMPC nos processos de desenvolvimento neural que contemplam a proliferação, o crescimento de neuritos, neurogênese, gliogênese e migração observados em NPCs *in vitro*.

1.1 HIPÓTESE

O nucleotídeo adenosina monofosfato cíclico altera a proliferação de neuroesferas e a diferenciação das células progenitoras neurais *in vitro*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Determinar o efeito do AMPc sobre a proliferação de células progenitoras neurais e sua diferenciação.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os efeitos da toxina pertussis e da forskolina sobre os níveis de AMPc, proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais.
- Determinar o efeito do dibutilil AMPc sobre a proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais.

1.3 JUSTIFICATIVA

Considerando as diversas doenças neurológicas que podem estar associadas a processos relacionados com as células do SNC (YANG; ZHOU, 2019; CARTER et al., 2019; DAMBACH et al., 2014; RAVIZZA et al., 2005), é importante o estudo de mecanismos pelos quais se avalia o efeito de determinados mensageiros sobre o desenvolvimento de células embrionárias. Cada vez mais diferentes mecanismos e componentes têm sido usados para avaliar a proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais (CHEN et al., 2018, 2012; D'AIUTO et al., 2014; JAFARZADEH et al., 2014; LI; GAO; LIU, 2017; ZHANG et al., 2019). Não diferentemente, o AMPc, como um segundo mensageiro que é, tem sido associado a regeneração espontânea de células do SNC e ao aumento da proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais (CONTI; BEAVO, 2007; SPENCER; FILBIN, 2004). Além disso

diversos estudos mostraram que os níveis elevados de AMPc neuronal estão ligados ao aumento do crescimento de neuritos (CAI et al., 1999, 2001, 2002; GAO et al., 2003; MING et al., 1997; QIU et al., 2002).

Sabendo disso, o AMPc pode ter um grande papel na regulação da capacidade intrínseca de resposta das células do SNC a fatores extrínseco, já que, com o aumento intracelular há o crescimento de neuritos e regeneração celular (STILES; KAPILOFF; GOLDBERG, 2014). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o AMPc aumenta o crescimento neuronal. Por isso, determinar o efeito do AMPc sobre a proliferação de células progenitoras neurais e sua diferenciação, pode auxiliar no estudo deste mecanismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS-TRONCO E PROGENITORAS NEURAIAS

As células-tronco são células que possuem duas características principais, são capazes de se reproduzir, ou seja, duplicar-se, gerando duas células com características iguais e ainda conseguem diferenciar-se, transformando-se em diversas outras células de diferentes tecidos e órgãos (DALEY, 2015). Esse conceito de hierarquia de desenvolvimento de células derivadas de uma célula inicial, foi empregado pela primeira vez no final do século XIX. Foram Till e McCulloch (MCCULLOCH; TILL, 1960; TILL; MCCULLOCH, 1961), em uma série de artigos pioneiros, que estabeleceram as definições de progenitores multipotentes auto renovadores de todas as linhagens das células sanguíneas. Seus estudos permitiram compreender as hierarquias do desenvolvimento de tecidos e órgãos a partir das células-tronco pluripotentes do embrião inicial.

Existem diversos tipos de células-tronco, classificadas de acordo com sua origem e potencial de diferenciação. Quando consideradas pelo potencial, as células-tronco pluripotentes e multipotentes são as mais importantes. As primeiras possuem uma grande capacidade de diferenciação e podem dar origem a todos os tipos de células do organismo adulto. Já as multipotentes, possuem uma capacidade de diferenciação limitada e só geram tipos celulares no mesmo tecido de origem (OLIVEIRA et al, 2013; ZHU & HUANGFU, 2013).

As células-tronco neurais (NSCs- do inglês, *neural stem cells*) são consideradas células multipotentes, pois se diferenciam em neurônios e células da glia. São responsáveis pela

formação do sistema nervoso na fase fetal e pós-natal, e pela manutenção da sua integridade fisiológica na fase adulta. Assim, é possível isolar este tipo celular do cérebro em desenvolvimento, sendo a sua manipulação *ex vivo* um excelente modelo para o estudo da auto-renovação, diferenciação neural e migração, bem como da influência de fatores externos nestes processos. Nos últimos anos, têm surgido diversos estudos tratando do uso de células-tronco na regeneração neural, em doenças neurodegenerativas e ainda em doenças inflamatórias do SNC, gerando boas revisões sobre o assunto (BATISTA et al., 2014; LIU; DENG, 2016; MAGNUS; RAO, 2005; PLUCHINO; COSSETTI, 2013).

2.2 RESPOSTAS CELULARES A SINAIS EXTERNOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

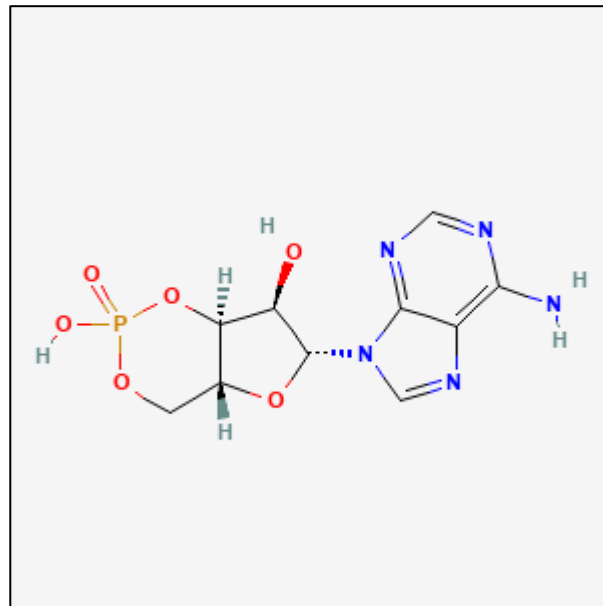
No processo de formação de um organismo multicelular, todas as células possuem a tarefa de proliferar, migrar, diferenciar, morrer ou amadurecer de modo espaço-temporal preciso, permitindo a formação de estruturas e órgãos com funções complexas. Este processo só é possível em decorrência da interação entre as células que estão em constante contato entre si ou por meio de mensageiros químicos, como hormônios, fatores de crescimento e agentes quimiotáticos. Estes mensageiros podem ser produzidos por células distantes, células próximas ou pela própria célula que interpretará a mensagem. Desta forma, o modo e intensidade que o mensageiro atinge as células pode interferir na direção da migração, na divisão ou diferenciação destas células. Assim, a fase em que o mensageiro encontra a célula, também é muito importante para determinar a resposta celular, no caso da embriogênese, as células estão constantemente sofrendo mudanças, e desta forma pode reagir de forma diferente a um dado mensageiro conforme o momento em que ela entra em contato. O reconhecimento de um determinado mensageiro se dá por meio de proteínas específicas inseridas na membrana plasmática e a ligação ao receptor específico irá disparar vias de sinalização intracelulares (CAVINESS et al, 1995; POLLEUX et al, 2001)

2.3 MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO

Os nucleotídeos, de forma geral, possuem funções bem variadas no metabolismo celular. São essenciais nas respostas das células a hormônios e a outros estímulos, compõem

uma estrutura ordenada de cofatores enzimáticos intermediários metabólicos e são formados por três componentes. Mais especificamente, um nucleotídeo é composto por uma base nitrogenada, uma pentose e um ou mais fosfatos (NELSON; COX,2018) (Figura 01).

Figura 01: O monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)

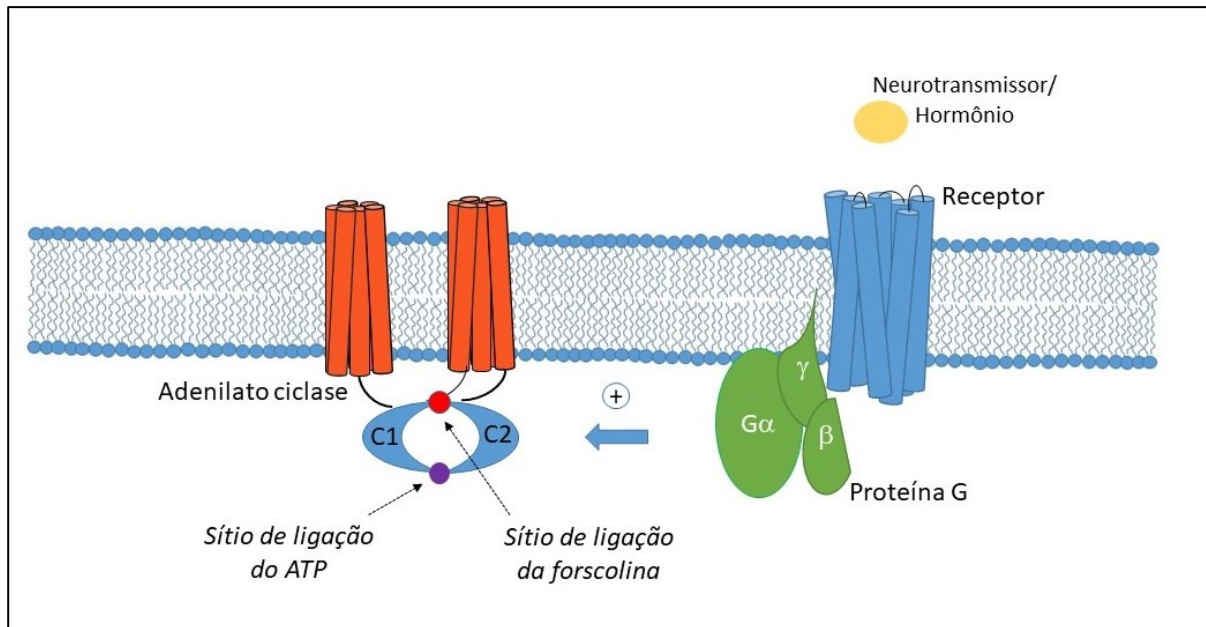


Fonte: PubChem, National Library of Medicine

O monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) é um nucleotídeo cíclico da adenina que atua como segundo mensageiro intracelular. Em 1971, Earl Wilbur Sutherland Jr. foi premiado com o Nobel de fisiologia ou medicina pelo seu trabalho envolvendo a descoberta da função do AMPc. Ele mostrou como o AMPc serve como mensageiro secundário dentro da célula, em resposta à adrenalina (SUTHERLAND, 1971). Mais tarde, outros trabalhos mostraram que essa molécula e o monofosfato de guanosina 3-5-cíclico (GMPc) juntamente com outros nucleotídeos, lipídios e íons atuam como segundos mensageiros intracelulares (CONTI; BEAVO, 2007).

Um grande número de receptores de sinalização celular atua aumentando (ou diminuindo) a produção do segundo mensageiro AMPc, que se dá através da ativação (ou inibição) da adenilil ciclase (AC, também chamada adenilato ciclase), uma enzima geralmente ligada à membrana celular (GLOERICH; BOS, 2010).

Figura 02: Sequência de ativação da AC após a ativação de um receptor acoplado a proteína G.



Fonte: Adaptado de Pierre et al., 2009.

O sítio de ligação da forscolina, um ativador da AC, e do ATP são mostrados, entre as duas subunidades catalíticas C1 e C2 (Pierre et al. 2009).

A ativação da AC desencadeada por um neurotransmissor envolve quatro componentes sendo, destes, três protéicos (Figura 02). O primeiro é o neurotransmissor ou hormônio ativador. O segundo é o receptor (primeiro componente protéico) que sofre uma modificação conformacional transitória induzida pela ligação do neurotransmissor/hormônio. O terceiro é uma proteína que liga nucleotídeos da guanina (conhecida como proteína G – segundo componente protéico). O quarto componente é a unidade catalítica da AC (terceiro componente protéico) (MÜLLER; AMMON, 1986; SCHRAMM; SELINGER, 1984). Como os receptores podem ser acoplados tanto a proteínas Gs (cuja subunidade alfa ativa a AC), como proteínas Gi (cuja subunidade alfa inibe a AC), a AC tem sua atividade regulada por meio de sinais positivos (transduzidos por Gs) e negativos (transduzidos por Gi) (SIMONDS, 1999). De fato, a elucidação dos mecanismos pelos quais as proteínas G – proteínas ligantes de GTP - acoplam receptores a uma atividade adenilil ciclásica acabou rendendo o prêmio Nobel a Alfred Goodman Gilman e Martin Rodbell, em 1994.

2.3.1 As adenilil ciclases

Todas as adenilil ciclases consistem de uma cadeia amino terminal curta, seguida de duas repetições de um módulo composto por seis sequências transmembrana (cada repetição denominada M1 e M2) e dois domínios citoplasmáticos de aproximadamente 40 kDa cada, denominados C1 e C2. Estes domínios citoplasmáticos formam o sítio ativo da enzima (daí a denominação “C”, de catalítico) (TESMER et al., 1997; TANG; GILMAN, 1995; TESMER et al., 1999).

A estrutura terciária destes dois domínios é praticamente idêntica e, juntos, eles formam uma enzima pseudo-simétrica (TESMER et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

O sítio ativo da enzima se situa na interface de C1 e C2, sendo formado por resíduos de ambos domínios. Devido ao fato do sítio ativo utilizar resíduos de ambos domínios, a orientação espacial correta dos dois domínios catalíticos é crucial para que ocorra a atividade catalítica. A proteína $G\alpha_s$ se liga a uma fenda na porção externa do domínio C2 e à porção N-terminal de C1, causando um rearranjo espacial nos dois domínios que culmina com um aumento da eficiência catalítica. Ou seja, tal rearranjo leva a um aumento da atividade enzimática. A forskolina, um ativador da AC que será utilizado neste estudo, se liga à enzima em um sítio específico (ver Figura 03) e causa uma alteração conformacional semelhante e, conseqüentemente, ativa a enzima (TESMER et al., 1997; TANG; GILMAN, 1995; TESMER et al., 1999). Por outro lado, a ligação de uma proteína $G\alpha_i$ ao domínio C1 dificulta esta mudança conformacional e, por este mecanismo, inibe a atividade enzimática (DESSAUER et al., 1998; DESSAUER et al., 2002; CHEN-GOODSPEED et al., 2005).

Estudos bioquímicos e cristalográficos mostram que o ATP se liga a um dos sítios de ligação pseudosimétricos na interface de C1 e C2 (ver Figura 03). O bolsão catalítico inclui um sítio secundário que liga purinas, formado por resíduos que se originam do domínio C2. Estes resíduos dão especificidade para ligação do ATP. Um segundo sítio secundário no domínio C1 inclui uma alça P (*P-loop*), que acomoda os fosfatos dos nucleotídeos e dois resíduos ácidos conservados que se ligam ao ATP por meio de dois íons magnésio. Um íon magnésio contribui para a catálise, enquanto o outro interage com os fosfatos beta e gama do nucleotídeo, contribuindo para a ligação do substrato e, possivelmente, para a estabilização do complexo (TESMER et al., 1997; SINHA; SPRANG, 2006).

Existem 10 isoformas descritas da AC, sendo 9 destas ligadas à membrana e uma isoforma solúvel. É interessante que o sistema nervoso central é o único órgão que expressa todas as isoformas da enzima, embora AC1, AC2, AC5, AC6, AC8 e AC9 pareçam ser as isoformas mais abundantes. Também cabe apontar que a expressão das ACs varia de acordo com as estruturas cerebrais e que, devido à utilização de métodos qualitativos, pouco se pode dizer sobre a real proporção de expressão das isoformas da AC neste e em outros tecidos. Assim, é mais apropriado indicar somente que o sistema nervoso central expressa todas as isoformas da enzima (PIERRE et al., 2009).

Uma vez ativada, a AC catalisa a formação de AMPc a partir do ATP.

2.3.2 Elementos de resposta ao AMPc (proteínas efetoras)

Como um segundo mensageiro, o AMPc regula diferentes proteínas efetoras que, por sua vez, medeiam respostas celulares e fisiológicas. Atualmente são reconhecidas como proteínas responsivas ao AMPc: a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a proteína trocadora ativada diretamente por AMPc (EPAC, do inglês *exchange protein directly activated by cAMP*), os canais controlados por nucleotídeos cíclicos (CNG - do inglês, *cyclic nucleotide-gated channels*), canais controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN - do inglês, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) e as proteínas que contêm genes do domínio Popeye, que modulam a atividade do canal de potássio de dois poros TREK-1 (ANDRÉE et al., 2000; REESE et al., 1999; SCHINDLER et al., 2012). Contudo, a proteína quinase A tem sido considerada a principal proteína efetora do AMPc.

2.3.3 Proteína quinase A (PKA)

A proteína quinase A foi a primeira proteína efetora a ser descoberta e caracterizada, no ano de 1968, pelo grupo de Edwin Krebs, outro ganhador de Nobel (WALSH; PERKINS; KREBS, 1968). Por fosforilar resíduos de serina e treonina, a PKA é classificada como uma serina/treonina quinase. A proteína quinase A é formada por duas subunidades regulatórias (R) ligadas a duas subunidades catalíticas (C), formando um tetrâmero (R₂C₂) no estado inativo (CORBIN et al., 1978; TAYLOR et al. 2004; TAYLOR et al. 2013). As subunidades

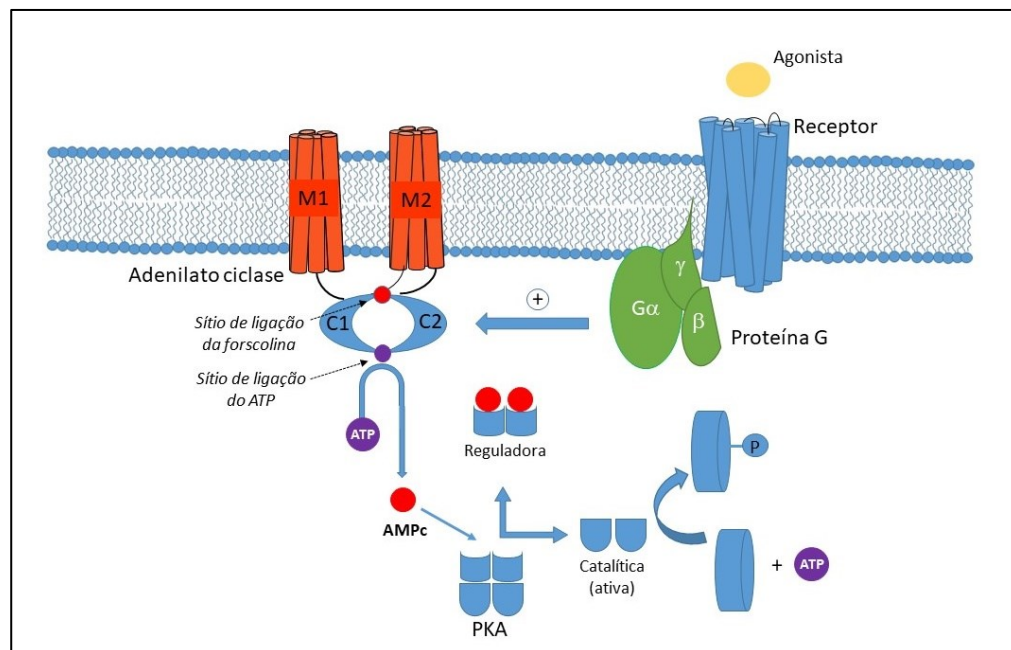
regulatórias contêm um domínio N-terminal (conhecido como domínio “DD” de dimerização e acoplamento - *docking* - em inglês) o qual medeia a dimerização das subunidades e a interação com proteínas de ancoramento específicas, denominadas “proteínas de ancoramento da quinase A” (AKAPs, do inglês *A kinase anchoring proteins*). Tais proteínas funcionam com um arcabouço que posiciona e aproxima a PKA de outras proteínas que formam o signalossoma (complexo multimolecular composto por efetores, moduladores e alvos da via de sinalização que são organizados em sítios subcelulares específicos, confinados espacialmente) do AMPc (POPPINGA et al. 2014). A subunidade regulatória possui, também, um domínio auto inibitório (AD) que se liga à fenda catalítica da subunidade C e, desta forma, inibe a fosforilação de substratos, mantendo o complexo na forma inativa. Na porção carbóxi-terminal de cada subunidade regulatória há dois domínios de ligação de nucleotídeos cíclicos (CNBs, do inglês *cyclic nucleotide-binding domains*) que tornam a PKA responsiva ao AMPc. Assim, quatro moléculas de AMPc (uma para cada CNB), são necessárias para a ativação de uma PKA heterotetramérica. A ligação dos nucleotídeos cíclicos às subunidades regulatórias as dissocia das subunidades catalíticas, que agora ficam livres, na sua forma ativa (Figura 3). Quatro isoformas de subunidades regulatórias, codificadas por diferentes genes, foram identificadas em mamíferos. São elas: RI α , RI β , RII α , and RII β (LEE et al. 1983; JAHNSEN et al. 1986; SCOTT et al. 1987; CLEGG et al. 1988). As isoformas tipo I (RI α e RI β) inibem as subunidades catalíticas como pseudosubstratos, que não podem ser fosforilados, pois apresentam uma alanina em vez de uma serina na sequência que interage com o sítio ativo da subunidade catalítica. Em contraste, as subunidades tipo II (RII α and RII β) possuem uma sequência de aminoácidos que pode ser fosforilada pela PKA, se comportando como um substrato inibidor. Curiosamente, mesmo fosforilada, esta subunidade regulatória ainda apresenta uma afinidade grande pela subunidade catalítica, o que pode ainda manter a inibição desta (SHABB, 2001).

A sequência de consenso de aminoácidos para reconhecimento pela PKA é [R/K][R/K/X]X[pS/pT], onde R é arginina; K é lisina; X é qualquer aminoácido; S é serina e T é treonina, que são os resíduos a serem fosforilados pela enzima (TAYLOR et al., 1990). Até 2001 estimava-se, por análise de sequências de de aminoácidos de consenso para reconhecimento pela enzima, que mais de uma centena de proteínas, com diferentes funções metabólicas e celulares, eram fosforiladas pela PKA (SHABB, 2001). Em 2017, 29 novas proteínas fosforiladas pela PKA foram propostas. Tal estimativa foi baseada em estudo de fosfoproteômica com ativadores e inibidores da PKA e análise de sequências de aminoácidos

que são reconhecidas como de consenso para reconhecimento pela enzima (IMAMURA et al., 2017). De fato, o estudo de Imamura confirmou a fosforilação *in vitro* de 19 destas proteínas pela PKA. Dentre as proteínas fosforiladas pela PKA, uma é de especial interesse: o fator de transcrição CREB (do inglês *cAMP response element binding protein*), não só por ter sido o primeiro fator de transcrição ativado por AMPc (via PKA) descoberto, mas em nosso caso porque Fujioka e colaboradores (2004) mostraram que a forskolina atua na regulação da proliferação e diferenciação neural, mediada pela cascata de AMPc-CREB, em células-tronco neurais adultas (FUJIOKA et al., 2004).

De fato, a cascata de sinalização de AMPc/PKA controla vários fatores biológicos no SNC, mais especificamente a excitabilidade e transmissão sináptica, o crescimento axonal e a proliferação de diferenciação de células totipotentes. (CASTRO; YAPO; VINCENT, 2016; FUJIOKA et al., 2004).

Figura 03: Representação da atuação do AMPc como segundo mensageiro.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

2.3.4 Proteínas trocadoras ativadas diretamente por AMPc (EPAC)

Como assinalamos anteriormente, a sinalização do AMPc também pode ocorrer via um grupo de proteínas responsivas ao AMPc denominadas proteínas trocadoras ativadas diretamente por AMPc (Epacs, do inglês *exchange protein directly activated by cAMP*) (YARWOOD, 2020). As Epacs foram identificadas durante uma triagem em um banco de genes, que foi conduzida com o intuito de explicar como o AMPc ativa uma pequena proteína G, chamada Rap, por um mecanismo que independe da PKA (GLOERICH; BOS, 2010; ROOJ et al., 1998). Assim, foram procuradas proteínas que possuíssem domínios de ligação de nucleotídeos cíclicos (CNB), e que pudessem interagir com a Rap. A análise de RNA mensageiros contendo tal sequência gênica revelou a existência de duas proteínas, Epac1 (que possui uma sequência CNB) e Epac2 (que possui duas sequências CNB), que são bastante abundantes no núcleo estriado (KAWASAKI et al. 1998). Estudos posteriores mostraram que Epac1 e Epac2 estão presentes na maioria dos tecidos, embora com níveis diferentes de expressão. A Epac1 é muito abundante nos vasos sanguíneos, rim, tecido adiposo, sistema nervoso central, ovário e útero, enquanto a Epac2 se expressa principalmente no sistema nervoso central, adrenal e pâncreas (DE ROOIJ et al, 1998; KAWASAKI et al., 1998; KILPINEN et al., 2008).

As Epacs funcionam como fatores de troca de nucleotídeos da guanina para as proteínas Rap1 e Rap2 (DE ROOIJ et al, 1998), promovendo a troca de um GDP por um GTP ligado a estas proteínas. As proteínas Rap assim se alternam em dois estados: um inativo, quando estão com uma guanosina difosfato (GDP) ligada e outro ativo, quando possuem uma guanosina trifosfato (GTP) ligada. Assim, o papel das Epacs é ativar as proteínas Rap. As proteínas Rap, por sua vez, interagem com várias proteínas-alvo, ativando-as. Entre as proteínas-alvo das proteínas Rap estão várias proteínas efetoras, incluindo proteínas adaptadoras implicadas na modulação do citoesqueleto de actina, reguladores de proteínas G da família Rho e fosfolipases (revisado em RAAIJMAKERS; BOS, 2009).

A Epac2 pode estar envolvida na neurogênese adulta (SEO; LEE, 2019). De fato, o estudo de Zhou e colaboradores (2016) mostrou que a proteína Epac2 é necessária para a proliferação de células progenitoras neurais e neurogênese. O mesmo grupo mostrou que esta proteína tem papel na diferenciação de células gliais, incluindo astrócitos e oligodendrócitos. Assim, embora pouco se saiba sobre o papel da Epac1 na neurogênese e diferenciação de células

progenitoras neurais, a isoforma Epac2 parece estar diretamente relacionada ao desenvolvimento normal de neurônios e astrócitos.

2.3.5 Fosfodiesterases

Enquanto a proteína G estimula a AC para produzir AMPc a partir de ATP, fosfodiesterases específicas degradam o AMPc e, desta forma, desligam o sinal deste segundo mensageiro. Vinte e um genes codificando fosfodiesterases (PDEs) foram identificadas no genoma humano, e as proteínas correspondentes têm sido caracterizadas em termos de suas propriedades físico-químicas e regulatórias (CONTI; JIN, 1999; SODERLING; BEAVO, 2000). Baseado na sua semelhança de estrutura primária, cinética, formas de regulação e propriedades farmacológicas, as fosfodiesterases de classe I (presentes nos metazoários) podem ser subdivididas em 11 famílias (PDE1–PDE11) (BEAVO; CONTI; HEASLIP, 1994). Em mamíferos, 3 das 11 famílias de PDEs hidrolisam seletivamente AMPc (PDEs 4, 7 e 8); 3 famílias são seletivas para o GMPc (PDEs 5, 6 e 9), e 5 famílias hidrolisam ambos nucleotídeos com eficiência variável (PDEs 1, 2, 3, 10 e 11). Além das diferentes famílias, uma variedade em particular de isoformas da PDE4 é gerado por splicing alternativo. Por exemplo, o gene PDE4D é composto por 24 exons que codificam pelo menos 8 unidades transcricionais com promotores correspondentes se originando em nove transcritos, os quais correspondem a nove variantes distintas da proteína (MONACO; VICINI; CONTI, 1994; RICHTER; JIN; CONTI, 2005). Mais de 20 proteínas, subdivididas em formas longas e curtas, são derivadas dos quatro genes PDE4. Tal diversidade (existem pelo menos uma centena de fosfodiesterases diferentes descritas em mamíferos!) aponta a complexidade das funções e distribuição celular destas enzimas, que também podem se associar às AKAPs ou, como elas, funcionar como um arcabouço para interação com outras proteínas, incluindo a proteína efetora Epac, compondo o signalossoma do AMPc. De fato, as fosfodiesterases são componentes praticamente cativos do signalossoma do AMPc (CONTI; BEAVO, 2007).

No que diz respeito à atividade catalítica, o domínio catalítico da PDE4 (e provavelmente de todas as outras PDEs da classe I) são compostos por 16 alfa-hélices consistindo de 3 subdomínios que definem um bolsão profundo, no qual os substratos se ligam. O sítio ativo contém 11 dos 17 resíduos conservados em todas as PDEs, bem como alguns dos resíduos previamente implicados como importantes para a função catalítica das PDEs (JIN;

SWINNEN; CONTI, 1992). Resíduos importantes emergem de cada um dos subdomínios. A presença de três subdomínios provavelmente facilita a ocorrência de mudanças conformacionais no domínio catalítico, o que pode contribuir para as aparentes diferentes conformações observadas em estudos de cristalografia com ligação de substrato ou inibidor (XU et al., 2000).

Por fim, uma das estratégias que poderia ter sido utilizada neste trabalho para aumentar o AMPc intracelular seria a utilização de um inibidor da fosfodiesterase. Contudo, dada a organização subcelular complexa destas enzimas, que permite oscilações nas concentrações de AMPc em subregiões celulares de diferentes graus e durações de tempo, optou-se por métodos que aumentam a concentração de AMPc de forma mais inespecífica, o que causaria uma suposta maior resposta celular.

2.3.6 Toxina Pertussis

A toxina pertussis (PTX – do inglês, *pertussis toxin*) é uma exotoxina, também conhecida como fator de promoção de linfocitose que é o principal fator de virulência de *B. pertussis*. Os efeitos desta toxina sobre a comunicação celular foram estudados pela primeira vez em 1979 (KATADA & UI, 1979), quando ela era ainda chamada “proteína ativadora de ilhotas”, uma vez que ela provocava a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas de ratos. Tal efeito *in vivo* resultava do bloqueio da inibição da liberação de insulina mediada pelos receptores alfa₂-adrenérgicos. A toxina também bloqueava a diminuição de produção de AMPc mediada por receptores alfa₂-adrenérgicos, sugerindo que ela (a toxina) provocava um desacoplamento entre o receptor e a adenilil ciclase. A ação da PTX requeria um fator citosólico, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e, mais tarde, se mostrou que o efeito desacoplador da PTX era devido a uma ADP-ribosilação de uma proteína de 41 kDa, promovida pela toxina. O substrato de 41 kDa da PTX foi purificado e identificado como sendo a subunidade alfa da proteína Gi que, quando ADP-ribosilada, fica inativa. Enfim, foi demonstrado que a PTX inibe a cascata de sinalização mediada por receptores acoplados à proteína Gi por induzir a sua inativação. Em função desta propriedade, a PTX tem sido usada ao longo dos anos para caracterizar o tipo de proteína G acoplada a receptores com 7 domínios transmembrana (se for uma Gi, a PTX deve interromper a resposta) e para promover o aumento nos níveis de AMPc em tecidos sensíveis (SMITH et al., 2001; KATADA, 2012).

2.3.7 Forscolina

A forscolina (7-beta-acetoxi-1-alfa,6-beta,9-alfa-trihidroxi-8,13-epoxi-labd-14-en-11-ona) é um composto natural, proveniente das raízes da planta indiana *Plectranthus barbatus*, muito utilizada na pesquisa *in vitro* pois ativa a enzima adenilil ciclase de forma direta, rápida e reversível, aumentando os níveis intracelulares de AMPc (ALASBAHI; MELZIG, 2012). O mecanismo pelo qual a forscolina ativa a maioria das adenilil ciclases, já comentado anteriormente, é pela interação direta com os dois domínios catalíticos da enzima (C1 e C2), levando à sua estabilização e ativação (TESMER et al., 1997).

2.4 NEUROESFERAS

Em 1992, Reynolds e Weiss cultivaram NSCs do cérebro de camundongo adulto e observaram que a maioria das células primárias diferenciadas do sistema nervoso central (SNC) não sobreviveram. Entretanto, uma pequena população de células responsivas ao fator de crescimento epidérmico (EGF- do inglês, epidermal growth factor) foi mantida em um estado indiferenciado e as mesmas proliferaram formando aglomerados, desde então estes aglomerados foram chamados de neuroesferas (DELEYROLLE; REYNOLDS, 2009; REYNOLDS; WEISS, 1992).

As neuroesferas são agregados de NSCs que podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* (Figura 04) e que proporcionam um modelo válido para o estudo e compreensão da formação de diferentes tecidos cerebrais e interações celulares durante o desenvolvimento neural (LEE et al., 2020; OSTENFELD; SVENDSEN, 2003). Estas neuroesferas têm sido cada vez mais utilizadas para isolar e expandir NSCs nos tecidos embrionários e adultos, considerando o fácil manuseio e rápida adaptação de laboratórios convencionais (GRITTI et al., 1996; SHAKER et al., 2015; WEISS et al., 1996).

As neuroesferas podem ser dissociadas para formar grandes números de esferas secundárias e/ou induzidas a se diferenciar, com isso gerando os dois principais tipos de células que compõem o SNC: células gliais e neurônios (DELEYROLLE; REYNOLDS, 2009). As células gliais receberam este nome pelo biólogo alemão Rudolf Virchow (1859). O autor definia a glia como um tecido conectivo, e é daí que deriva seu papel como suporte estrutural ao SNC,

mais tarde demonstrado por Golgi (1903) e Ramón y Cajal (1913). Com o passar do tempo as células da glia foram sendo descritas em maior detalhe por diferentes autores (PRINZ; ERNY; HAGEMEYER, 2017), que as subdividiram em astrócitos, micróglia e oligodendrócitos (VIRCHOW, 1859; VAN LENHOSSÉK, 1891; RÁMON Y CAJAL, 1888; CAJAL, 1913; DEL RÍO-HORTEGA, 1921).

As células da glia possuem funções bem definidas, sendo responsáveis pela manutenção, conservação e sinalização do SNC (GALLAND et al., 2019). São elas:

Astrócitos: têm a forma de estrela (quando ativados), com inúmeros prolongamentos; em grande quantidade, apresentam-se sob duas formas: astrócitos protoplasmáticos, localizados na substância cinzenta; e astrócitos fibrosos localizados na substância branca. Os astrócitos possuem função de sustentação e participam da composição iônica e molecular do ambiente extracelular dos neurônios. De fato, os astrócitos possuem a importante função de regular os níveis de neurotransmissores na fenda sináptica, particularmente de glutamato e ácido gama-amino-butírico (GABA) (MAHMOUD et al., 2019). Alguns astrócitos apresentam prolongamentos chamados pés vasculares, que se expandem sobre os capilares sanguíneos, envolvendo-os em sua totalidade. Esses prolongamentos se constituem em camada adicional entre o vaso e o meio interno do sistema nervoso, transferindo seletivamente moléculas e íons do sangue para os neurônios. Desta forma, estes astrócitos têm um papel importante na organização da barreira hemato-encefálica (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006).

Micróglia: Compreende macrófagos residentes, que têm como principal função contribuir com a defesa do SNC, o que inclui a “poda” de neurônios, o que lhes implica no processo de plasticidade sináptica. É considerada uma das células mais versáteis do corpo, possuindo a capacidade de se adaptar morfológica e funcionalmente ao seu ambiente em constante mudança e a desregulação dessas células pode dar origem a doenças neurológicas (NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014).

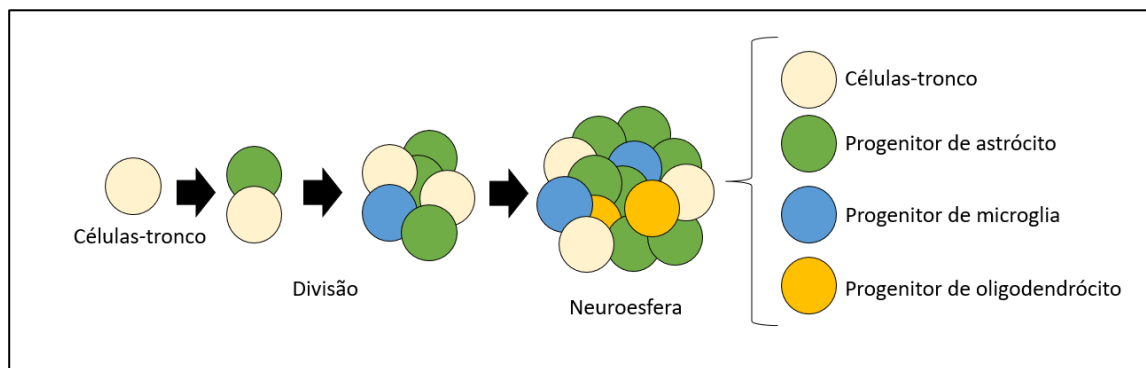
Oligodendrócitos: São responsáveis pela mielinização no sistema nervoso central e expressam vários fatores de crescimento e influenciam a sobrevivência e/ou função de neurônios vizinhos (DU; DREYFUS, 2002).

Todas estas células estão associadas com o surgimento ou progressão de diversos eventos neurológicos (BURDA; BERNSTEIN; SOFRONIEW, 2016; KIM; CHOI; YOON, 2020), o que inclui os processos de neuroinflamação (YANG; ZHOU, 2019), a doença de

Alzheimer (CARTER et al., 2019) e epilepsia (DAMBACH et al., 2014; RAVIZZA et al., 2005).

As neuroesferas fornecem um campo viável para avaliar o comportamento de SNCs e podem ser usadas em diferentes experimentos para delinear as características moleculares e celulares (WATANABE et al., 2021). Sabendo isto, escolhemos o modelo de neuroesferas por ser um modelo tradicional de obtenção e cultura de células progenitoras neurais (NPCs -do inglês, *neural progenitor cells*) de tecido animal (GIL-PEROTÍN et al., 2013), com inúmeras publicações desde a publicação original de Reynolds e Weiss (REYNOLDS; WEISS, 1992).

Figura 04: Formação e diferenciação de neuroesfera.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

A figura apresenta de forma simplificada o processo em que as células-tronco se dividem por meio de fatores de crescimento, gerando aglomerados de células-progenitoras neurais, originando a neuroesfera, que se constitui de diferentes progenitores de novas células do SNC.

2.5 EFEITOS DO AMPc SOBRE PROLIFERAÇÃO NEURONAL

O estudo de Spencer e Filbin (2004) mostrou que a elevação dos níveis intracelulares de AMPc em neurônios adultos pode iniciar uma cascata de sinalização que leva à transcrição de genes associados à regeneração e síntese de poliaminas. Este fator é determinante para a regeneração espontânea de neurônios durante o desenvolvimento do SNC (SPENCER; FILBIN, 2004). Além disso, diversos estudos mostraram que o bloqueio de PKA elimina os efeitos promotores de crescimento de níveis aumentados de AMPc, e comprovaram que os

níveis elevados de AMPc neuronal estão ligados ao aumento do crescimento de neuritos (CAI et al., 1999, 2001, 2002; GAO et al., 2003; MING et al., 1997; QIU et al., 2002).

Os níveis de AMPc são fundamentais na regulação da capacidade intrínseca de crescimento e nas respostas dos neurônios a fatores extrínsecos. O aumento intracelular nos neurônios promove conseqüentemente o crescimento de neuritos e facilitam a regeneração após a lesão (STILES; KAPILOFF; GOLDBERG, 2014). Entretanto, os mecanismos pelos quais o AMPc aumenta o crescimento neuronal ainda não foram totalmente compreendidos, e podem variar de acordo com o estado de diferenciação celular. Por esta razão, neste estudo investigamos os efeitos do aumento do AMPc celular por mecanismos diversos sobre a proliferação e diferenciação celular de NPCs.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of intracellular cAMP on neural differentiation of progenitor cells

*submetido no periódico *Current Medicinal Chemistry*

Fernanda Tibolla Viero^{1#}; Felipe Schmiddel^{1#}; Mariana Araya de Godoy²; Izadora Lorrany Alves Rabelo²; Claudiana Lameu²; Cinthia Melazzo de Andrade³; Jânio M Santurio⁴; Henning Ulrich²; Micheli Mainardi Pillat^{4*}; Carlos Fernando Mello¹

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil.

³ Department of Small Animal Clinic, Center of Rural Sciences Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria- Rio Grande do Sul, Brazil.

Authors contributed equally to the manuscript.

*To whom correspondence should be addressed: Micheli Mainardi Pillat, Ph.D. Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Camobi, 97105-900, Brazil. Email: micheli.pillat@ufsm.br

Abstract

Throughout the development of the central nervous system (CNS), cells fulfill the mission of proliferating, differentiating, and migrating with high-precision patterns. In this context, the impact of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on proliferation, differentiation, and migration of several cell lines has been observed. However, the influence of this second messenger on embryonic neural progenitor cells (NPCs) is yet to be explored. Thus, the present study aimed to investigate the functional role of cAMP in neural developmental processes observed in NPCs *in vitro*: proliferation, neurite outgrowth, neurogenesis, gliogenesis, and migration. As expected, treatment with pertussis toxin and forskolin increased intracellular cAMP concentration in NPCs. Interestingly, treatment with forskolin, together with growth factors (EGF + FGF-2) increased the proliferation rate in the samples compared with those treated with these factors alone, probably by inducing the process of neuron-generating division. Furthermore, the stable cAMP analog dibutyryl (db)-cAMP increased the neurogenic differentiation of NPCs, evidenced by the augmented frequency of β 3-tubulin⁺- and MAP2⁺-positive neuronal cells, facilitated neurite outgrowth and altered gliogenesis. Moreover, neurospheres exposed to pertussis toxin and db-cAMP exhibited a

reduced number of migrating cells compared with untreated controls. Thus, we conclude that cAMP signaling pathways stimulate neurite elongation and block migration of NPCs during differentiation, besides enhancing neuronal fate determination of embryonic NPCs, possibly by inducing neurogenesis through neuron-generating division.

Keywords

Second messenger, Neurogenesis, Migration, Neurite growth, Cell differentiation.

INTRODUCTION

Among many stimuli that contribute to growth and differentiation of neural progenitor cells (NPCs), transcription factors lead the early stages of biological information flow during neural development. NPCs also respond to extracellular signals and differentiate into neurons and glial cells. At the intracellular level, signaling pathways, such as cAMP-dependent processes, also control gene expression and physiological phenomena, such as proliferation, migration and neurite outgrowth (Erhardt et al. 1995; Nicol et al. 2005; Dworkin et al. 2009). It has been shown that cAMP production is associated with neurite growth in permissive and inhibitory environments in different cell lines (Batty, Fenrich, and Fouad 2016; Duman, Malberg, and Nakagawa 2001; Muñoz-Llancao et al. 2017), but the effects of this second messenger on embryonic NPCs have not yet been fully understood (Hansen, Rehfeld, and Nielsen 2000). Therefore, in our study, we evaluated whether increasing cAMP levels alters neurogenesis in NPCs *in vitro*. These cells obtained by primary culture are advantageous over immortalized cell lines, such as neuroblastoma and PC12 cells due to their ability to recapitulate physiological conditions.

Neurogenesis research is of fundamental importance, especially for the understanding of neurodevelopment and neurodegenerative diseases, characterized by the presence of abnormal neurons with a minimal capacity of axonal regeneration and neurite growth (Batty, Fenrich, and Fouad 2016). Therefore, in addition to representing a therapeutic alternative for a wide variety of diseases, NPCs are a useful source for investigating critical issues related to the effects of cAMP on *in vitro* neurogenesis (Trujillo et al. 2012). Neurospheres, the heterogeneous free-floating aggregates of NPCs, encompass most of the complex processes that occur in the early stages of neural development (Pillat et al, 2015), emerging as an excellent model for assessing the influence of cAMP-dependent pathways. Therefore, in order in this study we investigated the effect of cAMP on the following neural development processes observed in embryonic NPCs *in vitro*: proliferation, neurite outgrowth, neurogenesis, and migration.

MATERIALS AND METHODS

NPC Isolation and Neurosphere Cultures

All procedures were approved by and followed the guidelines of the Animal Ethics Committee at the University of São Paulo (USP). The day when the vaginal plug was detected was defined as day zero, and mouse embryos were collected on day 13 by cesarean section. Afterwards, embryonic telencephalons were dissected and enzymatically dissociated using trypsin (0.1%) for 10 min at 37 °C. Trypsin was then inactivated by the addition of phosphate buffered saline (PBS) with 2% fetal bovine serum (FBS), and telencephalons were mechanically dissociated.

For neurosphere formation, following centrifugation NPCs were resuspended and cultured in suspension at a density of 2×10^5 cells/mL in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, high glucose, Invitrogen) and F-12 (Invitrogen) (70/30%) containing 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 5 μ g/mL heparin, supplemented with 20 ng/mL fibroblast growth factor (bFGF; Chemicon, Temecula, CA), epidermal growth factor (EGF; Chemicon) and 2% B-27 (v:v; Invitrogen). In order to prevent cell senescence, cultures were maintained at 37 ° C in a humidified atmosphere consisting of 95% air and 5% CO₂ for only 5 days.

Neurosphere Differentiation and Treatments

Whole neurospheres were washed twice with DMEM for complete removal of growth factors that keep them proliferating and undifferentiated. Subsequently, cells were seeded on coverslips, plates or bottles treated with poly-L-lysine (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) and laminin (20 μ g/mL, Sigma-Aldrich) providing an adherent matrix. For cell differentiation, DMEM-F12 culture medium (Life Technology) supplemented with 2% B-27 and antibiotics was used in the absence of EGF and FGF-2 growth factors. The cell differentiation medium was changed every two days until the complete differentiation of NPCs, after 7 days of culture. With each exchange of culture medium, pertussis toxin (PT; a Gi protein inhibitor) was added to a final concentration of 200 ng/mL, according to Mukhin and colleagues (2003).

In addition, cells were treated with 50 μ M of forskolin (Frsk; Calbiochem), which is an activator of all adenylate cyclase classes, as described by Santos and Araújo (2001). The stable cAMP analog db-cAMP (dibutyryl cyclic adenosine monophosphate) was added to a final concentration of 250 μ M, according to Matsuura and colleagues (2002).

Determination of Intracellular cAMP Production

NPCs were cultured as described above, and 10,000 cells were transferred to each well of 96-well plates in DMEM/F12 medium supplemented with 0.5% B-27. Intracellular cAMP concentration measurements were performed using the Biotrak Enzymeimmunoassay System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Twenty-four hours after plating, cells were incubated with the above-mentioned drugs. To obtain the cell lysates, the medium was removed and 200 μ L per well of 1BR lysis reagent (Amersham Biosciences, UK) was added to the plate, followed by 10 min incubation on a shaker. Cell lysates were immediately used for cAMP detection as described below.

The cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System aims to assess, by several anti-cAMP antibody binding sites, the competition between cellular cAMP and a fixed number of peroxidase-conjugated cAMP. The amount of bound cAMP-peroxidase was determined by the addition of the tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase substrate, resulting in a colored product after the addition of 1M hydrochloric acid, which is quantifiable in a spectrophotometer at 450 nm. For quantification of the intracellular cAMP concentration, the optical density values of the samples were compared with those obtained from cAMP standards of known concentrations.

Measurement of Neurosphere Number and Size

To assess the number and size of neurospheres, about 30 images per well of undifferentiated neurospheres were captured by differential interference contrast microscopy. Analysis of neurosphere number and mean diameter after 5-day Frsk (50 μ M) and db-cAMP (250 μ M) treatments were calculated using the tool “Straight” (freehand lines) from Image J

software (National Institutes of Health). Results represent the average of three sets of each treatment.

Flow Cytometry

On day 7 of differentiation, the samples were dissociated both mechanically and enzymatically with trypsin for 3 min at 37°C. The enzymatic digestion was interrupted with fetal bovine serum (FBS) and the suspension was filtered through a 40µm pore size to obtain individualized cells. After washing, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min at 4°C and further incubated for 20 min in PBS containing 3% FBS-0.1% Triton X-100 to block non-specific sites and permeabilize cell membranes. Then, cells were incubated with anti-β3-Tubulin primary antibodies (1:500) for 30 min at room temperature, washed with PBS, and incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 555) for 30 min. Finally, cells were washed and resuspended in 500mL of PBS, and at least 30,000 events per sample were acquired with Attune flow cytometer (Life Technology).

To determine the percentage of cells in S and G2/M cell cycle phases (proliferating cells), NPCs were incubated with a 50µg/mL propidium iodide (PI solution (Life Technologies)). Thirty-thousand events were acquired per sample, and fluorescence was measured in linear scales. Doublet exclusion gate was based on PI-A vs PI-H signals. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed using the FlowJo V10 software (Ashland, OR).

Immunocytochemistry

After 1 week of differentiation, samples were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min and washed with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin (BSA). Then, cells were incubated 2 hours at room temperature with the following primary antibodies: anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) at 1:200 dilution (Chemicon), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and β 3-Tubulin 1:500 dilution. Samples were then washed and incubated for 60 min at room temperature with Alexa Fluor[®] 488 conjugated or Alexa Fluor[®] 555 conjugated secondary antibodies (1:500) (Invitrogen, USA). Then, samples were washed and incubated for 5 min at room temperature with DAPI (nuclear marker, Molecular Probes, USA, 1:500) for nuclear staining. Coverslips were mounted using DPX (1,3-diethyl-8-phenyl xanthene) (Sigma-Aldrich), and samples were scanned on the TissueFAXS PLUS[™] platform (TissueGnostics, Vienna, Austria), and analyzed with the Strataquest software (TissueGnostics). Experiments were performed in triplicate.

Neurite Outgrowth and Migration Assay

Neurite length and neurosphere-derived cell migration were assessed by phase contrast images and analyzed through Image J. Furthermore, cells showed a radial pattern of cell migration and neurite growth from the edge of neurospheres (Pillat et al. 2016). The region limited by lines comprised about 95% of migrating cells or neurite limits. Radial migration and neurite lengths were evaluated after 7 days of differentiation in the absence (control) or presence of treatments, considering a minimum of 70 neurospheres per sample.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM of two or more independent experiments unless otherwise stated. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.1 (Graph-Pad Software Inc.). Student's t-test, one- or two-way analysis of variance (ANOVA) were used to analyze data. For quantification of immunolabeled cells, a minimum of 800-1000 cells per sample was analyzed using Image J. For flow cytometry, a minimum of 30,000 cells per sample was analyzed. The criterion for statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Neural Progenitor Proliferation is Potentiated by Forskolin plus Growth Factors and db-cAMP

Growth factors (GFs; EGF + FGF-2) stimulate the proliferative division of NPCs, keeping them undifferentiated (Lukaszewicz, Savatier, Cortay, Kennedy, & Dehay, 2002; B. A. Reynolds & Weiss, 1992; B. A. Reynolds & Weiss, 1996). Here, we investigated the effects of Frsk on GF-induced proliferation of undifferentiated cells. As revealed by flow cytometry, Frsk increased the number of cells in S and G2/M phases (23.9 ± 1.6 %) when compared to the treatment with GFs alone (17.6 ± 3.5 %), suggesting that Frsk potentiates the proliferation of NPCs ($p=0.04$) (Fig. 1A). Afterwards, we measured the intracellular levels of cAMP triggered by PT or Frsk in NPCs using the Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system. As expected, both treatments increased cAMP levels (Fig. 1B). Forskolin treatment induced the maximum effect and was therefore chosen for subsequent assays. The effects of Frsk and db-cAMP on number and size of neurospheres were also determined (Fig. 1C), showing that db-cAMP treatment resulted in significantly reduced neurosphere diameter (17%, $p=0.02$) compared with control. Fig.1D shows enhanced cAMP concentration following Frsk treatment, which also potentiated GF-induced NPC proliferation ($p=0.0003$) (Fig.1E)

Db-cAMP Induces Neurogenesis of NPCs

Since proliferation mobilizes NPCs for neurogenesis (Orford & Scadden, 2008), we further asked whether the higher proliferation rate triggered by Frsk plus GFs is owed to enhanced neuron-generating division. Thus, in order to characterize the influence of cAMP-dependent pathways on neurogenesis of embryonic NPCs *in vitro*, the neuronal phenotypes of differentiated cells were determined by anti- β 3-Tubulin and anti-MAP2 immunostaining. Flow cytometry analysis showed that db-cAMP treatment increased by 42% the frequency of β 3-Tubulin⁺ cells (Fig. 2A and B). In addition, immunocytochemistry showed that db-cAMP also increased the number of MAP2⁺ cells by about 30% (Fig. 2C and 2D). These data suggest that cAMP signaling pathways favor the neurogenesis from NPCs.

According to Kim and colleagues (2010), NPCs proliferate at almost all stages of the developmental process, followed by the formation of neurons and lately, glial cells. Hereupon, we also investigated the role of cAMP on glial differentiation, evaluating the influence of Frsk and db-cAMP on the expression of GFAP astrocyte marker protein. However, as shown in Fig. 2E and 2F, these treatments did not promote any changes in the percentage of glial cells.

Db-cAMP Induces Neurite Outgrowth of NPCs

The neurite lengths of db-cAMP-treated and untreated cells were compared using phase contrast microscopy. We observed that db-cAMP stimulation triggered morphological changes in NPCs, resulting in an enrichment of cells with longer neurites ($878 \mu\text{m} \pm 41$, $p < 0,0001$), from the edge of the neurospheres after 7 days of differentiation (Fig. 3A, 3B and 3C).

Effects of Pertussis Toxin and db-cAMP on Cell Migration

Cell migration is an orchestrated movement, susceptible to modulation by a number of signaling factors, occurring during neural development (Chen, Zhang, and Huang 2008). For this reason, we studied the influence of db-cAMP in this process. Representative images of the neurospheres on the 7th day of differentiation and the quantification of cell migration between the dotted lines are shown in Fig. 4. As an underlying mechanism, we found that neural migration was largely restricted in NPCs treated with db-cAMP or PT compared to controls, as evidenced by a reduced number of cells that distanced from neurospheres.

DISCUSSION

In the current study, we investigated the role of cAMP-dependent pathways in four neural development processes observed in NPCs *in vitro*: proliferation, neurite outgrowth, neurogenesis, and migration. We found that Frsk plus GFs and db-cAMP increased NPC proliferation when compared with samples treated with GFs alone, probably by inducing neuron-generating division. In this way, db-cAMP increased neurogenesis, as evidenced by the increased frequency of β 3-Tubulin⁺ and MAP2⁺ cells in addition to promoting neurite outgrowth. Moreover, PT and db-cAMP decreased the number of migrating cells that distanced from neurospheres. Thus, we conclude that cAMP signaling pathways stimulate neurite elongation and block NPC migration during differentiation, besides improving the neuronal fate determination of embryonic NPCs, possibly inducing neurogenesis by neuron-generating division.

Cyclic AMP is a downstream effector molecule of the PT-sensitive G protein family. The spontaneous GTPase activity of Gi subunits remains blocked, generating an uncontrolled

cAMP production and accumulation, disrupting normal cell functions (Chen, Zhang, and Huang 2008). It is well established that Frsk increases cAMP levels through the stimulation of adenylate cyclase (Totsuka et al. 1983), representing a valuable tool for studying cAMP functions. We observed that high Frsk-triggered cAMP levels potentiated the proliferation of embryonic NPCs stimulated with GFs. In agreement with our studies, Fujioka and colleagues (2004) have demonstrated that Frsk acts in the regulation of proliferation and differentiation, mediated by cAMP-CREB cascade, in adult neural stem cell.

Regarding the activation of downstream cAMP pathways by the administration of db-cAMP, our data did not reveal changes in the number of GFAP-positive cells mediated by this second messenger, corroborating previous findings of Kim and colleagues (2010). Importantly, db-cAMP exposure promoted neurite outgrowth and favored neurogenesis in NPC cultures, supporting other studies using neural cell lines (Cai et al. 2001; Shewan et al. 2002). Furthermore, previous studies have also shown that combined treatment with cAMP activators and GFs, such as NGF and FGF-2, increased neurite outgrowth of PC12 cells (Gunning et al. 1981; Heidemann et al. 1985). Batty and colleagues (2017) recently showed that the increase of neuronal cAMP levels enhances neurite growth and regeneration of injured neurons in the adult central nervous system. Similarly, Muñoz-Llancao and colleagues (2017) inferred that pharmacological modulation of EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP) activity induced cell differentiation and increased neurite number and length in N1E-115 cell line. Taken together, these data suggest that cAMP accumulation is closely related to neurogenesis, as well as neurite growth and elongation of embryonic NPCs.

Although several studies have shown that the effect of cAMP on neurite growth occurs in many different cell types, its impact on migration seems to be more complex, since migration of some cell types is inhibited by cAMP increase while other cell types require cAMP signaling for efficient migration (Howe 2004; Howe 2012). We found that PT and db-cAMP

inhibited migration of NPCs. In line with our findings, Gilder and colleagues (2016) found PT-induced decrease of tumorspheres cell migration in HGG neuroblastoma cells. On the other hand, cAMP acts as a mediator of dynamic regulation of the microtubules and actin filaments, promoting neuroblast migration (Toriyama et al. 2012). Similarly to our results, Zimmerman and colleagues (2015) showed that inhibitory effects of cAMP on migration are prevented by pharmacological protein kinase A (PKA) inhibition in pancreatic cancer cells, further suggesting that cAMP effectors control cell migration (Burdyga et al. 2013).

Consequently, we conclude that cAMP signaling pathways stimulate neurite elongation and block migration of NPCs during differentiation (Fig.5). Moreover, cAMP signaling pathways improve the neuronal fate determination and proliferation of embryonic NPCs, possibly inducing neurogenesis by neuron-generating division.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). H.U. and C.L. acknowledge grant support from the São Paulo State Foundation FAPESP (project No. 2016/26189-0), Brazil. M.M.P, acknowledge grant support from the Rio Grande do Sul State Foundation FAPERGS.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflicts of interest for this manuscript.

REFERENCES

Batty, Nicholas J., Keith K. Fenrich, and Karim Fouad. 2016. "The Role of cAMP and Its Downstream Targets in Neurite Growth in the Adult Nervous System." *Neuroscience*

- Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 1–8. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.033.
- Burdyga, Alex, Alan Conant, Lee Haynes, Jin Zhang, Kees Jalink, Robert Sutton, John Neoptolemos, Eithne Costello, and Alexei Tepikin. 2013. “CAMP Inhibits Migration, Ruffling and Paxillin Accumulation in Focal Adhesions of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells: Effects of PKA and EPAC.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (12). Elsevier: 2664–72. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.011.
- Cai, D., J. Qiu, Z. Cao, M. McAtee, B. S. Bregman, and M. T. Filbin. 2001. “Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (13): 4731–39. doi:21/13/4731 [pii].
- Chen, Lin, J. Jillian Zhang, and Xin Yun Huang. 2008. “CAMP Inhibits Cell Migration by Interfering with Rac-Induced Lamellipodium Formation.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (20): 13799–805. doi:10.1074/jbc.M800555200.
- Duman, R S, J Malberg, and S Nakagawa. 2001. “Regulation of Adult Neurogenesis by Psychotropic Drugs and Stress.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (2): 401–7. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.09.003.
- Dworkin, Sebastian, Jordane Malaterre, Frédéric Hollande, Phillip K. Darcy, Robert G. Ramsay, and Theo Mantamadiotis. 2009. “CAMP Response Element Binding Protein Is Required for Mouse Neural Progenitor Cell Survival and Expansion.” *Stem Cells* 27 (6): 1347–57. doi:10.1002/stem.56.
- Erhardt, Peter, Jakob Troppmair, U R Rapp, and G M Cooper. 1995. “Differential Regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-Dependent Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase by Cyclic AMP in PC12 Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 15 (10): 5524–30. doi:10.1128/MCB.15.10.5524.
- Fujioka, T. 2004. “Activation of CAMP Signaling Facilitates the Morphological Maturation of

- Newborn Neurons in Adult Hippocampus.” *Journal of Neuroscience* 24 (2): 319–28.
doi:10.1523/JNEUROSCI.1065.03.2004.
- Gunning, Peter W, Gary E Landreth, Mark A Bothwell, and Eric M Shooter. 1981. “Differential and Synergistic Actions of Nerve Growth Factor and Cyclic AMP in PC12 Cells” 89 (May): 6–11.
- Hansen, Thomas O, Jens F Rehfeld, and Finn C Nielsen. 2000. “Cyclic AMP-Induced Neuronal Differentiation via Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase.”
- Heidemann, S R, H C Joshi, a Schechter, J R Fletcher, and M Bothwell. 1985. “Synergistic Effects of Cyclic AMP and Nerve Growth Factor on Neurite Outgrowth and Microtubule Stability of PC12 Cells.” *The Journal of Cell Biology* 100: 916–27.
doi:10.1083/jcb.100.3.916.
- Howe, Alan K. 2004. “Regulation of Actin-Based Cell Migration by CAMP / PKA” 1692: 159–74. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.03.005.
- . 2012. “NIH Public Access” 23 (5): 554–61. doi:10.1016/j.ceb.2011.05.006.Cross-talk.
- Kim, Joong-Sun, Miyoung Yang, Jaeho Cho, Sung-Ho Kim, Jong-Choon Kim, Taekyun Shin, and Changjong Moon. 2010. “Promotion of CAMP Responsive Element-Binding Protein Activity Ameliorates Radiation-Induced Suppression of Hippocampal Neurogenesis in Adult Mice.” *Toxicological Research* 26 (3). Korean Society of Toxicology: 177–83.
doi:10.5487/TR.2010.26.3.177.
- Matsuura, Sigeru, Yuji Ikegaya, Maki K. Yamada, Nobuyoshi Nishiyama, and Norio Matsuki. 2002. “Endothelin Downregulates the Glutamate Transporter GLAST in CAMP-Differentiated Astrocytes in Vitro.” *Glia* 37 (2): 178–82. doi:10.1002/glia.10020.
- Muñoz-Llancao, Pablo, Cristian de Gregorio, Macarena Las Heras, Christopher Meinohl, Kevin Noorman, Erik Boddeke, Xiaodong Cheng, Frank Lezoualc’h, Martina Schmidt, and Christian Gonzalez-Billault. 2017. “Microtubule-Regulating Proteins and CAMP-

- Dependent Signaling in Neuroblastoma Differentiation.” *Cytoskeleton* 74 (3): 143–58. doi:10.1002/cm.21355.
- Nicol, Xavier, Aude Muzerelle, Isabelle Bachy, Anne Ravary, and Patricia Gaspar. 2005. “Spatiotemporal Localization of the Calcium-Stimulated Adenylate Cyclases, AC1 and AC8, during Mouse Brain Development.” *Journal of Comparative Neurology* 486 (3): 281–94. doi:10.1002/cne.20528.
- Orford KW, Scadden DT. 2008. Desconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature Reviews Genetics*. (9): 115-128
- Pillat, MM, Cheffer A, de Andrade CM, Morsch VM, Schetinger MRC, Ulrich H. 2015 Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: Consequence or cause of neuronal enrichment?. *Cytometry Parte A*. 87 (10) 929-935 . <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22705>
- Pillat, MM, Lameu C, Trujillo CA, Glaser T, Cappellari AR, Negraes PD, Battastini AMO, Schwindt, Muotri AR, Ulrich H. 2016 FALTOU O TÍTULO Journal of Cell Science. 15;129(18):3437-48. doi: 10.1242/jcs.192534.
- Santos, R. C.C., and E. G. Araujo. 2001. “Cyclic AMP Increases the Survival of Ganglion Cells in Mixed Retinal Cell Cultures in the Absence of Exogenous Neurotrophic Molecules, an Effect That Involves Cholinergic Activity.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34 (12): 1585–93. doi:10.1590/S0100-879X2001001200011.
- Shewan, D., A. Dwivedy, R. Anderson, and C. E. Holt. 2002. “Age-Related Changes Underlie Switch in Netrin-1 Responsiveness as Growth Cones Advance along Visual Pathway.” *Nature Neuroscience* 5 (10): 955–62. doi:10.1038/nn919.
- Toriyama, Manami, Norikazu Mizuno, Takashi Fukami, Tokuichi Iguchi, Michinori Toriyama, Kenji Tago, and Hiroshi Itoh. 2012. “Phosphorylation of Doublecortin by Protein Kinase A Orchestrates Microtubule and Actin Dynamics to Promote Neuronal Progenitor Cell

Migration.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (16): 12691–702.
doi:10.1074/jbc.M111.316307.

Totsuka, Yasuo, Mehdi S. Ferdows, Thor B. Nielsen, and James B. Field. 1983. “Effects of Forskolin on Adenylate Cyclase, Cyclic AMP, Protein Kinase and Intermediary Metabolism of the Thyroid Gland.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 756 (3): 319–27. doi:10.1016/0304-4165(83)90340-9.

Trujillo, Cleber A., Priscilla D. Negraes, Telma T. Schwindt, Claudiana Lameu, Cassiano Carromeu, Alysson R. Muotri, João B. Pesquero, et al. 2012. “Differential Regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-Dependent Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase by Cyclic AMP in PC12 Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 287 (3): 44046–61.
doi:10.1002/cne.20528.

Zimmerman, Noah P, Ishan Roy, Andrew D Hauser, Jessica M Wilson, Carol L Williams, and Michael B Dwinell. 2015. “Cyclic AMP Regulates the Migration and Invasion Potential of Human Pancreatic Cancer Cells.” *Molecular Carcinogenesis* 54 (3). NIH Public Access: 203–15. doi:10.1002/mc.22091.

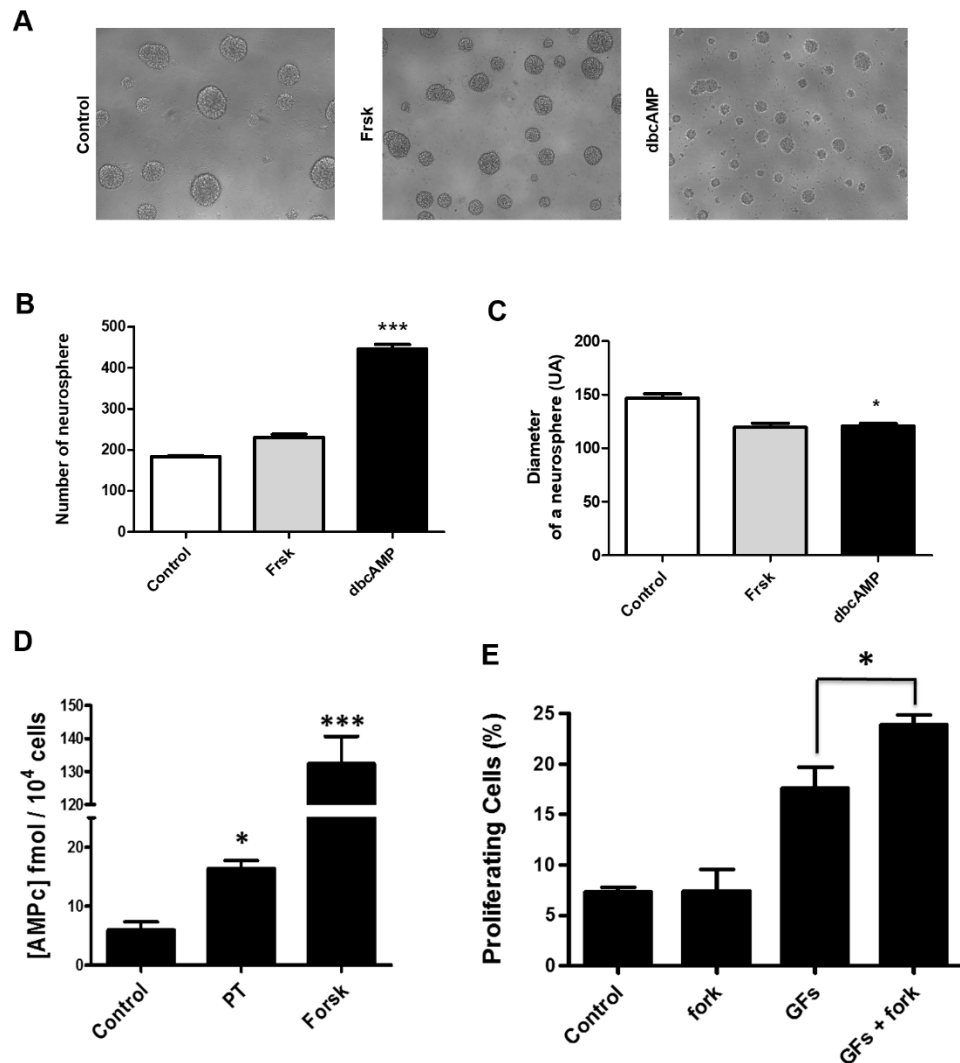


Figure 1: Treatment with pertussis toxin (PT, 200 ng/mL) or Forskolin (Frsk, 50 μ M) increases [cAMP] levels and enhances self-renewal of neural precursors: A) Increase in number and decrease in diameter with db-cAMP treatment. B) Increase in the number of neurospheres compared to control groups. C) db-cAMP (250 μ M) and forskolin (50 μ M) decrease the diameter of the neurospheres compared to the control. D) Second messenger concentration of cAMP, which was evaluated by comparing the control groups with PTX at a concentration of 200 ng/mL and Fsk at 50 μ M. E) Proliferation after Fsk treatment, GFs (EGF and FGF-2 growth

factors, both at 20 ng/mL) or GFs + Frsk were analyzed. The data are representative of two independent experiments conducted in duplicate (* $p < 0.05$).

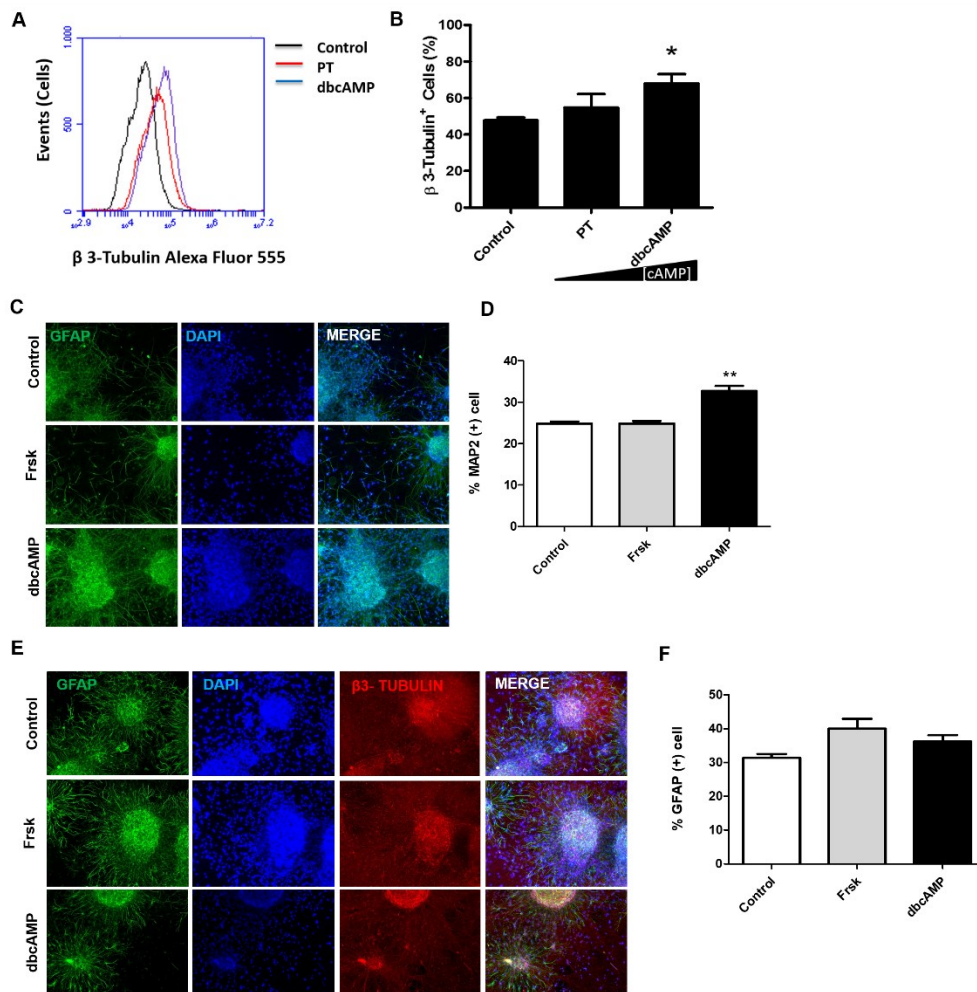


Figure 2: Effects of [cAMP] level modulation on neurogenesis and neurite growth. A) Immunostaining with anti-β3-Tubulin (neuronal marker) and secondary Alexa Fluor 555 antibodies analyzed by flow cytometry. Overlap of histograms demonstrating the labeling difference between the control and the samples treated with PT (200 ng/mL) or db-cAMP (250 μM). B) Percentage of β3-Tubulin⁺ cells in control and PT and db-cAMP. C) Representative immunofluorescence images of NPCs treated with db-cAMP for 7 days showing enhanced

neuronal differentiation, based on anti-MAP2 (microtubule-associated-protein. 2) Immunostaining compared to the control group (D). Scale, 100 μ m. E) Representative immunofluorescence images of NPCs cultured for 24 h in the absence (control), db-cAMP (250 μ M) presence or Frsk (50 μ M) treatment. GFAP, β 3-Tubulin-positive cells and nuclei are shown in green, red, and blue, respectively. The data are representative of two independent experiments conducted in duplicate. Data are quantified in F (* $p < 0.05$). Scale bars, 100 μ m.

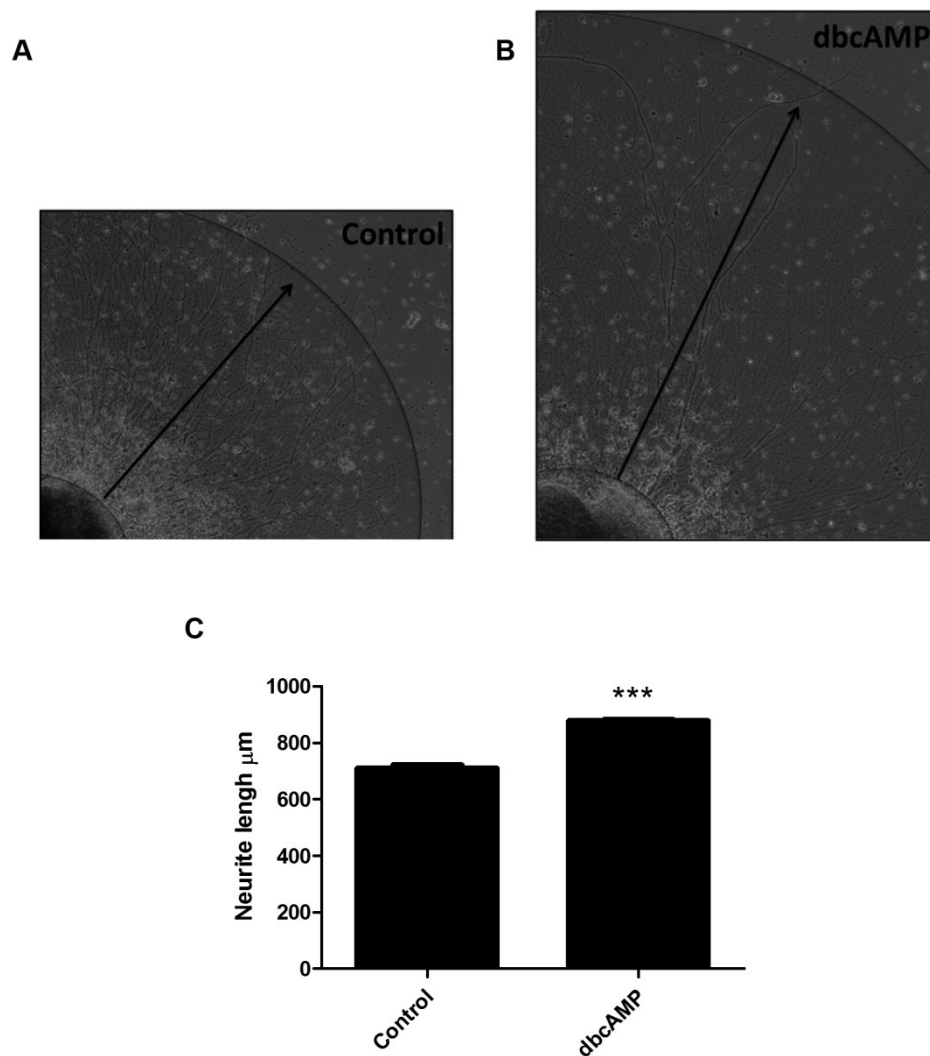


Figure 3: Stimulation of cAMP production augmented the proportion of cells with longer neurites. A) Demonstration of neurite growth in the control group. B) Representation of the neurite elongation in a group treated with 250 μ M db-cAMP. The data are representative of two independent experiments conducted in duplicate (* p <0.05). C) db-cAMP stimulation triggered morphological changes in NPCs cells, characterized by the augmented proportion of cells with longer neurites compared to unstimulated cells. (p <0.001).

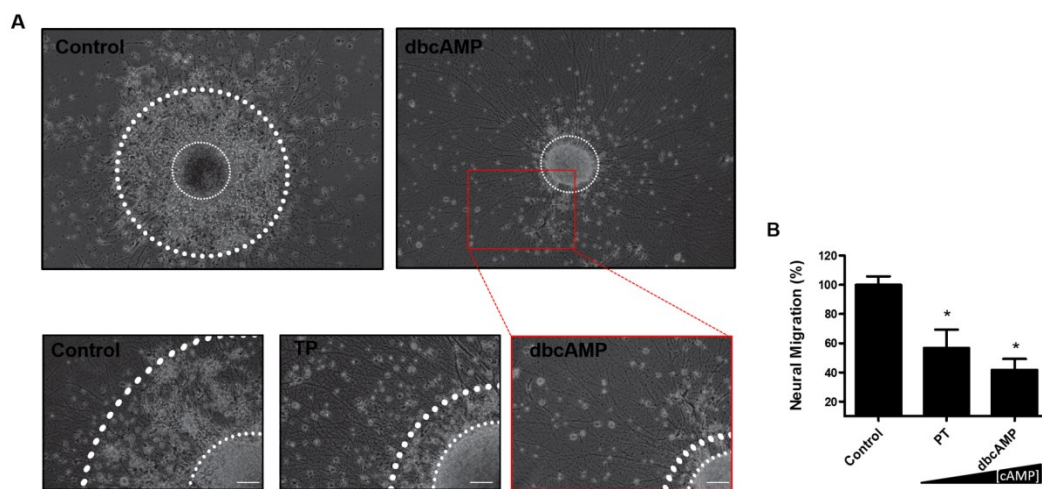


Figure 4: Increasing cAMP production decreases neural migration during differentiation. A) Cells revealed radial migration patterns from the edge of neurospheres, which were measured following 7 days of differentiation induction (Scale bar: 100 μ m). (B) Mean percentages \pm S.D. of neural migration treated with PT (200ng / mL) or db-cAMP (250 μ M), compared to the control group, which was set to 100%. The data are representative of three independent experiments conducted in duplicate (* p <0.05).

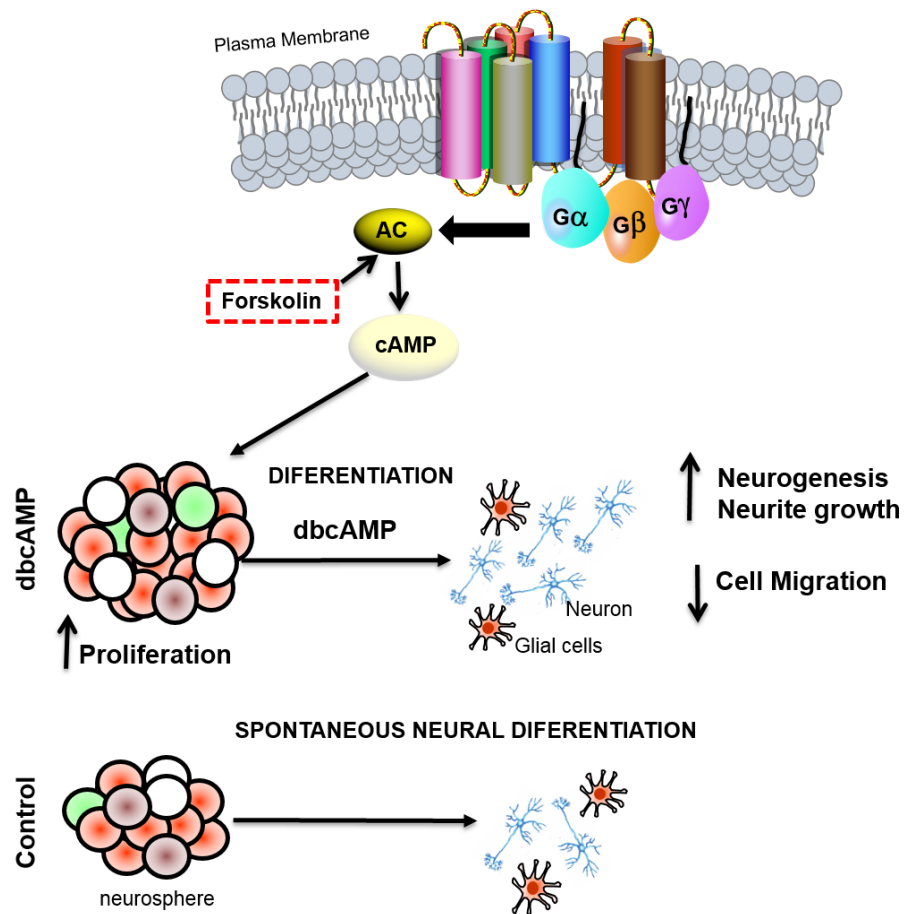


Figure 5: Effects of cAMP production during differentiation of embryonic NPCs. Neural progenitor cells (NPCs) proliferate in the presence of growth factors (GFs; EGF + FGF-2) and forskolin (Frsk). Frsk + GFs treatment produced stronger increase in NPC proliferation compared to cells treated with GFs alone, suggesting that GFs plus Frsk stimulated neuron-generating division. Moreover, here, we have shown that dibutyrylcyclic adenosine monophosphate (db-cAMP) favored neurogenesis (based on MAP2 and β 3-Tubulin-positive cells) and decreased migration.

4 DISCUSSÃO

De acordo com o apresentado neste estudo, investigamos o papel das vias dependentes de AMPc nos processos de desenvolvimento neuronal em NPCs. Avaliamos o efeito deste segundo mensageiro na proliferação, crescimento de neuritos, neurogênese e migração. Observamos um aumento na proliferação de NPCs quando expostas a forskolina e GFs provavelmente por induzir a divisão geradora de neurônios. De acordo com o estudo pioneiro de Lepski e colaboradores (2013), o AMPc promove a diferenciação de células progenitoras neurais através da via de modulação dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim como em nosso estudo, os autores observaram um aumento na sinalização de AMPc com forskolina, o que resultou na maturação neuronal. Estes resultados sugerem uma relação direta entre o aumento da sinalização de AMPc com o aumento nas correntes de Ca²⁺ do tipo L (LEPSKI et al., 2013). Muito semelhante com o que foi mostrado por Horvat e Vardjan (2019) em que Ca²⁺ potencializa a sinalização de AMPc, indicando interferência entre as vias de sinalização de Ca²⁺ e AMPc.

O aumento das células β 3-Tubulin⁺ e MAP2⁺ apresentadas em nosso estudo, representam o aumento na neurogênese que foi induzida pelo db-AMPc, e que também promoveu o crescimento de neuritos. Concomitantemente a PT e o db-AMPc diminuíram o número de células migratórias que se distanciaram das neuroesferas. Gilder e colaboradores (2016), em seus estudos encontraram diminuição induzida por PT na migração de células tumorais em células de neuroblastoma HGG. Estes achados estão de acordo com nosso estudo, pois observamos que PT e db-AMPc diminuem a migração de NPCs.

Está bem definido que a forskolina aumenta os níveis de AMPc através da estimulação da adenilato ciclase (TOTSUKA et al. 1983). O estudo de Fujioka e colaboradores (2004) demonstraram que a forskolina atua na regulação da proliferação e diferenciação neural, mediada pela cascata de AMPc-CREB, em células-tronco neurais adultas, o que está em concordância com o nosso estudo, já que, observamos que altos níveis de AMPc desencadeados por forskolina potencializam a proliferação de NPCs embrionários estimulados com fatores de crescimento. Portanto, é possível que a PKA e a CREB meciem os efeitos observados no presente estudo. De fato, tem sido sugerido que o AMPc atua como mediador da regulação dinâmica dos microtúbulos e filamentos de actina, promovendo a migração de neuroblastos (TORIYAMA et al. 2012). Segundo Zimmerman e colegas (2015), os efeitos inibitórios do AMPc na migração são prevenidos pela inibição farmacológica da PKA em células de câncer

pancreático, sugerindo ainda que os efetores do AMPc controlam a migração celular (BURDYGA et al. 2013).

Muñoz-Llanca e colaboradores (2017) mostraram que a modulação farmacológica da atividade da EPAC induz a diferenciação celular e aumenta o número e o comprimento de neuritos na linhagem celular N1E-115, e sugerem que o acúmulo de AMPc está relacionado à neurogênese, ao crescimento de neuritos e ao alongamento de NPCs embrionários (LEE, 2021). No SNC a expressão de EPAC2 é encontrada em maior abundância em neurônios, contudo a regulação da função neural é feita pela EPAC1 (KAWASAKI et al., 1998). Portanto, é possível que a EPAC tenha algum papel na diferenciação celular induzida por AMPc, e estudos com drogas que bloqueiem estes efetores são necessários para esclarecer este ponto.

5 CONCLUSÕES

- PTX e forskolina aumentaram os níveis de AMPc; A forskolina aumentou a porcentagem de células em proliferação; PTX e forskolina não alteraram a diferenciação de NPCs em células gliais nem em neurônios.
- O dibutilil AMPc diminuiu o diâmetro das neuroesferas mas aumentou o seu número; O db-AMPc aumentou a diferenciação de NPCs em neurônios e não alterou a diferenciação de NPCs em astrócitos.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉE B, HILLEMANN T, KESSLER-ICEKSON G, et al. **Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart.** *Developmental Biology*. v. 223, p. 371–382, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10882522/>. Acesso em: 05 jan. 2022.
- BATISTA, C. E. M. et al. **Stem cells in neurology - Current perspectives.** *Arq. Neuro-Psiquiatr*, v. 72, n. 6, p. 457–465, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24964114/>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- BEAVO, J. A.; CONTI, M.; HEASLIP, R. J. **Multiple Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases.** *Molecular Pharmacology*, v. 46, p. 399–405, 1994. Disponível em: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/46/3/399.long>. Acesso em 13 jan. 2022.
- BURDA, J. E.; BERNSTEIN, A. M.; SOFRONIEW, M. V. **Astrocyte roles in traumatic brain injury** *Experimental Neurology*. Academic Press. Inc., v. 275, n. 3, p. 305–315, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014488615000898>. Acesso em 20 dez. 2021.
- BURDYGA, A. et al.; **CAMP Inhibits Migration, Ruffling and Paxillin Accumulation in Focal Adhesions of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells: Effects of PKA and EPAC.** *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1833, n. 12, p. 2664–2672, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913002346?via%3Dihub>. Acesso em 6 jan. 2022.
- CAI, D., J. QIU, Z. CAO, M. MCATEE, B. S. BREGMAN, AND M. T. FILBIN.. **Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate.** *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, v. 21, n. 13, p. 4731–4739, 2001. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/21/13/4731>. Acesso em 8 jan. 2022.
- CAI, D. et al. **Prior Exposure to Neurotrophins Blocks Inhibition of Axonal Regeneration by MAG and Myelin via a cAMP-Dependent Mechanism.** *Neuron*. v. 22, n. 1, p. 89–101, 1999. Disponível em: [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(00\)80681-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627300806819%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(00)80681-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627300806819%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 3 jan. 2022.
- CAI, D. et al. **Arginase I and Polyamines Act Downstream from Cyclic AMP in Overcoming Inhibition of Axonal Growth MAG and Myelin In Vitro.** *Neuron*. v. 35, n. 4, p. 711–719, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627302008267>. Acesso em 28 dez. 2022.

CARTER, S. F. et al. **Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease**. Trends in Molecular Medicine., v. 25, n. 2, p. 77–95, 2019. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914\(18\)30224-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491418302247%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(18)30224-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491418302247%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 03 jan. 2022.

CASTRO, L.; YAPO, C.; VINCENT, P. **Physiopathology of cAMP/PKA signaling in neurons**. Biologie Aujourd'hui, v. 210, n. 4, p. 191–203, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/jbio/2017005>. Acesso em: 03 jan. 2022.

CHEN, D. et al. **The role of MiR-132 in regulating neural stem cell proliferation, differentiation and neuronal maturation**. Cellular Physiology and Biochemistry, v. 47, n. 6, p. 2319–2330, 2018. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/491543#:~:text=Results%3A%20miR%2D132%20negatively%20regulated,cell%20cycle%20and%20promoting%20apoptosis.&text=Conclusion%3A%20miR%2D132%20was%20demonstrated,cell%20differentiation%20and%20neurite%20outgrowth>. Acesso em: 12 jan. 2022.

CHEN, Y. et al. **Tenuigenin promotes proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells**. Neurochemical Research, v. 37, n. 4, p. 771–777, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-011-0671-3>. Acesso em: 13 jan. 2022.

CHEN-GOODSPEED, M., LUKAN, A. N. & DESSAUER, C. W. **Modeling of Galpha(s) and Galpha(i) regulation of human type V and VI adenylyl cyclase**. Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 3, p. 1808–1816. 2005. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)76382-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)76382-9/fulltext). Acesso em: 15 dez. 2021.

CLEGG CH, CADD GG, MCKNIGHT GS (1988) **Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase**. Proc Natl Acad Sci USA , v. 85, p. 3703-3707, 1988. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/85/11/3703>. Acesso em: 03 jan. 2022.

CONTI, M.; BEAVO, J. **Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling**. Annual Review of Biochemistry, v. 76, p. 481-511, 2007. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444>. Acesso em: 03 jan. 2022.

CONTI, M.; JIN, C. S. L. **The Molecular Biology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases**. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol, v. 63, p. 1–38, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0079660308607187?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jan. 2022.

CORBIN, J. D. et al. **Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein**

kinase. Journal of Biological Chemistry, v. 253, n. 11, p. 3997–4003, 1978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/206557/>. Acesso em: 03 dez. 2021.

D'AIUTO, L. et al. **Large-scale generation of human ipsc-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation.** Organogenesis, v. 10, n. 4, p. 365–377, 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476278.2015.1011921>. Acesso em: 17 jan. 2022.

DALEY, G. Q. **Stem cells and the evolving notion of cellular identity.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Royal Society of London, v. 370, n. 1680, p. 1–5, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0376/>. Acesso em: 18 dez. 2021.

DAMBACH, H. et al. **Glia and epilepsy: Experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation.** Epilepsia, v. 55, n. 1, p. 184–192, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12473>. Acesso em: 15 dez. 2021.

DELEYROLLE, L. P.; REYNOLDS, B. A. **Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay.** Methods in Molecular Biology, v. 549, p. 91–101, 2009. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60327-931-4_7. Acesso em: 13 dez. 2021.

DESSAUER, C. W., CHEN-GOODSPEED, M. & CHEN, J. **Mechanism of Galpha i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase.** Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 32, p. 28823–28829, 2002. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)70285-1/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)70285-1/fulltext) . Acesso em: 05 jan. 2022.

DESSAUER, C. W., TESMER, J. J., SPRANG, S. R. & GILMAN, A. G. **Identification of a Gialpha binding site on type V adenylyl cyclase.** Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 40, p. 25831–25839, 1998. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)59895-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)59895-7/fulltext). Acesso em: 05 jan. 2022.

DU, Y.; DREYFUS, C. F. **Oligodendrocytes as providers of growth factors.** Journal of Neuroscience Research, v. 68, n. 6, p. 647–654, 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.10245>. Acesso em: 06 jan. 2022.

EARL W. SUTHERLAND, JR. – **Fatos. NobelPrize.org.** Prêmio Nobel Outreach AB, 2022. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1971/sutherland/facts/> Acesso em: 26 de jan. de 2022.

FUJIOKA, T.; FUJIOKA A.; DUMAN, R.S. **Activation of CAMP Signaling Facilitates the Morphological Maturation of Newborn Neurons in Adult Hippocampus.** Journal of

Neuroscience, v. 24, n. 2, p. 319-328, 2004. Disponível em:
<https://www.jneurosci.org/content/24/2/319>. Acesso em: 10 jan. 2021.

GALLAND, F. et al. **Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells.** *Neurochemistry International*, v. 131, p. 1-9, 2019. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197018619302645?via%3Dihub> .
 Acesso em: 11 jan. 2021.

GAO, Y. et al. **Neurotrophins Elevate cAMP to Reach a Threshold Required to Overcome Inhibition by MAG through Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Inhibition of Phosphodiesterase.** *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 37, p. 11770-11777, 2003. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/23/37/11770>. Acesso em: 06 jan. 2021.

GIL-PEROTÍN, S. et al. **Adult neural stem cells from the subventricular zone: A review of the neurosphere assay.** *Anatomical Record*, v. 296, n. 9, p. 1435–1452, 2013. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.22746>. Acesso em: 03 fev. 2022.

GLOERICH, M.; BOS, J. L. **Epac: Defining a new mechanism for cAMP action.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 50, p. 355-375, 2010. Disponível em:
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105714> . Acesso em: 20 dez. 2021.

GOLGI, Camilo. **Opera omnia**, volume 2. (1903), Ed. Milano, Ulrico Hoepli. Disponível em:
<https://www.worldcat.org/title/opera-omnia/oclc/11408356>. Acesso em: 05 jan. 2022.

GRITTI, A. et al. **Multipotential Stem Cells from the Adult Mouse Brain Proliferate and Self-Renew in Response to Basic Fibroblast Growth Factor.** *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 3, p. 1091-1100, 1996. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/16/3/1091>. Acesso em: 06 jan. 2021.

HORVAT, A.; VARDJAN, N. **Astroglial cAMP signalling in space and time.** *Neuroscience Letters*, v. 689, p. 5-10, 2019. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394018304282?via%3Dihub>.
 Acesso em: 23 jan. 2021.

IMAMURA, H.; et al., **Identifications of putative PKA substrates with quantitative phosphoproteomics and primary-sequence based scoring.** *Journal of Proteome Research*, v. 16, n. 4, p. 1825-1830, 2017. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.7b00087>. Acesso em: 09 jan. 2021.

JAFARZADEH, N. et al. **Oxytocin improves proliferation and neural differentiation of**

adipose tissue-derived stem cells. *Neuroscience Letters*, v. 564, p. 105–110, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394014001074?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jan. 2022.

JAHNSEN T, HEDIN L, KIDD VJ et al. **Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 26, p. 12352–12361, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2427518/>. Acesso em: 03 fev. 2022.

JIN, S. L. C.; SWINNEN, J. V.; CONTI, M. **Characterization of the structure of a low K(m), rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 26, p. 18929–18939, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1326538/>. Acesso em: 15 dez. 2021.

KILPINEN, S. et al. **Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues.** *Genome Biology*, v. 9, n. 9, p1-14, 2008. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-9-r139/>. Acesso em: 03 fev. 2022.

KATADA, T.; UI, M. **Effect of in Vivo Pretreatment of Rats with a New Protein Purified from Bordetella pertussis on in Vitro Secretion of Insulin: Role of Calcium.** *Endocrinology*, v. 104, n. 6, p. 1822–1827, 1979. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/104/6/1822/2592523?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 10 fev. 2022.

KATADA, T. **The Inhibitory G Protein Gi identified as Pertussis Toxin-Catalyzed ADP-Ribosylation.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v. 35, n. 12, p. 2103-2111, 2012. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/35/12/35_b212024/_article. Acesso em: 10 fev. 2022.

KAWASAKI, H. et al. **A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap 1.** *SCIENCE*, v. 282, n. 5397, p. 2275–2279, 1998. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.282.5397.2275>. Acesso em: 28 jan. 2022.

KIM, Y. S.; CHOI, J.; YOON, B. E. **Neuron-Glia Interactions in Neurodevelopmental Disorders.** *Cells*, v. 9, n. 10, p. 1-21. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2176>. Acesso em: 22 dez. 2021.

LEE D. C. et al. **Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase.** *Proc Natl Acad Sci USA* v. 80, n. 12, p. 3608-3612. 1983. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/80/12/3608>. Acesso em: 15 dez. 2021.

LEE, J. H. et al. **NeuroCore formation during differentiation of neurospheres of mouse embryonic neural stem cells.** *Stem Cell Research*, v. 43, p. 01-09, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506119303216?via%3Dihub>. Acesso

em: 08 dez. 2021.

LEPSKI, G. et al. **cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, n. 155, p. 01-11, 2013. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2013.00155/full>. Acesso em: 15 dez. 2021.

LI, X. W.; GAO, H. Y.; LIU, J. **The role of taurine in improving neural stem cells proliferation and differentiation.** *Nutritional Neuroscience*, v. 20, n. 7, p. 409-415, 2017.

Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1028415X.2016.1152004?journalCode=ynns20>. Acesso em: 15 dez. 2022.

LIU, Y.; DENG, W. **Reverse engineering human neurodegenerative disease using pluripotent stem cell technology.** *Brain Research*, v. 1638, parte A, p. 30-41, 2016.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899315007210?via%3Dihub>. Acesso em: 18 dez. 2021.

MAGNUS, T.; RAO, M. S. **Neural stem cells in inflammatory CNS diseases: mechanisms and therapy.** *Stem Cell Review Series*, v. 9, n. 2, p. 303–319, 2005. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00357.x>. Acesso em: 26 jan. 2022.

MAHMOUD, S. et al. **Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release.** *Cells*, v. 8, n. 2, p. 184-211, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/2/184>. Acesso em: 15 jan. 2022.

MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. **The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice.** *Radiation Research*. v. 13, p. 115-125, 1960. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13858509/>. Acesso em: 13 dez. 2021.

MING, G. et al. **cAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1.** *Neuron, Cell Press*, v. 19, n. 6, p. 1225–1235, 1997. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300804146>. Acesso em: 02 fev. 2021.

MONACO, L.; VICINI, E.; CONTI, M. **Structure of two rat genes coding for closely related rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterases. Multiple mRNA variants originate from alternative splicing and multiple start sites.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 1, p. 347–357, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8276818/>. Acesso em 05 jan. 2022.

MUÑOZ-LLANCAO, P.; ET AL. **Microtubule-Regulating Proteins and CAMP-**

Dependent Signaling in Neuroblastoma Differentiation. *Cytoskeleton*, v. 74, n. 3, p. 143–158, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.21355>. Acesso em: 06 fev. 2021.

MÜLLER, A.; AMMON, H. **Adenylate cyclase.** *Pharmazie in unserer Zeit*, v. 2, p. 49–52, 1986. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pauz.19860150204> . Acesso em: 12 dez. 2022

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** Grupo A, 2018. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. **Microglia development and function.** *Annual Review of Immunology*, v. 32, p. 367–402, 2014. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>. Acesso em: 02 dez. 2021.

OSTENFELD, T.; SVENDSEN, C. N. **Recent Advances in Stem Cell Neurobiology.** *Advances and Technical Standards in Neurosurgery*, v. 28, p. 3–89, 2003. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-0641-9_1. Acesso em: 12 dez. 2021.

PIERRE, S.; ESCHENHAGEN, T.; GEISSLINGER, G.; SCHOLICH, K. . **Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n.4, p. 321-335, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd2827>. Acesso em: 16 dez. 2021.

PLUCHINO, S.; COSSETTI, C. **How stem cells speak with host immune cells in inflammatory brain diseases.** *GLIA*, v. 61, n.9, p. 1379-1401, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.22500>. Acesso em: 26 dez. 2021.

PRINZ, M.; ERNY, D.; HAGEMEYER, N. **Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells** *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, v. 18, p. 385-392, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.3703>. Acesso em: 06 jan. 2021.

QIU, J. et al. **Spinal Axon Regeneration Induced by Elevation of Cyclic AMP.** *Cell Press*, v. 34, n.6, p. 895–903, 2002. Disponível em: [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(02\)00730-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627302007304%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(02)00730-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627302007304%3Fshowall%3Dtrue) . Acesso em: 23 dez 2021.

RAAIJMAKERS, J. H.; BOS, J. L. **Specificity in Ras and Rap signaling.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 24, n.17, p. 10995-10999, 2009. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)76893-6/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)76893-6/fulltext). Acesso em: 25 jan 2022.

RAMÓN Y CAJAL S. Ramón y Cajal, S. Sobre un nuevo proceder de impregnación de la

neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. *Trab. Laboratório. Investir. Biol*, v.11, p. 103-112, 1913.

RAVIZZA, T. et al. **Inflammatory Response and Glia Activation in Developing Rat Hippocampus after Status Epilepticus**. *Epilepsia*. v. 46 n.5, p. 113-117, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2005.01006.x>. Acesso em: 03 jan. 2022.

REESE D.E.; ZAVALJEVSKI, M.; STREIFF, N.L. et al. **bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development**. *Development Biology*, v. 209 n.1, p. 159-171, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001216069992461?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jan. 2022.

REYNOLDS, A. B.; WEISS, S. **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells**. *Science*, v. 255, n.5052, p. 1707–1710, 1992. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1553558>. Acesso em: 7 jan. 2022.

RICHTER, W.; JIN, S.-L. C.; CONTI, M. **Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue**. *Biochem. J*, v. 388, p. 803-811, 2005. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/388/3/803/44146/Splice-variants-of-the-cyclic-nucleotide?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 06 jan. 2022.

ROOJ, J. et al. **Epac is a Rap1 guaninenucleotide- exchange factor directly activated by cyclicAMP**. *Nature*, v. 396, p. 474–477, 1998. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/24884>. Acesso em: 10 fev. 2022

SCHINDLER, R.F, et al. **The Popeye domain containing genes: essential elements in heartrate control**. *Cardiovasc Diagn Ther*, v. 2, n. 4, p. 308-319, 2012. Disponível em: <https://cdt.amegroups.com/article/view/1289>. Acesso em: 19 jan. 2022.

SCHRAMM, M.; SELINGER, Z. **Message Transmission: Receptor Controlled Adenylate Cyclase System**. *SCIENCE*, v. 225, n. 9, p. 1350–1356, 1984. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.6147897>. Acesso em: 06 jan. 2022.

SCOTT JD, GLACCUM MB, ZOLLER MJ et al. The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 84, n.15, p. 5192–5196, 1987. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/84/15/5192>. Acesso em: 06 jan. 2022.

SEO H and LEE K. **Cell-specific expression of Epac2 in the subventricular and subgranular zones**. *Molecular Brain*. v. 12, p. 113, 2019. Disponível em: <https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-019-0537-1>. Acesso em: 13 jan. 2022.

- SHAKER, M. R. et al. **Identification and characterization of secondary neural tube-derived embryonic neural stem cells in vitro.** *Stem Cells and Development*, v. 24, n. 10, p. 1171–1181, 2015. Disponível em: v. 19, n. 6, p. 1225–1235, 1997. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014.0506>. Acesso em: 12 dez. 2021.
- SIMONDS, W. F. **G protein regulation of adenylate cyclase.** *Trends in pharmacological sciences* v. 20, n. 2, p. 66-73, 1999. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147\(99\)01307-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0165614799013073%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147(99)01307-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0165614799013073%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 16 jan. 2022.
- SMITH, A. M.; GUZMÁN, C.A.; WALKER, M.J. **The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control,** *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 25, p. 309-333, 2001. Disponível em: <https://eurekamag.com/research/035/944/035944855.php>. Acesso em: 03 jan. 2022.
- SINHA, S. C. & SPRANG, S. R. **Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases.** *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* v. 157, p. 105-140, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17236651/>. Acesso em: 08 jan. 2022.
- SPENCER, T.; FILBIN, M. T. **A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian.** *Journal of Anatomy.* v. 204, n. 1, p. 49-55, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14690477/>. Acesso em: 08 dez. 2021.
- SODERLING, S. H.; BEAVO, J. A. **Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 12, p. 174–179, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955067499000733>. Acesso em 07 fev. 2022.
- STILES, T. L.; KAPILOFF, M. S.; GOLDBERG, J. L. **The role of soluble adenylyl cyclase in neurite outgrowth.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1842, n. 12, p. 2561-2568, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914002245?via%3Dihub>. Acesso em: 07 dez. 2021.
- SUTHERLAND, E. W. **Studies on the mechanism of hormone action.** *Science*, v. 177, n. 4047, p. 401-408, 1972. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.177.4047.401>. Acesso em: 17 dez. 2021.
- TANG, W. J. & GILMAN, A. G. **Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin.** *Science*, v. 268, n. 5218, p. 1769–1772, 1995. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7792604>. Acesso em: 02 jan. 2022.
- TAYLOR S.S.; BUECHLER J.A.; YONEMOTO, W. **cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes.** *Annu Rev Biochem*, v. 59, p. 971-1005, 1990. Disponível em:

<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.59.070190.004543>. Acesso em: 03 jan. 2022

TESMER, J. J. et al. **Two-metal-Ion catalysis in adenylyl cyclase**. *Science* v. 285, n.5428, p. 756-760, 1999. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.285.5428.756>. Acesso em: 16 jan. 2022

TESMER, J. J., SUNAHARA, R. K., GILMAN, A. G. & SPRANG, S. R. **Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsa.GTPγS**. *Science*, v. 278, n.5345, p. 1907–1916, 1997. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.278.5345.1907>. Acesso em: 26 dez. 2021.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. **A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells**. *Radiation Research*. v. 14, p. 213-222, 1961. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13776896/>. Acesso em: 28 dez. 2021.

TORIYAMA, M. et al. **Phosphorylation of Doublecortin by Protein Kinase A Orchestrates Microtubule and Actin Dynamics to Promote Neuronal Progenitor Cell Migration**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 16, p. 12691-12702, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002192582053010X>. Acesso em: 16 dez. 2021.

TOTSUKA, Y.; FERDOWS M.; NIELSEN T.; FIELD J. **Effects of Forskolin on Adenylate Cyclase, Cyclic AMP, Protein Kinase and Intermediary Metabolism of the Thyroid Gland**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 756, n. 3, p. 319-327, 1983. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304416583903409?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jan. 2022.

VIRCHOW, R.L.K. **Die Cellularpathologie in ihrer begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre**. Berlin, A. Hirschwald, 1858.

WATANABE, F. et al. **Generation of Neurosphere-Derived Organoid-Like-Aggregates (NEDAS) from Neural Stem Cells**. *Current Protocols*, v. 1, n. 2, p. 1-14, 2021. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cpz1.15>. Acesso em: 23 jan. 2022.

WEISS, S. et al. **Multipotent CNS Stem Cells Are Present in the Adult Mammalian Spinal Cord and Ventricular Neuroaxis**. *The Journal of Neuroscience* v. 16, n. 23 p. 7599-7609, 1996. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.22746>. Acesso em: 03 fev. 2022.

XU, R. X. et al. **Atomic Structure of PDEk Insights into Phosphodiesterase Mechanism and Specificity**. *Science*, v. 288, p. 1822–1825, 2000. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.288.5472.1822>. Acesso em 10 jan. 2022.

YANG, Q. et al. **Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells.** GLIA, v. 67, n. 6 p. 1017-1035, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.23571>. Acesso em: 03 jan. 2022.

YARWOOD, S. J. **Special Issue on “New Advances in Cyclic AMP Signalling”-An Editorial Overview.** CELLS, v. 9, n. 10 p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2274>. Acesso em: 03 jan. 2022

ZHANG, L. et al. **The effects of various estrogen doses on the proliferation differentiation of cultured neural stem cells.** General Physiology and Biophysics, v. 38, n. 5, p. 417–425, 2019. Disponível em: http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=6368&category_id=148&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1 Acesso em: 10 dez. 2021.

ZHANG, G., LIU, Y., RUOHO, A. E. & HURLEY, J. H. **Structure of the adenylyl cyclase catalytic core.** Nature, v. 386, n. 6622 p. 247-253, 1997. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/386247a0>. Acesso em: 23 dez. 2021.

ZHOU L, M.A.;YEUNG, P.K. et al. **Anxiety and depression with neurogenesis defects in exchange protein directly activated by cAMP 2-deficient mice are ameliorated by a selective serotonin reuptake inhibitor, Prozac.** Translational Psychiatry, v. 6, n. 9 p. 1-14, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/tp2016129>. Acesso em: 14 dez. 2021.

ZIMMERMAN, et al. **Cyclic AMP Regulates the Migration and Invasion Potential of Human Pancreatic Cancer Cells.** Molecular Carcinogenesis, v. 54, n. 3 p. 203-215, 2015. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22091>. Acesso em: 29 dez. 2021.