

LUKAS BOLINI GONÇALVES

EFEITO DA IL-1 β NA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA
DA NEUROGÊNESE NO CÉREBRO ADULTO DE
MURINOS *IN VITRO*



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2016

Trabalho realizado no Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, sob a orientação da Professora Claudia MC Batista e coorientação da professora Katia Carneiro de Paula.

CIP - Catalogação na Publicação

B635e Bolini Gonçalves, Lukas
Efeito da IL-1beta na regulação epigenética da neurogênese no cérebro adulto de murinos in vitro / Lukas Bolini Gonçalves. -- Rio de Janeiro, 2016. 62 f.

Orientadora: Claudia Maria de Castro Batista.
Coorientadora: Katia Carneiro de Paula.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Neurogênese. 2. Células-tronco neurais. 3. Histona desacetilases. 4. Tricostatina A. 5. Interleucina-1beta. I. Maria de Castro Batista, Claudia, orient. II. Carneiro de Paula, Katia, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carla e Marcio e meu irmão Yan pelo apoio incondicional que tive e tenho, pelos incentivos, paciência e compreensão.

Às famílias Bolini e Gonçalves pela torcida constante.

Ao Time, o futuro da ciência brasileira, por acreditarem em mim e me ajudarem a ser o melhor profissional que pude ser: Miceli, gênio do *S. aureus*, herdeiro da Maria do Carmo, por todo o incentivo, palavras duras quando necessário e “Eu estou ficando seriamente incomodado”; “doutora” Gabi, gênica do DENV e futura diretora da FIOCRUZ, por todo o *tough love* e por me motivar a me tornar sempre a melhor versão de mim; Karinne, gênica do *C. diff*, pelos papos no laboratório nas horas mais estranhas, por todo o café roubado e por ser meu 6,3 em BCP. O IMPG nunca mais verá um Time como esse.

Às Capivaras, ao TUT e à Mari, por compartilharem as alegrias nas horas mais fáceis e por todo o apoio emocional nas horas mais difíceis.

À EPSJV/FIOCRUZ, por ter me formado profissional politécnico e me apresentado ao curso de Microbiologia. Em especial, à professora Jeanine Bogaerts por ter me orientado no TCC do ensino técnico, que me motivou a seguir para as neurociências na graduação.

Aos amigos da EPSJV que levo comigo até hoje: Lucas, por me ter me aguentado por quase 7 anos; Amanda, minha alma gêmea musical; e Cintia, por todo o apoio desde os tempos de INCQS.

Aos colegas e amigos do LabIF e do LPDC por todo o apoio técnico e intelectual e pela companhia: à dra. Larissa, por todas as conversas, teorias, conquistas de portais, sugestões de experimentos e por ter me acompanhado até altas horas fazendo experimentos; Mariana, pelo suporte técnico na maioria dos protocolos descritos neste trabalho, em especial as citometrias e as qPCR; Jonathas, por todas as conversas, pela companhia, pela caça aos anticorpos e pelo protocolo do MTT; Roberto e Gorete, por todo o suporte técnico, serviços prestados e pelo cafezinho nosso de cada dia.

Aos professores do LabIF e do LPDC por toda a orientação: prof. Claudia Batista por toda a paciência, compreensão, incentivo e inspiração ao longo desta árdua caminhada, e por ter me inspirado no caminho a seguir na ciência; prof. Katia Carneiro, pela orientação e apoio e por ter me introduzido ao maravilhoso universo da epigenética; prof. Valéria Coelho, chefe do LabIF, pelo apoio, compreensão e solicitude; prof. Marcia Cury, chefe do LPDC, por comandar esta grande família com tanto amor e sabedoria.

À prof. Silvana Allodi, por ter gentilmente cedido as alíquotas de anticorpo anti CNPase utilizadas neste trabalho; ao Programa de Ciências Morfológicas por todo o apoio com suprimentos e reagentes; ao prof. Alberto Nóbrega e ao dr. Fábio Canto, pelo suporte com o ensaio de CFSE; ao prof. Marcos Farina, pelo apoio financeiro com reagentes e por ter gentilmente cedido o microscópio de fluorescência utilizado para obtenção das micrografias utilizadas neste trabalho; ao prof. José Garcia por ter gentilmente cedido o leitor de ELISA utilizado neste trabalho; aos professores Pedro Coelho, Alberto Nóbrega e Roberto Lent pelas contribuições intelectuais na defesa do plano de monografia.

Ao André, por ter o superpoder de resolver todos os problemas de todo mundo sem sequer piscar os olhos.

À UFRJ, CNPq e FAPERJ pelos financiamentos que viabilizaram a realização deste projeto.

A todos os colegas, amigos, familiares e profissionais cujos nomes não mencionei, mas que compartilharam ao menos um minuto que fosse desses quatro anos. Sem vocês, não seria um décimo do profissional que sou hoje, e este trabalho não teria um décimo da qualidade que teve.

“Conforme o desenvolvimento tem fim, as fontes de crescimento e regeneração de axônios e dendritos extinguem-se irrevogavelmente. Em centros adultos, os caminhos de nervos são fixos e imutáveis: tudo morre, nada se regenera. Cabe à ciência do futuro mudar, se possível, este duro decreto.”

Santiago Ramon y Cajal

RESUMO**LUKAS BOLINI GONÇALVES****EFEITO DA IL-1 β NA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DA NEUROGÊNESE NO CÉREBRO ADULTO DE MURINOS *IN VITRO*****Orientador: Claudia Maria de Castro Batista e Katia Carneiro de Paula****Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A regulação epigenética é um importante programa intrínseco às células, onde sinais ambientais e fatores de transcrição interagem e modulam a expressão gênica, o que leva, por exemplo, à diferenciação de células-tronco neurais (NSCs) em tipos celulares específicos do sistema nervoso central, de grande interesse para aplicações clínicas. Neste contexto, atividades enzimáticas de acetilação e metilação de histonas, por enzimas histona-acetiltransferases (HATs) e histona-desacetilases (HDACs), são consideradas as formas mais dinâmicas de regulação gênica. As NSCs têm capacidade de auto-renovação e de se diferenciarem em tipos celulares distintos, incluindo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Recentemente, mostrou-se que a neurogênese a partir de NSCs do cérebro adulto é regulada epigeneticamente. Dentro de um cenário de neuroinflamação, foi proposto que a citocina IL-1 β contribua para a supressão da neurogênese através de modificações epigenéticas a partir da ação de enzimas HDACs, sugerindo que IL-1 β deva exercer um papel epigenético na modulação de NPCs. As proteínas histonas são alvos de modificação epigenética que regulam a expressão gênica. Além disso, há evidências na literatura de que a inibição de HDACs por tricostatina A (TSA) bloqueia a proliferação, aumenta a diferenciação neuronal e diminui a diferenciação de astrócitos dos NPCs. No entanto, os mecanismos regulatórios pelos quais a acetilação e a desacetilação das histonas, sob influência de IL-1 β , influenciam a diferenciação de NPCs não são totalmente compreendidos. Neste trabalho propomo-nos a investigar a relação entre a desacetilação de histonas e a IL-1 β na sobrevivência, proliferação e diferenciação de NPCs no cérebro adulto de camundongos *in vitro*. Foi observado que o bloqueio da desacetilação de histonas diminuiu a proliferação e a viabilidade de NPCs tratadas com IL-1 β , sugerindo que esse é um fenômeno essencial para a sobrevivência celular num contexto inflamatório. A diferenciação de oligodendrócitos pós-exposição à IL-1 β é dependente de atividade HDAC, em contraste com a diferenciação glial, que independe. O efeito do TSA na acetilação não foi visto em H4K8, mas outras lisinas deverão ser analisadas. A IL-1 β , em contrapartida, foi capaz de efetivamente ativar sua cascata clássica de ativação, sugerindo que os efeitos observados são provocados pela citocina.

Palavras-chave: histona desacetilases; neurogênese; células-tronco neurais; tricostatina A; Interleucina-1beta.

ABSTRACT**LUKAS BOLINI GONÇALVES****EFFECT OF IL-1 β ON EPIGENETIC REGULATION OF ADULT MOUSE
BRAIN NEUROGENESIS *IN VITRO*****Orientador: Claudia Maria de Castro Batista e Katia Carneiro de Paula**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Epigenetic regulation is an important program intrinsic to cells, in which environmental signals and transcription factors interact and modulate gene expression, which leads to, for example, neural stem cell (NSC) differentiation to specific central nervous system cell types, of great interest to clinical applications. In this context, enzymatic activities of histone acetylation and methylation, the former being mediated by histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) enzymes, are thought to be the most dynamic methods of genic regulation. NSCs are able to self-renew and to differentiate into distinct cell types, such as neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Recently, it has been shown that adult brain neurogenesis, from NSCs, is epigenetically regulated. In a neuroinflammation scenario, it has been proposed that the cytokine IL-1 β contributes to neurogenesis suppression through epigenetic modification due to HDAC activity, suggesting it might play an epigenetic role in modulation of NSCs. Histone proteins are the targets to epigenetic modifications that regulate genic expression; furthermore, there are pieces of evidence that HDAC inhibition by trichostatin A (TSA) blocks NSC proliferation, increases neuronal differentiation and decreases glial differentiation. However, the regulatory mechanisms through which histone acetylation and deacetylation, under the influence of IL-1 β , affect NSC differentiation are not fully known. In this paper, we intended to investigate the relation between histone deacetylation and IL-1 β on the adult mouse brain-derived NSC survival, proliferation and differentiation *in vitro*. We have observed that blocking histone deacetylation decreases proliferation and viability of IL-1 β -treated NSCs, suggesting that this event is essential to cell survival on an inflammatory context. Oligodendrocyte differentiation after IL-1 β exposure is HDAC activity-dependent, in contrast to glial differentiation, which is not. TSA effect on acetylation was not observed on H4K8, but other lysines should be analysed. IL-1 β , however, could effectively activate its classic signalling cascade, suggesting that the observed effects were indeed caused by the cytokine.

Keywords: histone deacetylases; neurogenesis; neural stem cells; trichostatin A; Interleukin-1beta.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
Ara-C	Citosina-β-D-arabinofuranosídeo
BBB	Barreira hemato-encefálica, do inglês <i>blood-brain barrier</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês <i>brain derived neurotrophic factor</i>
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos, do inglês <i>fibroblast growth factor</i>
bHLH	Hélice-volta-hélice, do inglês <i>helix-loop-helix</i>
BMP	Proteínas morfógenas do osso, do inglês <i>bone morphogenetic proteins</i>
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albumina bovina sérica, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CCL2	Quimiocina ligante da família C-C 2, do inglês <i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CDK	Cinase ciclina-dependente, do inglês <i>cyclin-dependent kinase</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFSE	Succinimidil 6-carboxifluoresceína éster, do inglês <i>6-carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CTR	Controle
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
E12	12º dia do período embrionário
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento de epiderme, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento de epiderme, do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático de absorção, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESC	Célula-tronco embrionária, do inglês <i>embryonic stem cell</i>
g	Aceleração gravitacional
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial, do inglês <i>glial fibrillar acidic protein</i>
H3K27ac	Acetilação em lisina 27 da histona H3
H3K4me2	Dimetilação em lisina 4 da histona H3
H3K4me3	Trimetilação em lisina 4 da histona H3
H3K9ac	Acetilação em lisina 9 da histona H3
H3K9me2	Dimetilação em lisina 9 da histona H3
H3K9me3	Trimetilação em lisina 9 da histona H3
H4K12ac	Acetilação em lisina 12 da histona H4
H4K8ac	Acetilação em lisina 8 da histona H4
HAT	Histona acetiltransferase
HCl	Ácido clorídrico
HDAC	Histona desacetilase
HMT	Histona metiltransferase
HP1	Proteína de heterocromatina 1, do inglês <i>heterochromatin protein 1</i>
IFN	Interferon

IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1, do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleucina
IL-1R1	Receptor 1 de interleucina-1, do inglês <i>interleukin-1 receptor 1</i>
IPC	Célula progenitora intermediária, do inglês <i>intermediate progenitor cell</i>
K	Lisina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimio-atrativa de monócitos, do inglês <i>monocyte chemoattractive protein</i>
MFI	Média de intensidade de fluorescência, do inglês <i>means of fluorescence intensity</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol, do inglês <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B, do inglês, <i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanograma
NGF	Fator de crescimento de nervos, do inglês <i>nerve growth factor</i>
Ngn1	Neurogenina 1
NGS	Soro normal de cabra, do inglês <i>normal goat serum</i>
NiV	Nipah virus
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NPC	Célula progenitora neural, do inglês <i>neural progenitor cell</i>
NSC	Célula-tronco neural, do inglês <i>neural stem-cell</i>
OB	Bulbo olfatório, do inglês <i>olfactory bulb</i>
Olig2	Fator de transcrição de oligodendrócitos 2, do inglês <i>oligodendrocyte transcription factor 2</i>
PBS	Tampão fosfato-salina, do inglês <i>phosphate buffer saline</i>
RGC	Célula da glia radial, do inglês <i>radial glia cell</i>
RMS	Corrente migratória rostral, do inglês <i>rostral migratory stream</i>
SEM	Erro padrão da média, do inglês <i>standard error of the mean</i>
SFB	Soro fetal bovino
SGZ	Zona subgranular, do inglês <i>subgranular zone</i>
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervoso Central
Sox2	<i>Sex determining Region Y-box 2</i>
Sox9	<i>Sex determining Region Y-box 9</i>
SVZ	Zona subventricular, do inglês <i>subventricular zone</i>
TET	Enzimas de translocação <i>ten eleven</i> , do inglês <i>ten-eleven translocation enzymes</i>
TGF	Fator transformante de crescimento, do inglês <i>transforming growth factor</i>
T _m	Temperatura de desnaturação, do inglês <i>melting temperature</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumoral necrosis factor</i>
TSA	Tricostatina A
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1, do inglês <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
Veh	Veículo, do inglês <i>vehicle</i>
V-SVZ	Zona ventricular-subventricular, do inglês <i>ventricular-subventricular zone</i>
VZ	Zona ventricular, do inglês <i>ventricular zone</i>
Zn ⁺²	Cátion zinco bivalente
β-III tub	β-tubulina de classe III

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia da neurogênese	1
1.2 Papel do sistema imune na neurogênese	6
1.3 Epigenética	9
1.4 Histonas e a neurogênese	13
1.5 IL-1 β , epigenética e a neurogênese	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivos gerais	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Animais	18
4.2 Cultura de células	18
4.3 Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular	19
4.3.1 Análise de citotoxicidade	19
4.3.2 Ensaio de proliferação combinado	20
4.4 Análise de viabilidade	20
4.5 Análise de diferenciação	21
4.6 Análise de proliferação	21
4.7 Análise de sinalização de IL-1 β	21
4.8 Imunocitoquímica	22
4.9 Análise da correlação entre o fenótipo de diferenciação e acetilação de histonas	23
4.9.1 Ensaio de diferenciação	23
4.9.2 Análise por citometria	23
4.10 Análise de proliferação por citometria	24
4.11 Análises estatísticas	25
5 RESULTADOS	26
5.1 O bloqueio da atividade HDAC não altera a viabilidade celular e a taxa de proliferação de NPCs	26
5.2 IL-1 β não altera a viabilidade de NPCs mas causa redução no diâmetro das neuroesferas	29
5.3 Efeito da IL-1 β sobre a viabilidade de NPCs com inibição ou não de atividade de HDAC	31
5.4 Efeito da IL-1 β sobre a diferenciação de NPCs com inibição ou não de atividade de HDAC	34
5.5 Efeito da IL-1 β sobre a acetilação e diferenciação de NPCs com inibição ou não de atividade de HDAC	37
5.6 IL-1 β é capaz de ativar de forma funcional a sinalização celular por NF- κ B	39
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	45
8 REFERÊNCIAS	46

1. Introdução

1.1. Biologia da neurogênese

O encéfalo é a parte superior do sistema nervoso central, composta por tronco encefálico, cerebelo e cérebro; seu tecido especializado, tecido nervoso, é composto de neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e células endoteliais, todas derivadas da glia radial (RGC; Spassky *et al.*, 2005). Sua origem é o neuroectoderma, que é gerado a partir de células ectodérmicas posicionadas imediatamente acima da notocorda no período embrionário. A notocorda é um importante centro sinalizador do embrião capaz de emitir sinais indutores para especificar o neuroectoderma, ou placa neural, e a partir dela surgirá o tubo neural. As células que compõem essa estrutura embrionária são conhecidas como células precursoras neurais, que são células-tronco em divisão e irão se tornar neuroblastos não-mitóticos. Estes por sua vez, darão origem aos primeiros neurônios no embrião em desenvolvimento (Purves *et al.*, 2011). Além destas células, também podemos encontrar a microglia, células imunes originadas do saco vitelino (Lampron, Pimentel-Coelho e Rivest, 2013) responsáveis tanto pela manutenção da homeostase do cérebro quanto pelo refinamento sináptico (Hong, Dissing-Olesen e Stevens, 2016).

As células precursoras neurais, que compõem o neuroepitélio, também dão origem às RGC, com perda de junções oclusivas e aquisição de propriedades astrogliais, que são capazes de gerar diretamente novos neurônios ou produzir células progenitoras intermediárias, que também geram novos neurônios (Yao *et al.*, 2016). As RGC aparecem por volta da fase média do desenvolvimento embrionário de camundongos, por volta do décimo segundo dia (E12). Essas células devem interpretar sinais do tubo neural, como o gradiente de morfógenos (BMP) e Sonic Hedgehog (SHH), para maior robustez na neurogênese (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009), isto é, o processo de desenvolvimento de novos neurônios a partir de células-tronco neurais multipotentes capazes de realizar divisões simétricas para auto-renovação e assimétricas, para dar origem à células mais diferenciadas (Bond, Ming e Song, 2015); o surgimento de astrócitos e oligodendrócitos a partir das RGC é mais tardio (Yao *et al.*, 2016).

Durante muito tempo, acreditava-se que não havia a geração de novas células no cérebro adulto; contudo, Altman e Das (1965) deram o primeiro passo para a derrubada do que era considerado o dogma na neurociência até então. Através de experimentos de incorporação de ³H-timidina radioativa por células que fazem replicação, seus trabalhos mostraram a existência de dois nichos, ou microambientes, neurogênicos no adulto: a zona subventricular (V-SVZ; figura 1) e a zona subgranular (SGZ; figura 1). Como em

toda quebra de paradigma, os trabalhos de Altman foram fortemente criticados na comunidade científica ao longo da década de 1970, tal que muitos livros-texto da época ignoravam as demonstrações bem claras de que o cérebro adulto era capaz de gerar novas células (Altman, 2008). Desta forma, a neurogênese no cérebro adulto passou a ter mais atenção apenas a partir do final da década de 1980, quando Alvarez-Buylla identificou células similares à glia radial, derivadas desta mantida quiescente ao longo do desenvolvimento (Merkle *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2016) e que apresentavam potencial neurogênico no cérebro adulto de aves (Alvarez-Buylla, Theelen e Nottebohm, 1988, 1990; Alvarez-Buylla, 1992), descrito posteriormente em roedores (Doetsch *et al.*, 1999). Ambos os nichos apresentam ultraestrutura bem definida e organizada, com intensa participação de vasos sanguíneos e moléculas de matriz extracelular, como lamininas e proteoglicanos (García-Verdugo *et al.*, 1998; Bond, Ming e Song, 2015; Lim e Alvarez-Buylla, 2016).

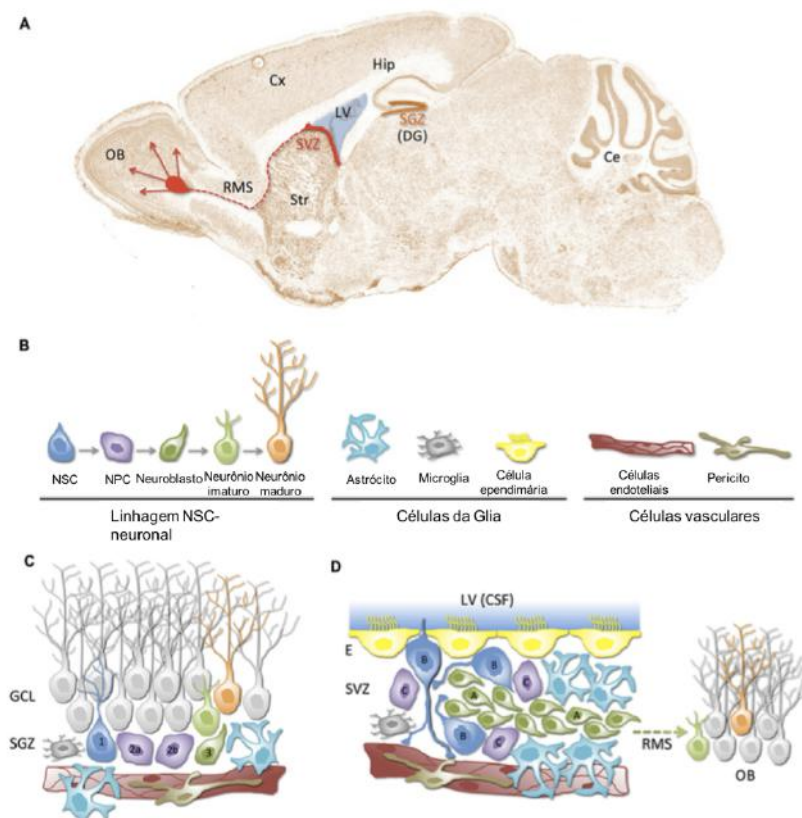


Figura 1 - Nichos neurogênicos no cérebro adulto de mamíferos. **A.** Corte sagital de cérebro de camundongo com representação esquemática dos nichos neurogênicos; **B.** Componentes celulares dos nichos neurogênicos; **C.** Representação esquemática da zona subgranular (SGZ); **D.** Representação esquemática da zona ventricular-subventricular (V-SVZ). OB: bulbo olfatório; RMS: corrente migratória rostral; Str: estriado; Cx: córtex; Hip: hipocampo; SVZ: zona subventricular; LV: ventrículo lateral; SGZ: zona subgranular; DG: giro denteado; Ce: cerebelo; GCL: camada de células granulares; CSF: líquido

cefalorraquidiano; NSC: célula-tronco neural; NPC: célula progenitora neural. Adaptado de Bátiz *et al.*, 2016

A V-SVZ está localizada na região do subepêndima dos ventrículos laterais e possui células indiferenciadas que diferenciam-se em neuroblastos, que migram para o bulbo olfatório em murinos (Doetsch e Alvarez-Buylla, 1996) e dão origem aos diversos tipos de interneurônios granulares ou periglomerulares (García-Verdugo *et al.*, 1998; Lim e Alvarez-Buylla, 2016). Em humanos, os neuroblastos migram para o estriado e tornam-se interneurônios (Braun e Jessberger, 2014a, b). Na SGZ, localizada no giro denteado do hipocampo, as células progenitoras dão origem a neurônios granulares excitatórios.

As células da V-SVZ (Figura 2) são denominadas B, C e A, conforme a nomenclatura sugerida por Doetsch, García-Verdugo e Alvarez-Buylla (Doetsch, García-Verdugo e Alvarez-Buylla, 1997); segundo a nomenclatura proposta por Derek van der Kooy, as células B, C e A são células progenitoras, e apenas as células C e A, que já possuem algum comprometimento com diferenciação, são células precursoras (Morshead e van der Kooy, 2004).

As células-tronco multipotentes (NSCs) são chamadas células do tipo B, que são células com característica astrocitária que expressam *Sox2*, um fator de transcrição ligado à auto-renovação de células-tronco. NSCs também expressam o gene *GFAP*, que codifica a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um tipo de filamento intermediário. Normalmente quiescentes, as células do tipo B apresentam prolongamentos que entram em contato tanto com o endotélio vascular (prolongamento basal), como com o líquido cefalorraquidiano (LCR; prolongamento apical), pelo qual passam fatores como citocinas e fatores de crescimento. Podem ser citados morfógenos derivados do osso (BMP; García-Verdugo *et al.*, 1998; Horgusluoglu *et al.*, 2016), que estimulam a proliferação celular ajudando a manter a organização ultraestrutural do nicho (Kokovay *et al.*, 2012). NSCs possuem longo ciclo celular e dividem-se gerando novas células do tipo B e células progenitoras (NPCs) do tipo C, que expressam *Nestina*, que codifica uma proteína filamentosa característica destas células (Faigl e Song, 2013). As células do tipo C são amplificadoras, possuindo curto ciclo celular e alta taxa de proliferação, além de dar origem a outro tipo celular mais diferenciado: as células do tipo A. Estas são neuroblastos que migram, quando ativados por ErbB4 e seus ligantes neuregulinas 1 e 2 (Tong e Alvarez-Buylla, 2014), para o bulbo olfatório através da corrente migratória rostral (RMS). Células do tipo A podem apresentar diferentes fenótipos: além das células granulares, podem se

tornar células periglomerulares que expressam *Calretinina* e *Tirosina-hidroxilase* ou *Calbindina*. Sua integração ao circuito é mediada por fatores como o microRNA miR-132 e o fator de crescimento similar à insulina 1 (IGF-1; Díaz-Guerra *et al.*, 2013).

Devido ao íntimo contato com os fatores expressos no ventrículo, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, as células do tipo B podem entrar ou não em quiescência, isto é, em um estado metabolicamente diferenciado em que a funcionalidade da célula está voltada para manutenção, em vez de replicação, e com características únicas, como metabolismo glicolítico e lipídico em detrimento do oxidativo (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015), tal que sua ativação promove expressão do receptor do fator de crescimento de epiderme (EGFR). Este permite responsividade a fatores da família do fator de crescimento de epiderme (EGF), como o próprio EGF e o fator transformante de crescimento (TGF)- α , que promovem proliferação (Codega *et al.*, 2014). Além das células precursoras, ainda há na V-SVZ as células endimárias, que entram em contato direto com o LCR e são responsáveis por manter seu fluxo hidrodinâmico constante, além de participarem no contexto da regulação da neurogênese (Bátiz *et al.*, 2016). Devido ao contato íntimo com as células endimárias, à estrutura compacta e a similaridade com as zonas ventricular (VZ) e subventricular (SVZ) embrionárias, aliado à manutenção de RGC embrionárias mantidas em quiescência na fase adulta (Furutachi *et al.*, 2015; Fuentealba *et al.*, 2015), Alvarez-Buylla propôs denominar este nicho como V-SVZ, de forma a fazer referência a estes fatores (Lim e Alvarez-Buylla, 2016).

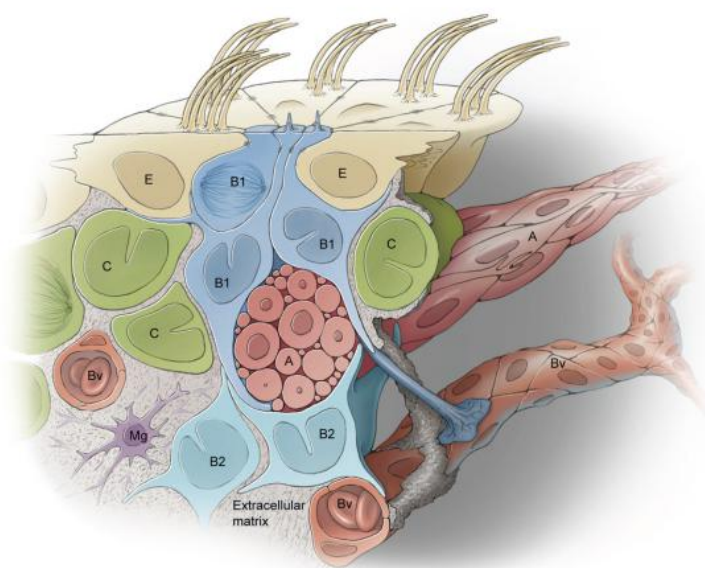


Figura 2 - A zona ventricular-subventricular. E (em bege): Células endimárias com cílios entrando em contato com o ventrículo e formando estrutura em forma de *pinwheel*; B1 (em azul): células do tipo B com porção apical com cílio primário imóvel entrando em contato com o ventrículo ao centro do *pinwheel* e

projeção entrando em contato com vaso sanguíneo (Bv, em marrom); B2 (em azul claro): células do tipo B com características astrocíticas e projeções entrando em contato com a corrente migratória rostral (RMS) e o vaso sanguíneo; C (em verde): células do tipo C; A (em vermelho): células do tipo A, neuroblastos, formando a corrente migratória rostral (RMS); Mg (em roxo): microglia; em cinza, matriz extracelular; Adaptado de Ihrle e Alvarez-Buylla, 2011.

As NPCs desta região se dividem de forma assimétrica dando origem a astrócitos, oligodendrócitos e neurônios tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa capacidade pode ser evidenciada uma vez que, quando dissociadas e cultivadas com fatores de crescimento de fibroblastos-2 (bFGF) e EGF, estas crescem em suspensão formando agregados celulares chamados de neuroesferas que são capazes de incorporar 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) e que morrem quando tratadas com a droga antimitótica citosina- β -D-arabinofuranosídeo (Ara-C; Doetsch *et al.*, 1999). Essas neuroesferas são compostas por células dos tipos B e C, mas principalmente do tipo C, uma vez que apresentam ciclo celular mais curto e são mais proliferativas.

O diâmetro de cada neuroesfera reflete a capacidade proliferativa e a responsividade a fatores de crescimento das células formadoras de neuroesferas. Assim sendo, é possível, através da comparação de diâmetros de neuroesferas em diferentes condições, inferir o impacto de cada abordagem experimental sobre a proliferação destas (Pastrana, Silva-Vargas e Doetsch, 2011). Quando expostas a soro fetal bovino ou à ausência de fatores de crescimento, as NPCs entram em programa de diferenciação que é dependente da adesão ao substrato (Belenguer *et al.*, 2016). A diferenciação *in vitro* pode ocorrer através da adesão tanto de células isoladas quanto de neuroesferas inteiras, com o auxílio de moléculas que mimetizem matriz extracelular, como lamininas, poli-L-lisina ou matrizes complexas que contenham moléculas como colágeno-IV e proteoglicanas. Além disso, ainda é possível fazer explante, isto é, cultivo de células da V-SVZ íntegra, tal que permite a análise não só do comportamento das NPCs em seu nicho, mas também da capacidade destas de migração frente a um estímulo.

Já no hipocampo, na SGZ, as células-tronco similares à glia radial são chamadas de células do tipo I, que podem dividir-se assimetricamente dando origem a células progenitoras intermediárias (IPCs), intimamente associadas à vasculatura e que dão origem aos neuroblastos que se tornarão os novos neurônios granulares do hipocampo. As células do tipo I também apresentam prolongamentos que alcançam a camada molecular do giro denteado, interagindo com o circuito neuronal, tal que as células maduras possam tomar parte na regulação das NSCs deste nicho (Seri *et al.*, 2004). Os neurônios granulares são formados constantemente, uma vez que são associados ao

aprendizado e à formação de memória, apresentando baixa taxa de migração uma vez que se deslocam apenas da zona subgranular para a camada granular (Figura 1). Em cultura, estas células são multipotentes, capazes de diferenciarem-se nos três tipos celulares do SNC. Já *in vivo*, geram apenas células granulares e astrócitos cuja função não está totalmente elucidada (Bond, Ming e Song, 2015).

1.2. Papel do sistema imune na neurogênese

O sistema imune é formado por células circulantes e residentes em diferentes tecidos, que podem ser ativadas por citocinas, quimiocinas e receptores, ou pelo contato com moléculas como padrões moleculares associados a danos ou patógenos, e pelos fatores que essas células secretam, e é um dos responsáveis pela manutenção da homeostase do organismo (Abbas, Lichtman e Pillai, 2015).

Durante o período embrionário, citocinas são expressas e participam da regulação do desenvolvimento de forma que alterações, como processos inflamatórios, podem provocar alterações fisiológicas de até longo prazo. A interleucina (IL)-6, por exemplo, é secretada naturalmente por vias autócrina e parácrina pelas NPCs da V-SVZ durante o desenvolvimento em camundongos, estimulando a sua proliferação; contudo, quando a mãe apresenta um pico intenso de IL-6 no período pré-natal, por mais que haja um grande aumento do número de células-tronco, estas não se diferenciam e não prosseguem para a RMS, de forma que o olfato da prole fica muito prejudicado (Gallagher *et al.*, 2013).

Quando ocorre infecção por bactérias Gram-negativas, com a presença de lipopolissacarídeos (LPS) e interferon (IFN)- γ , a microglia é ativada e passa a secretar IL-1 β , que provoca queda na proliferação, sobrevivência e migração de NPCs, observado inicialmente em NPCs de telencéfalo embrionário (Silva-Vargas, Crouch e Doetsch, 2013; Guadagno *et al.*, 2015). A queda na proliferação ocorre como consequência da ativação do fator de transcrição fator nuclear (NF)- κ B pela ligação da IL-1 β com o receptor de IL-1 (IL-1R1; McPherson, Aoyama e Harry, 2011) e devido ao intenso aumento da expressão da molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) pelas células do tipo B da V-SVZ. Estas por sua vez entram em quiescência, sofrem bloqueio no ciclo celular, aumentam a compactação do nicho e não sofrem progressão de linhagem, isto é, não avançam para um estado mais diferenciado (Wu *et al.*, 2012; Kokovay *et al.*, 2012; Silva-Vargas, Crouch e Doetsch, 2013). A queda na sobrevivência decorre da apoptose mediada

por NF- κ B e proteínas reguladoras da apoptose como Puma e Bax (Guadagno *et al.*, 2015).

No período embrionário, o tecido do SNC é povoado por microglia, que participa no refinamento sináptico e na expressão de citocinas que medeiam a neurogênese. No SNC maduro, não há entrada de novas células imunes salvo pouquíssimos casos: eventos neurodegenerativos, como o infarto, conseguem induzir a infiltração de monócitos circulantes através da BBB exclusivamente para o sítio da lesão de forma que a resposta, localizada, não afete o resto do tecido nervoso (Lampron, Pimentel-Coelho e Rivest, 2013). Também é possível observar a infiltração celular em infecções como a provocada pelo vírus Nipah (NiV), um paramixovírus que se replica em linfócitos T que expressem CD6 (uma molécula ligante do receptor CD166) presente na BBB provocando sua ruptura. Em neurônios, a infecção provoca a expressão de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-1 β e consequente recrutamento de células inflamatórias (Escaffre, Borisevich e Rockx, 2013).

De um modo geral, devido à sua origem mielóide, a microglia *in vitro* também apresenta dois perfis bem característicos de ativação, mas que *in vivo* mostram ser extremamente fluidos (Figura 3): o perfil M1, similar ao macrófago classicamente ativado e pró-inflamatório e o perfil M2 ativado de forma alternativa e anti-inflamatório. O perfil M1 resulta do estímulo da microglia por fatores como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e LPS, que passa então a secretar IL-1 β , TNF- α , IL-6 e proteína quimio-atrativa de monócitos (MCP-1), também conhecida como quimiocina ligante da família C-C 2 (CCL2). A secreção dessa proteína tem como consequência o recrutamento de células do sistema imune para dar início ao processo inflamatório. Essa via de ativação provoca queda na proliferação e sobrevivência das NPCs, associada a uma queda na neurogênese.

A microglia também pode apresentar perfil M2 quando estimulada por IL-4 e IL-13, passando a secretar IL-4, IL-10, TGF- β 1 e IGF-1. A secreção desses fatores confere à microglia um perfil de resolução da inflamação e subsequente reparo tecidual (Belarbi e Rosi, 2013; Kohman e Rhodes, 2013). Tendo isto em mente, é possível ter uma noção de como um processo neuro-inflamatório pode afetar a neurogênese de um modo geral. No hipocampo, por exemplo, já se sabe que a exposição a TNF- α aumenta a neurogênese, enquanto a IL-6 diminui (Kohman e Rhodes, 2013; Tabela 1). Em contrapartida, apesar de provocar depleção de oligodendrócitos maduros, a IL-1 β pode estar associada a processos de re-mielinização, por estimular fatores como IGF-1, que induzem

proliferação e diferenciação de progenitores de oligodendrócitos (Miron, Kuhlmann e Antel, 2011; Patel e Klein, 2011).

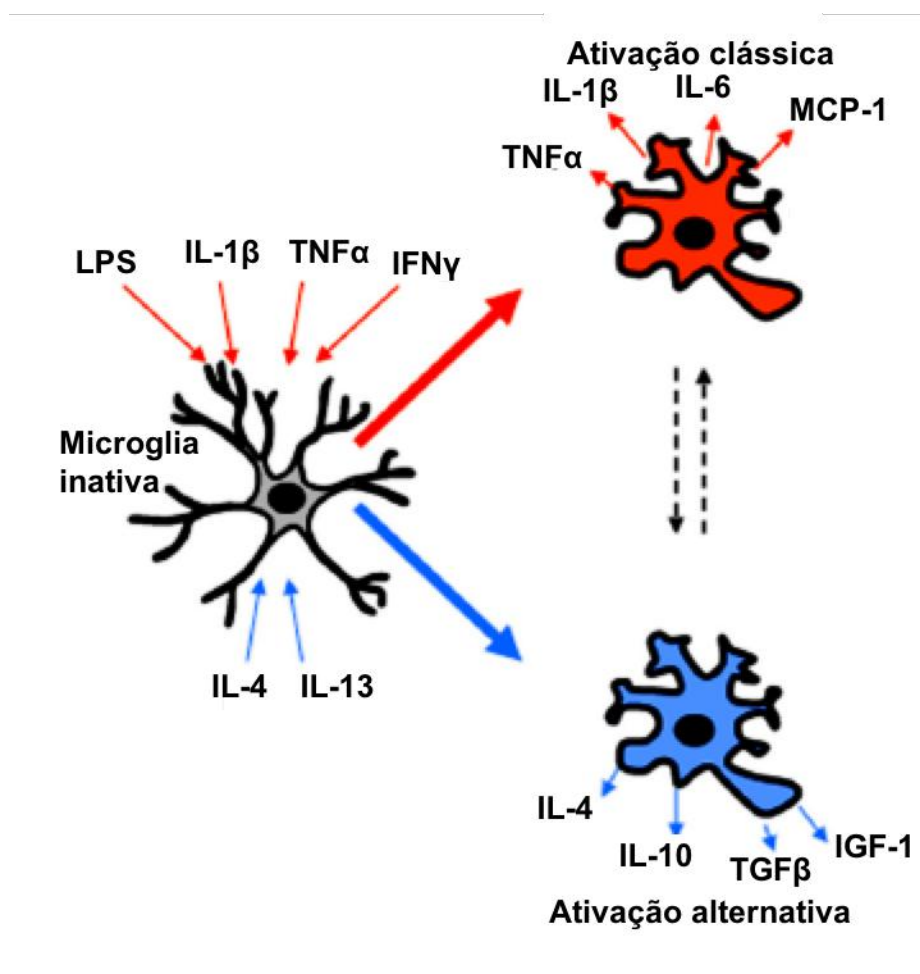


Figura 3 - Representação esquemática das ativações clássica e alternativa da microglia. IL: interleucina; TGF: fator transformante de crescimento; IGF: fator de crescimento similar à insulina; IFN: interferon; MCP: proteína quimioatrativa de macrófagos; TNF: fator de necrose tumoral; LPS: lipopolissacarídeo. Adaptado de Belarbi e Rosi, 2013.

Devido à sua importância para o aprendizado e sua ligação com muitas doenças neurodegenerativas, a relação entre a neuro-inflamação e a neurogênese na SGZ é muito estudada, de forma que na literatura já há muitos dados consistentes sobre o papel das citocinas nesse contexto. A V-SVZ, por outro lado, apresenta informações muitas vezes conflitantes. Por exemplo, enquanto Gonzalez-Perez e colegas relatam que não há expressão de IL-1R1 em células da V-SVZ (Gonzalez-Perez *et al.*, 2012), Kokovay, Silva-Vargas e Guadagno mostram não só a presença deste receptor *in vivo* como sua relevância para a manutenção da V-SVZ, conforme já mencionado anteriormente (Kokovay *et al.*, 2012; Silva-Vargas, Crouch e Doetsch, 2013; Guadagno *et al.*, 2015);

Ajmone-Cat também demonstrou a presença desse receptor em NPCs derivadas de embriões e camundongos adultos (Ajmone-Cat *et al.*, 2010).

Como a neurogênese na V-SVZ também é afetada por doenças neurodegenerativas e processos inflamatórios, e tendo em vista que mesmo dentre as citocinas pró-inflamatórias as consequências não são necessariamente redundantes, fica em aberto a pergunta sobre qual é o real efeito destas na V-SVZ, e qual é o papel destas células no processo de reparo tecidual pós-lesão cerebral, tendo em vista que a relação entre citocinas inflamatórias e a neurogênese pode estar ligada a doenças neurodegenerativas, como autismo e esquizofrenia (Gallagher *et al.*, 2013).

	Proliferação	Sobrevivência	Neurogênese	Gliogênese
IL-6 ^a	↓	↓	↓	
IL-1 β	↓	↓		↑
TNF- α ^b	↓		↑	
Prostaglandinas		↓		
TGF- β ^c		↑	↑	
IL-4			↑	
IL-10	↑			

Tabela 1 - Sumário do efeito de algumas moléculas de sinalização imune em NPCs do hipocampo; adaptado de Kohman e Rhodes, 2013.

^a IL: Interleucina

^b TNF: Fator de necrose tumoral

^c TGF: Fator transformante de crescimento

1.3. Epigenética

Epigenética é o campo da genética que se dedica ao estudo do repertório de modificações pós-traducionais no núcleo e/ou na porção N-terminal das caudas das histonas nucleossomais e seus impactos sobre o desenvolvimento e fisiologia celular. Nucleossomos são as unidades funcionais da cromatina formados por um octâmero de histonas H2a, H2b, H3 e H4 organizadas em dímeros. A fita de DNA de cerca de 147 pares de bases é enovelada ao redor do octâmero de histonas, que são ligados entre si pela histona ligante H1 (Kouzarides, 2007; Deichmann, 2016; Figura 4). Além dessas modificações epigenéticas, também podem ser citadas a metilação de DNA e a degradação de RNA mensageiro (mRNA) antes da tradução, que provocam alteração na

expressividade de genes sem acúmulo de mutações. Nas histonas, as modificações pós-traducionais controlam o acesso de complexos repressores ou ativadores à cromatina através da compactação ou relaxamento da cromatina. De um modo geral, as modificações pós-traducionais em histonas associadas à Epigenética são a metilação, acetilação, glicosilação, ubiquitinação e SUMOilação. O conjunto de modificações pós-traducionais de um nucleossomo conterà uma informação personalizada de relaxamento ou compactação da cromatina.

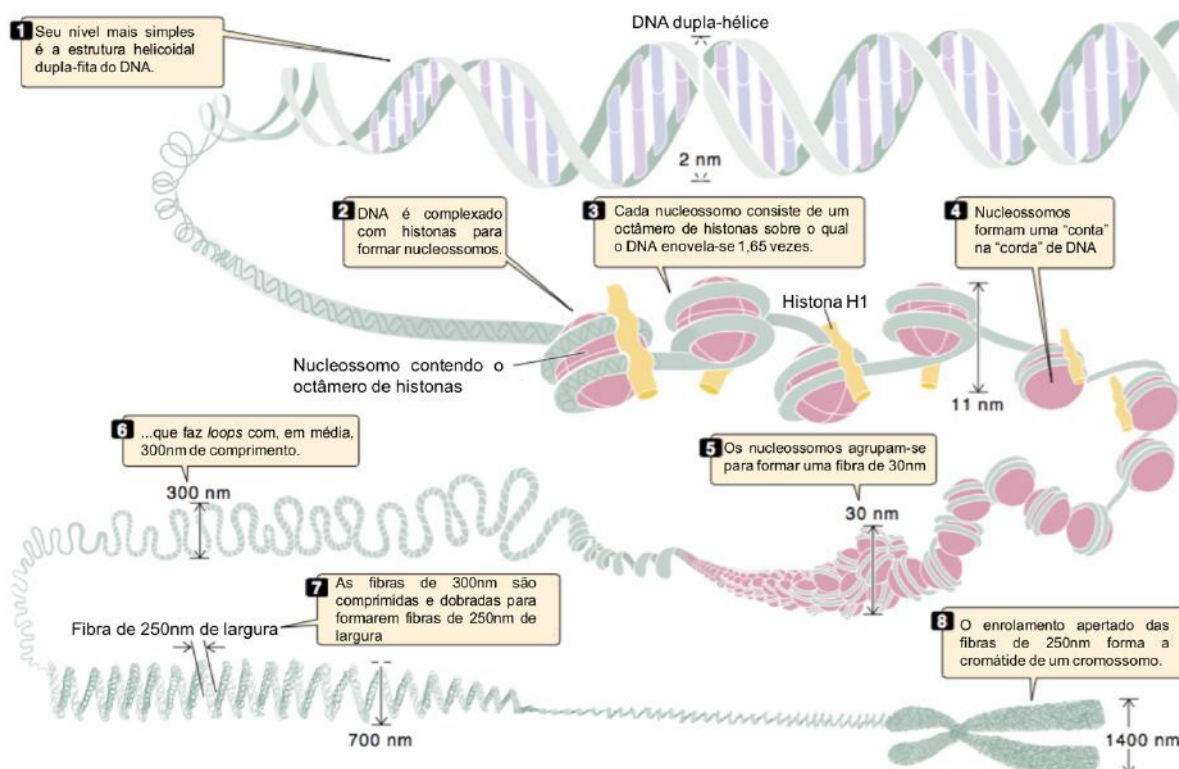


Figura 4 - Estrutura da cromatina em vários níveis de organização; adaptado de Pierce, Genetics: a conceptual approach, segunda edição, 2002.

Metilação e acetilação de histonas são as mudanças pós-traducionais mais estudadas e ocorrem em resíduos de lisina (K). Isso faz com que haja alterações na carga global das histonas que serão atraídas ou repelidas pelo DNA, compactando ou relaxando a cromatina respectivamente. A interação entre um grupamento acetil e o $-\text{NH}_3^+$ da lisina, catalisada por enzimas chamadas histona acetiltransferases (HAT), altera a dinâmica da interação entre a subunidade da histona e o DNA, de forma que este é repelido e, conseqüentemente, a expressão gênica é promovida – a retirada dos grupamentos acetil é mediada por enzimas histona desacetilases (HDAC) e provoca enovelamento da cromatina, isto é, repressão da transcrição (Figura 5).

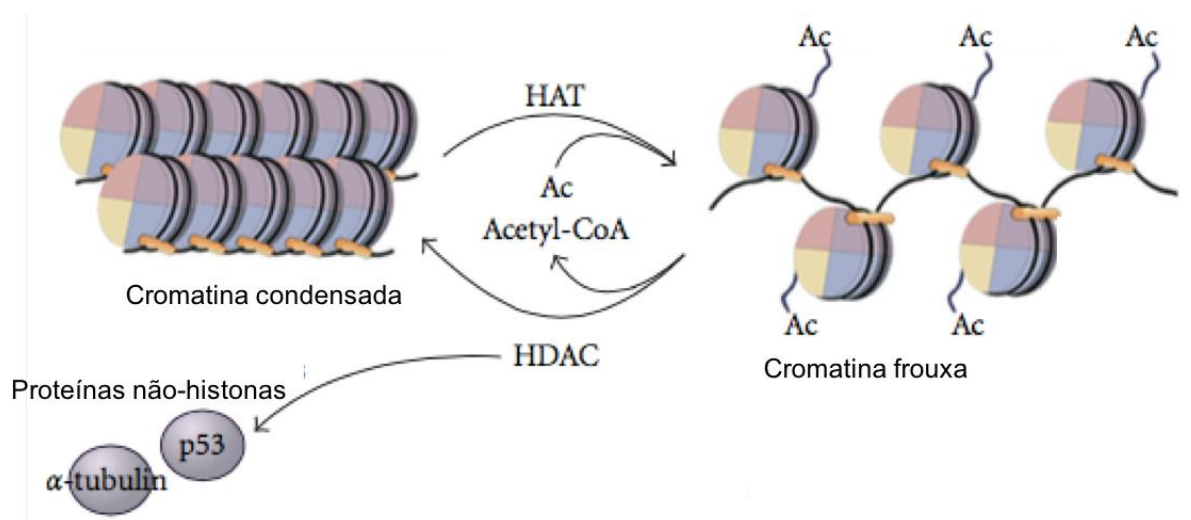


Figura 5 - Regulação da acetilação dos resíduos de lisina das histonas pela ação de histonas acetiltransferases e desacetilases; adaptado de Rodd, Ververis e Karagiannis, 2012.

A metilação, por outro lado, ocorre por substituição dos prótons da porção $-NH_3^+$ dos resíduos de lisina, de forma que esta pode ser mono-, di- ou trimetilada por enzimas histona metiltransferases (HMT), e cada uma dessas formas promove a transcrição de forma diferenciada. Eventos como a di- ou trimetilação do resíduo 9 de lisina da histona H3 (que podem ser escritos como H3K9me2 e H3K9me3) aumentam o estado enovelado da cromatina através do recrutamento de proteínas como a proteína de heterocromatina 1 (HP1; Vincent e van Seuningem, 2009), mas H3K4me2 e H3K4me3 aumentam a atividade transcricional.

A repressão da transcrição através de metilação do DNA é um dos eventos mais importantes no desenvolvimento embrionário. Durante a fase pré-blastocística, todos os grupamentos metil – com exceção dos ligados a impressões genômicas – são retirados, para indução de pluripotência e sintetizados *de novo* em todo o genoma, com exceção de poucas regiões CpG protegidas. Após a implantação, as metilações passam a ocorrer apenas em sítios específicos, coordenadas por fatores de transcrição, e com função definida: por exemplo, genes marcadores de pluripotência, como *Sox2*, *Oct-4* e *Nanog*, são metilados como pré-requisito para a diferenciação celular (Deichmann, 2016).

A modulação através de acetilação de histonas garante maior dinamismo na regulação da expressão gênica, e também desempenha papel importante no desenvolvimento. O grau de acetilação de H3K9 em diferentes períodos, por exemplo, influencia as capacidades de reprogramação e pluripotência de células-tronco

embrionárias (ESC), já que o uso de drogas inibidoras de HDAC é capaz de promover a manutenção do estado pluripotente e suprimir a diferenciação neural quando feito até o quarto dia do desenvolvimento. (Qiao *et al.*, 2014).

As HDAC, por sua vez, estão agrupadas em quatro classes distintas: classe I, que compreende HDAC1, 2, 3 e 8; classe II, dividida em IIA, que compreende HDAC4, 5, 7 e 9, e Iib, com HDAC6 e 10; classe III, ou classe das sirtuínas, composta por SIRT1 a 7; e classe IV, que compreende apenas a HDAC11. A principal particularidade das sirtuínas é que se utilizam de NAD^+ como co-fator, diferente das outras HDAC, conhecidas como “família clássica”, que usam Zn^{2+} . As classes I e IV estão localizadas principalmente no núcleo, enquanto a classe Iib é exclusivamente citoplasmática e a Iia transita entre ambos (Roche e Bertrand, 2016).

Estas enzimas podem sofrer inibição farmacológica; isto é, podem ter sua atividade inibida com o uso de fármacos. Estes são agrupados de acordo com sua estrutura química, podendo ser hidroxamatos, peptídeos cíclicos, ácidos graxos de cadeia curta, benzamida ou outros, que inclui os inibidores de sirtuínas, e podem ser HDAC-específicos, como MS-275 que atua sobre HDAC1, ou gerais, como a droga inibidora pan-HDAC Tricostatina A (TSA; Harrison e Dexter, 2013), que inibe as HDAC de classes I, Iia e Iib (Figura 6).

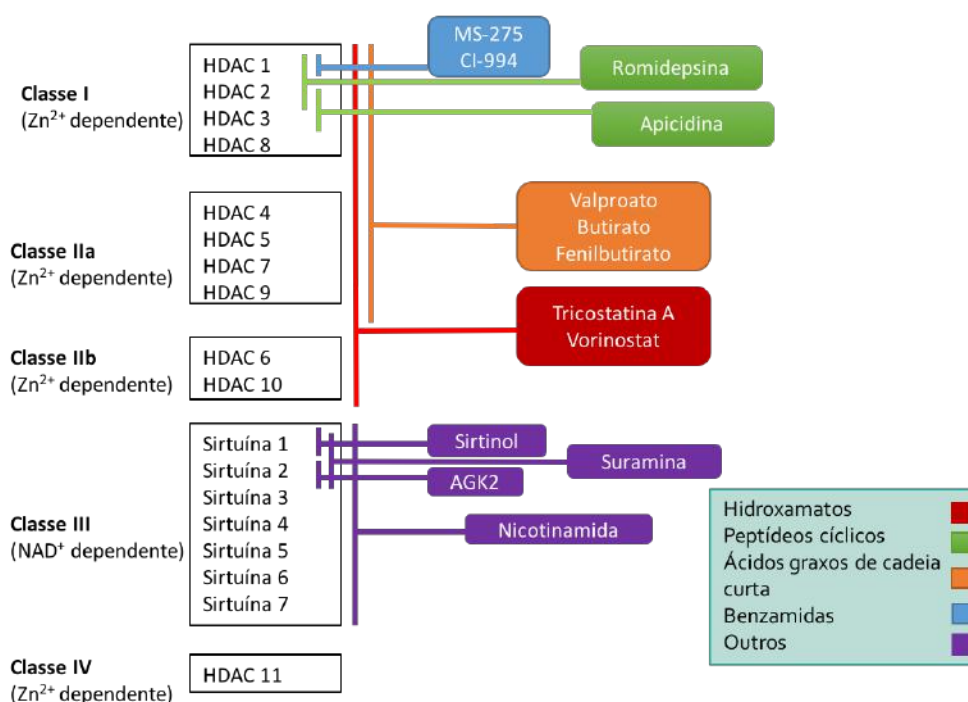


Figura 6 - Sumário gráfico de classes de histona desacetilases e seus inibidores. HDAC: histona desacetilase. Adaptado de Harrison e Dexter, 2013.

1.4. Histonas e a neurogênese

As HDAC, associadas a HATs como a p300, possuem papel extremamente importante no neurodesenvolvimento: a inativação de HDAC1 e HDAC2 promove a perda de marcadores da diferenciação de oligodendrócitos a partir de progenitores corticais, interferindo na mielinização; a HDAC3 também está envolvida nessa via de diferenciação (Lilja, Heldrig e Hermanson, 2013). Em contrapartida, estas mesmas enzimas possuem papel distinto na diferenciação neuronal, de forma que sua inibição promove a geração de novos neurônios (Castelo-Branco *et al.*, 2014) através do aumento da expressão de NeuroD1 (Hirabayashi e Gotoh, 2010; Pataskar *et al.*, 2015). A deleção de HDAC2, entretanto, não promove aumento na diferenciação neuronal, uma vez que esta é necessária para a diferenciação total e sobrevivência desses neurônios. No entanto, a perda de função não é crítica para o desenvolvimento, já que a HDAC1 pode ser expressa ectopicamente nesse período de forma redundante (Jawerka *et al.*, 2010).

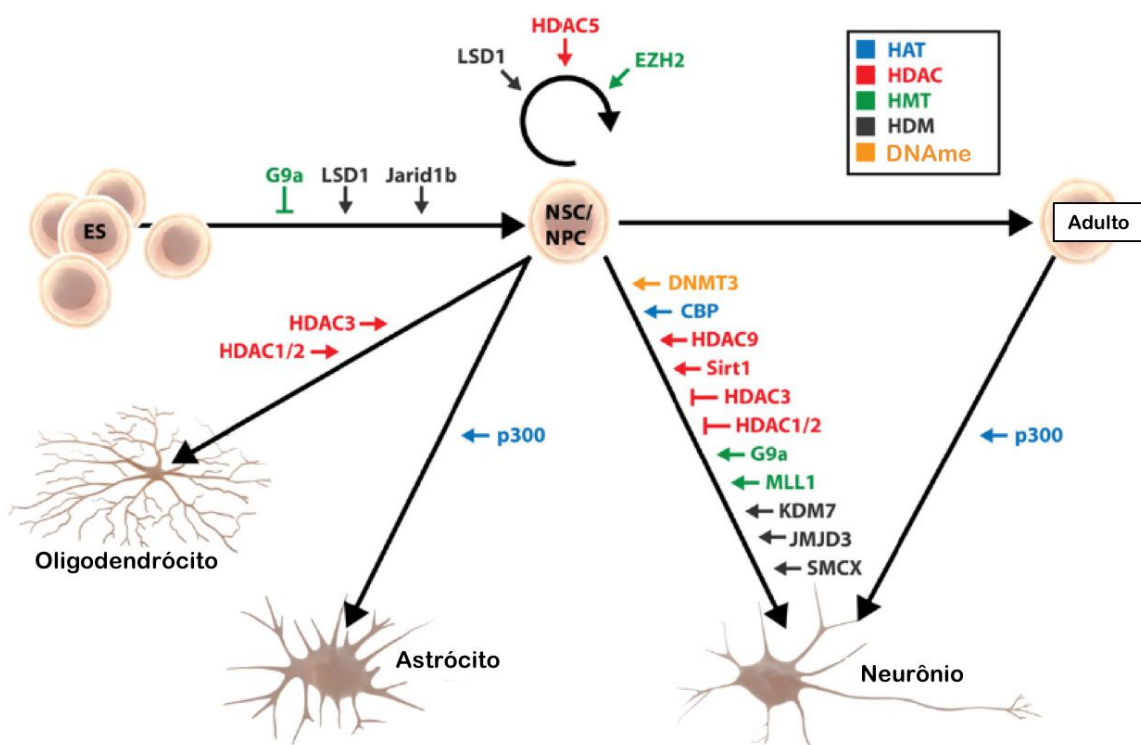


Figura 7 - Sumário gráfico de enzimas modificadoras de histonas no desenvolvimento e diferenciação neural. HAT: histona acetil-transferase; HDAC: histona desacetilase; HMT: histona metil-transferase; HDM: histona demetilase; DNAm: metilação de DNA. Adaptado de Lilja, Heldrig e Hermanson, 2013.

A expressão de *GFAP* também é dependente de HDAC, já que o tratamento com drogas inibidoras, como o TSA e o Butirato de Sódio, provoca queda na expressão total deste gene, assim como troca de isoformas: em vez de produzir α GFAP, as células passam a produzir mais δ GFAP, uma isoforma mais comum nas células do tipo B. Nesse caso, ocorre um fenômeno interessante: em vez de aumentar, há uma queda em H3K27ac na região promotora do *GFAP*, provocada por um aumento na expressão de HDAC3 como mecanismo compensatório da inibição generalizada de HDAC (Kanski *et al.*, 2014). Além disso, a inibição de HDAC por Butirato ou Varinostat (também conhecido como SAHA) provoca bloqueio da progressão do ciclo celular para fase S por induzir aumento na expressão de inibidores de cinases ciclina-dependentes (CDK) como p21 e p27, aumento de H3K9ac, assim como hiporregulação na expressão de fatores de transcrição de células-tronco/progenitoras, como *Sox2* (Zhou *et al.*, 2011).

1.5. IL-1 β , epigenética e a neurogênese

A IL-1 β é capaz de provocar alterações no epigenoma: quando associada com hipóxia, provoca queda na expressão de MCP-1 através do aumento de metilação no DNA e de H3K9me2 (Aoi *et al.*, 2011). Em condrócitos, associada a TNF- α , provoca queda na hidroximetilação de citosina através da supressão das enzimas de translocação *ten eleven* (TET; Haseeb, Makki e Haqqi, 2014). Em fibroblastos pulmonares provoca dissociação da HDAC2 do promotor do gene *ITGB8*, provocando aumento na acetilação de H4 (Markovics *et al.*, 2011) e em linhagem de carcinoma de pulmão, provoca aumento em H4K8ac e H4K12ac (Ito *et al.*, 2000). Em NPCs da SGZ, o tratamento com IL-1 β induz o aumento em H3K9me3 na região promotora do fator de transcrição NeuroD, reprimindo-o e provocando subsequente repressão da neurogênese (Kuzumaki *et al.*, 2010). Mesmo assim, pouco se sabe sobre a relação exata entre a IL-1 β e o remodelamento de cromatina nas NPCs da V-SVZ e seu efeito exato na geração de novos neurônios a partir dessas células *in vitro*. Portanto, este trabalho se propõe a investigar a correlação entre esta citocina e a desacetilação de histonas utilizando-se do TSA, droga classicamente descrita na literatura como inibidora pan-HDAC e utilizada como referência no desenvolvimento de novos inibidores de HDAC (Ruijter *et al.*, 2003).

Em alguns modelos, o TSA mostrou ter atividade anti-inflamatória, aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e reduzindo a expressão de outras, como TNF- α e a própria IL-1 β , além de retardar a maturação de macrófagos (Han

e Lee, 2009); também foi capaz de restaurar a resposta anti-tumoral em modelo de linfoma de células do manto (Tiper e Webb, 2016). Além disso, há evidências na literatura de que a inibição de HDAC é capaz de promover a inibição da translocação de NF- κ B para a região promotora de genes pró-inflamatórios (Segain *et al.*, 2000; Shakespear *et al.*, 2011). Em modelo de isquemia, em ratos, o uso de inibidores, como TSA, butirato e ácido valproico, foi capaz de promover neuroproteção, reduzindo o volume do infarto e a gravidade das sequelas neurológicas (Kim *et al.*, 2007). Tendo em vista o potencial anti-inflamatório e neuroprotetor da inibição de HDAC, acredita-se que este possa ser um candidato promissor à terapia regenerativa.

2. Justificativa

Desde o ressurgimento do interesse nas NPCs, especialmente com relação à sua ativação, isto é, saída da quiescência, e diferenciação no adulto, muito se discute sobre a influência tanto do contexto inflamatório, quanto dos mecanismos epigenéticos envolvidas nestes processos. Além disso, muito do que se sabe hoje sobre essa relação foi descrito na SGZ, devido à sua importância quanto ao aprendizado espacial, a memória e as emoções. Já se sabe, por exemplo, que a IL-1 β provoca aumento de H3K9me3 na região promotora de NeuroD, importante fator pró-neurogênico, em NPCs embrionárias (Kuzumaki *et al.*, 2010). Doenças como a depressão apresentam ablação da neurogênese hipocampal (Santarelli *et al.*, 2003) e apesar de já haver evidências de que as NPCs da V-SVZ também sejam depletadas, pouco se investiga sobre elas. Em humanos, estas células migram para o córtex, então poderiam representar uma possível perspectiva para o reparo tecidual em situações como a doença de Alzheimer (Li, Bao e Wang, 2016), doenças neurodegenerativas progressivas, ou autismo (Fenlon *et al.*, 2015). Contudo, como o ambiente inflamatório impede a geração e migração de novos neurônios (Silva-Vargas *et al.*, 2013; Guadagno *et al.*, 2015) e promove a morte de oligodendrócitos maduros (Miron, Kuhlmann e Antel, 2011; Patel e Klein, 2011), o conhecimento dos mecanismos epigenéticos envolvidos nesses processos propiciaria um excelente alvo terapêutico para essas doenças. Tendo em vista a forte associação entre mecanismos de remodelamento de cromatina e a neuroinflamação, este trabalho se propõe a investigar a relação entre a IL-1 β , um importante modulador da resposta inflamatória, e a atividade de enzimas HDAC na V-SVZ.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Analisar o efeito da citocina IL-1 β na proliferação, viabilidade e diferenciação de NPCs de camundongos FVB adultos, investigando sua relação com a acetilação de histonas através da inibição farmacológica das enzimas HDAC.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da IL-1 β na viabilidade das NPCs *in vitro* na presença e ausência de TSA;
- Verificar a relação entre a inibição de HDAC, a exposição à IL-1 β e proliferação de NPCs;
- Observar se a inibição de HDAC consegue modular a diferenciação de NPCs *in vitro* expostas ou não à IL-1 β ;
- Compreender a possível correlação entre o fenótipo de células expostas à IL-1 β e modificações na cromatina promovidas por acetilação de histonas.

4. Materiais e métodos

4.1. Animais

Camundongos FVB machos foram mantidos em biotério a 25°C, em ciclos de 12h claro/escuro, com acesso a ração e água *ad libitum*. Utilizamos animais jovens machos, com idade entre 6 e 10 semanas de idade. Os experimentos foram realizados de acordo com os padrões regulamentados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Número de protocolo: 091/15.

4.2. Cultura de células

Para a cultura de NPCs, o subepêndima do ventrículo lateral de animais FVB jovens foi dissecado e submetido à dissociação enzimática por tripsina (1,33mg/mL), hialuronidase (0,7mg/mL) e ácido quinurênico (0,2mg/mL) por 20 minutos a 37°C em banho-maria sob agitação constante. Em seguida, o tecido foi mecanicamente dissociado com pipetas Pasteur de plástico com ponta fina até a obtenção de uma suspensão celular. A atividade enzimática foi neutralizada com solução salina contendo 4% (m/v) de albumina bovina sérica (BSA) e a suspensão foi filtrada através de uma malha com poros de 40µm para eliminação de porções de tecido não dissociadas. A suspensão foi então centrifugada a 350g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 10mL de solução salina contendo 30% (m/v) de sacarose, para nova centrifugação a 650g por 10 minutos a 4°C. O precipitado celular foi então ressuspenso em 10mL de meio para neuroesferas, composto de DMEM/F12 (Invitrogen, EUA) sem soro suplementado com GlutaMAX (2mM; Invitrogen, EUA), B27 (2% v/v; Invitrogen, EUA), EGF (20ng/mL; Sigma), bFGF (10ng/mL; Sigma) e penicilina/estreptomicina (100U/mL; Invitrogen, EUA) e mantido em suspensão por 7-10 dias em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂, para que cada célula formasse uma neuroesfera (Figura 8). Após este período, estas foram centrifugadas a 350g por 5 minutos a 4°C, para retirada do meio, lavadas com 3mL de solução salina contendo 20% (m/v) de sacarose estéril, para retirada de metabólitos que pudessem afetar a atividade enzimática e novamente centrifugadas a 350g. O sobrenadante foi descartado e as neuroesferas sofreram dissociação química por solução de tripsina e ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA; Lonza, EUA) em banho-maria a 37°C por 4 minutos, seguido de dissociação mecânica com pipeta Pasteur de

plástico com ponta fina. Ao fim da dissociação, foi adicionada solução neutralizadora de tripsina gelada (Lonza, EUA) e a suspensão celular foi centrifugada a 650g por 10 minutos sob refrigeração. O precipitado celular foi ressuspensão em meio para neuroesferas e mantido em suspensão em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂.

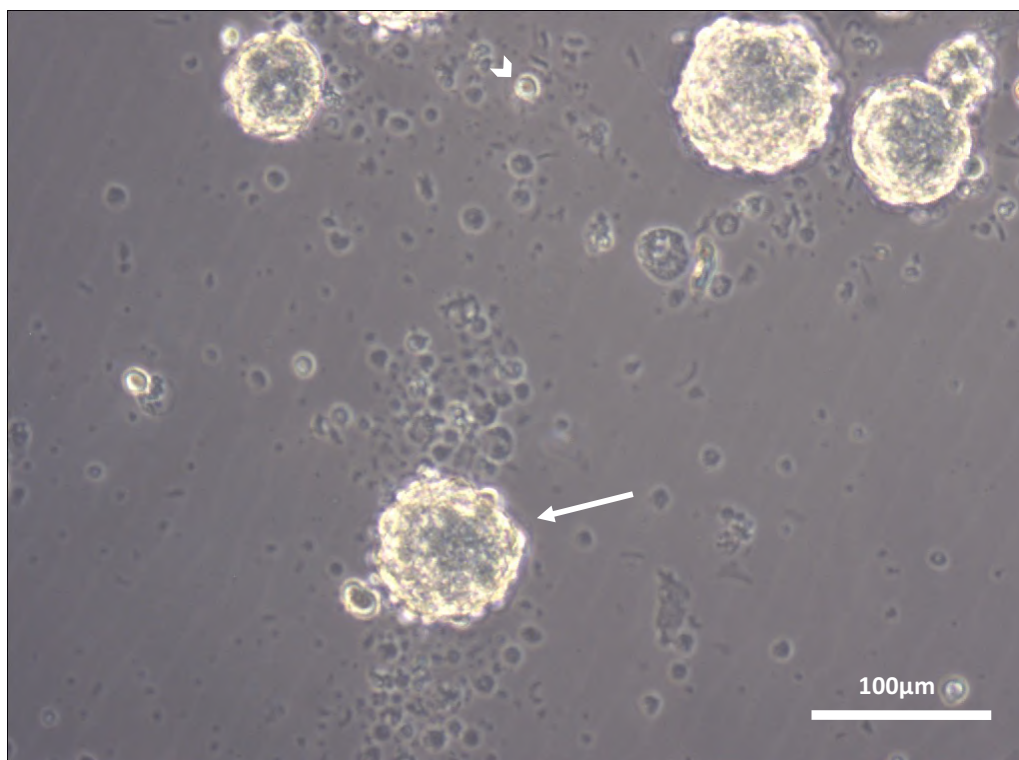


Figura 8 – Cultura de neuroesferas. Seta indicando neuroesfera, cabeça de seta indicando NPC isolada. Objetiva de 10x.

4.3. Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular

Estes ensaios foram feitos utilizando separadamente diferentes diluições de Tricostatina A ou de IL-1 β . Foram sempre feitos dois grupos controle para cada experimento: um grupo controle sem tratamento nenhum, com adição apenas de água, e um grupo controle do veículo, uma vez que o TSA é diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Apesar de o diluente da IL-1 β ser 0,1% de albumina bovina sérica (BSA) diluída em tampão fosfato-salina (PBS) 10mM, inerte para as células, foi feito um grupo controle deste veículo.

4.3.1. Análise de citotoxicidade

As neuroesferas foram coletadas, centrifugadas a 350g por 5 minutos sob refrigeração, para retirada do meio, lavadas com 3mL de solução salina contendo 20% de

sacarose, para retirada de metabólitos que pudessem afetar a atividade enzimática e novamente centrifugadas a 350g por 5 minutos sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as neuroesferas sofreram dissociação química por solução de tripsina e EDTA (Lonza, EUA) em banho-maria a 37°C por 4 minutos, seguido de dissociação mecânica com pipeta Pasteur de plástico com ponta fina. Ao fim da dissociação, foi adicionada solução neutralizadora de tripsina gelada (Lonza, EUA) e a suspensão celular foi centrifugada a 650g sob refrigeração por 10 minutos. O precipitado celular foi ressuspenso em 1mL meio para neuroesferas, do qual foram coletados 0,01mL. Este volume foi diluído em 0,01mL de azul de trypan para contagem de células em câmara de Neubauer. Estas foram plaqueadas em suspensão em placa de 24 poços com 0,5mL de meio para neuroesferas em densidade clonal de 4×10^3 células/mL com os seguintes tratamentos: TSA 1nM, 5nM, 10nM, 20nM, 40nM e 80nM e IL-1 β 10ng/mL em experimentos independentes. Após 7 dias, as neuroesferas formadas em cada tratamento foram quantificadas, fotografadas em microscópio de contraste de fase Olympus CKX41, com câmera digital Olympus Q-Color 3, em objetiva de 10x e tiveram seu diâmetro quantificado utilizando *software* ImageJ (*National Health Institute*, NIH).

4.3.2. Ensaio de proliferação combinado

A partir das concentrações previamente determinadas de 40nM de TSA e 10ng/mL de IL-1 β , foi feito novo ensaio de proliferação em que comparamos o efeito destes dois tratamentos separadamente, assim como em combinação. As neuroesferas foram novamente quantificadas e fotografadas para medição do diâmetro através do *software* ImageJ.

4.4. Análise de viabilidade

As células foram dissociadas e plaqueadas em placa de 96 poços na densidade de 5×10^4 células/poço com os tratamentos TSA 1-20nM, TSA 20-80nM, IL-1 β 1-20ng/mL ou TSA 40nM, IL-1 β 10ng/mL e TSA+IL-1 β por 5 dias. Após este período, a placa foi centrifugada a 350g por 5 minutos sob refrigeração, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas em estufa a 37°C com 12mM de MTT no escuro por 3 horas. Após este período, foi adicionado 0,2mL de DMSO e as células foram homogeneizadas. A leitura da turbidez do meio foi realizada no leitor de ELISA com absorbância a 560nm.

4.5. Análise de diferenciação

Para o ensaio de diferenciação, foram colocadas lamínulas dentro dos poços em placa de 24 poços, para em seguida serem tratadas por 30 a 60 minutos com Matrigel diluído 25x em meio para neuroesferas; para diferenciação, o meio não possui fatores de crescimento, mas 1% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Brasil). Após tratamento, as neuroesferas foram dissociadas e plaqueadas na densidade de 5×10^4 células por poço. As placas foram inicialmente mantidas em 37°C por 1 hora para que as células pudessem aderir às lamínulas e, por fim, foram adicionados os meios contendo IL-1 β 10ng/mL apenas, combinada com TSA 40nM ou apenas TSA 40nM. A diferenciação ocorreu simultânea ao tratamento. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂ por 5 dias. Posteriormente, foram fixadas por 10 minutos com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS 10mM e imediatamente processadas para imunocitoquímica ou mantidas sob refrigeração 4°C por até 3 dias.

4.6. Análise de proliferação

Para o ensaio de incorporação de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), as NPCs foram mantidas por 5 dias em suspensão em cultura com concentrações crescentes de TSA (1-10nM) na densidade de 5×10^4 células/poço; no quinto dia, adicionamos BrdU (Sigma-Aldrich, EUA) 1 μ M às culturas. Após 1, 3, 6, 12 e 24h, as neuroesferas foram coletadas, dissociadas, plaqueadas sobre lamínulas tratadas com Matrigel e incubadas a 37°C por 1h para que pudessem aderir. Em seguida, foram fixadas por 10 minutos com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS 10mM e mantidas sob refrigeração a 4°C por até 3 dias, para posterior processamento imunocitoquímico.

4.7. Análise da sinalização de IL-1 β

Para avaliar se o tratamento com IL-1 β era capaz de ativar sua via de sinalização nas NPCs, devido à ausência de indícios na literatura, lamínulas foram tratadas bromidreto de poli-L-lisina a 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 horas em estufa a 37°C e lavadas repetidamente com água MilliQ estéril. Em seguida, os poços foram tratados com 5 μ g/mL de laminina (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 horas em estufa a 37°C, e lavados repetidamente com PBS estéril. Após tratamento, as neuroesferas foram

dissociadas e plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço e cultivadas em suspensão por 24 horas com exposição a 10ng/mL de IL-1 β . Após este período, o conteúdo dos poços foi coletado e as células foram repetidamente lavadas com solução salina com 20% de sacarose. Em seguida, estas foram ressuspensas em solução de sacarose 20%, plaqueadas sobre as lamínulas previamente tratadas e incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C para que as células aderissem. O sobrenadante foi descartado, as lamínulas foram repetidamente lavadas com PBS e, por fim, fixadas por 10 minutos com paraformaldeído 4%, lavadas novamente e mantidas sob refrigeração a 4°C por até 3 dias, para posterior processamento imunocitoquímico.

4.8. Imunocitoquímica

Após a fixação, as células diferenciadas foram permeabilizadas com Triton X-100 0,3% em temperatura ambiente, e as do ensaio de BrdU com HCl, por 5 minutos a 65°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de soro normal de cabra (NGS) em PBS 10mM por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti β -tubulina de classe III para neurônios (camundongo; 1:200; Sigma, clone SDL.3D10 monoclonal), anti CNPase para oligodendrócitos (camundongo; 1:300; Sigma, clone 11-5B monoclonal), anti GFAP para astrócitos (coelho; 1:40; Abcam, ab7260 policlonal), anti BrdU (rato; 1:100; Abcam, clone BU1/75 (ICR1) monoclonal), anti Nestina (camundongo; 1:100; Millipore, clone rat-401 monoclonal) e anti subunidade p65 de NF- κ B (coelho; 1:100; Santa Cruz, sc-372 policlonal). Após este período, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas a 37°C com os respectivos anticorpos secundários anti-camundongo conjugado com fluoróforo Alexa 488 (1:400; Abcam; A11001), anti-coelho conjugado com fluoróforo Alexa 555 (1:400; Invitrogen; A21428) ou anti-rato conjugado com fluoróforo Alexa 488 (1:200; Invitrogen; A21208), seguido de incubação por 10 minutos no escuro com o corante nuclear Hoescht (1:1000; Sigma; B-2261). Após a última sessão de lavagens com PBS, as lamínulas foram retiradas das placas para montagem das lâminas. Utilizando-se de conta-gotas, foi pingado volume equivalente a 5 μ L de meio de montagem VectaShield (Vector) em lâminas de vidro. Cada lamínula foi posicionada com a face contendo as células virada em direção à lâmina, com o meio de montagem, e todas foram seladas com esmalte para evitar ressecamento. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus IX71, com

câmera digital Olympus DP71, e os tipos celulares foram quantificados através do *software* ImageJ.

4.9. Análise da correlação entre fenótipo de diferenciação e acetilação de histonas

4.9.1. Ensaio de diferenciação

Para este ensaio, placas de 12 poços foram tratadas com bromidreto de poli-L-lisina a 100µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 horas em estufa a 37°C e lavadas repetidamente com água MilliQ estéril. Em seguida, os poços foram tratados com 5µg/mL de laminina (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 horas em estufa a 37°C, e lavados repetidamente com PBS estéril. Após tratamento, as neuroesferas foram dissociadas e plaqueadas na densidade de 1×10^5 células por poço, recebendo meio para neuroesferas com 1% de SFB e os tratamentos TSA 40nM, IL-1β 10ng/mL ou TSA+IL-1β. A diferenciação ocorreu simultânea ao tratamento. Após 5 dias em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂, os poços foram lavados repetidamente com PBS estéril e tratados com solução de tripsina/EDTA por 5 minutos a 37°C. Após leve agitação para soltura das células, a tripsina foi neutralizada por solução salina contendo 4% (m/v) de BSA. O sobrenadante foi recolhido para microtubos e centrifugado a 650g por 10 minutos; o sobrenadante desta centrifugação foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em solução salina contendo 20% de sacarose e passado para placa de 96 poços para posterior processamento para citometria; uma alíquota foi retirada para contagem de células por azul de trypan.

4.9.2. Análise por citometria

Após passagem das amostras para a placa de 96 poços, esta foi centrifugada por 5 minutos a 350g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi fixado em paraformaldeído 2% por 30 minutos, com posteriores lavagens com solução salina contendo 0,2% de saponina e 0,2% de BSA, sempre centrifugando a 350g por 5 minutos entre cada etapa. Após as lavagens, as células foram permeabilizadas por solução salina com saponina 0,2% e BSA 5% por 15 minutos e centrifugadas a 350g por 5 minutos. Para incubação com os anticorpos primários, estes foram diluídos em solução contendo 0,2% de saponina e 0,2% de BSA. As células foram incubadas com anti β-tubulina de classe III para neurônios (camundongo; 1:200; Sigma, clone SDL.3D10 monoclonal) ou anti-CNPase para oligodendrócitos (camundongo; 1:300; Sigma, clone 11-5B monoclonal),

em combinação com anti-H4K8ac (coelho; 1:400; Millipore, policlonal), por 1 hora a 4°C, com posterior lavagem com solução contendo 0,2% de saponina e 0,2% de BSA. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora a 4°C com os anticorpos secundários anti-camundongo conjugado com fluoróforo Alexa 488 (1:400; Abcam; A11001) e anti-coelho conjugado com fluoróforo Alexa 647 (1:1000; Molecular Probes), diluídos em solução contendo 0,2% de saponina e 0,2% de BSA. Por fim, após o ciclo final de lavagens, o precipitado celular foi ressuscitado em PBS para análise em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD), através do *software* FACSDiva; foram coletados 10.000 eventos para cada amostra. Os dados foram analisados através de análise de variância em duas vias (Two-Way ANOVA) e submetidos a análise *post-hoc* de Bonferroni para avaliar se os grupos diferiam entre si, e os valores foram considerados significativos se * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.10. Análise de proliferação por citometria

Para análise de proliferação, neuroesferas foram dissociadas, tratadas com succinimidil 6-carboxifluoresceína éster 5 μ M (CFSE; ThermoFisher Scientific, EUA), corante fluorescente que liga-se ao material proteico da célula e cuja intensidade decai a cada divisão celular, devido à transferência de parte das proteínas para a célula-filha, por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após esse período, o CFSE foi inibido através da adição de solução salina com 4% (m/v) de BSA e as células foram centrifugadas a 350g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado celular ressuscitado em solução de sacarose 20% e novamente centrifugado a 350g por 5 minutos a 4°C, para posterior ressuspensão e contagem de células por azul de trypan em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram plaqueadas em placa de 12 poços na densidade de 10⁵ células/poço com os tratamentos TSA 40nM, IL-1 β 10ng/mL e TSA+ IL-1 β e mantidas por 5 dias em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂; além dos grupos experimentais, foi feito um controle de células não proliferativas, cultivando NPCs em meio para neuroesferas sem fatores de crescimento. Após este período, o conteúdo dos poços foi coletado em microtubos e centrifugado por 5 minutos a 350g, para posterior lavagem com solução de sacarose 20% e nova centrifugação por 5 minutos a 350g. O precipitado celular foi então incubado em banho-maria a 37°C por 4 minutos com solução de tripsina/EDTA para dissociação química e mecânica das neuroesferas, com posterior neutralização enzimática com solução de BSA 4% em salina. As amostras foram

centrifugadas por 10 minutos a 650g e ressuspensas em PBS, para análise em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD), através do *software* FACSDiva; foram coletados 50.000 eventos para cada amostra. Os histogramas (Figura 11) foram posteriormente analisados através do *software* FlowJo (EUA), e os dados de intensidade média de fluorescência submetidos a análise estatística.

4.11. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância One-Way (ANOVA), exceto quando indicado, feita através do *software* GraphPad Prism 7.0 (EUA), e os valores foram considerados significativos se $p < 0,05$; também foi feito pós-teste de Tukey para avaliar se os tratamentos diferiam entre si, e os valores foram considerados significativos se $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

5. Resultados

5.1. O bloqueio da atividade HDAC não altera a viabilidade celular e a taxa de proliferação de NPCs

Inibidores da atividade de HDAC induzem morte celular por apoptose em uma grande variedade de células saudáveis e transformadas (Ungerstedt *et al.*, 2005; Kankaaranta *et al.*, 2010). Para avaliar o efeito do TSA sobre as NPCs, estas foram cultivadas em suspensão em concentrações crescentes de TSA (1-20nM) por 5 dias para análise de viabilidade através do ensaio de MTT (Figura 9). Nenhuma concentração de TSA utilizada provocou alteração significativa na viabilidade celular. Desta forma, prosseguimos para a análise de proliferação através do método de incorporação do BrdU para identificar se a exposição a essas mesmas concentrações de TSA estaria interferindo na capacidade proliferativa das NPCs, mas os resultados também não apresentaram nenhuma significância estatística (Figura 10).

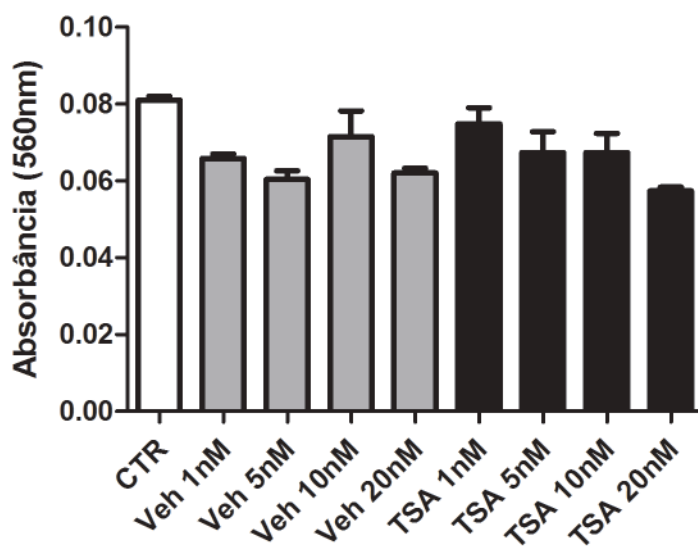


Figura 9 – O bloqueio da atividade HDAC não altera a viabilidade de NPCs: Através deste ensaio, não observamos alteração na viabilidade celular decorrente do tratamento com concentrações crescentes (1-20nM) de TSA. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=6

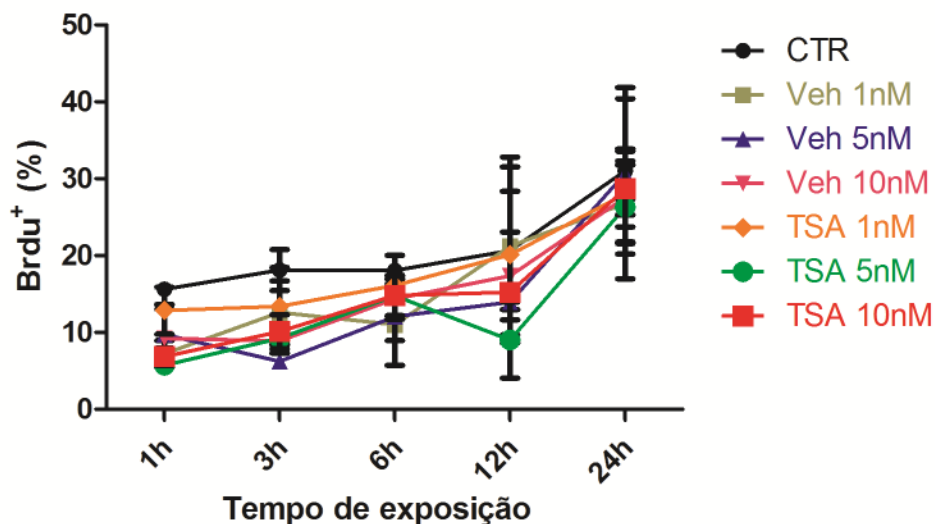


Figura 10 – O bloqueio da atividade HDAC não altera a taxa de proliferação de NPCs: O tratamento com TSA (1-10nM) não interferiu na capacidade proliferativa das NPCs em um período de 24h de exposição ao BrdU, após 5 dias de cultura. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=3

Uma vez que as concentrações testadas não diminuíram a viabilidade e a taxa de proliferação de NPCs, decidimos testar concentrações maiores de TSA. Optamos então pelo ensaio de neuroesferas como metodologia para analisar a proliferação celular. O tratamento com TSA nas diferentes concentrações não provocou nenhuma alteração significativa no diâmetro das neuroesferas (Figura 11). No entanto, foi possível observar, nos grupos tratados 40nM e 80nM TSA, uma quantidade mais variável de neuroesferas por poço (Figura 12), sugerindo que a inibição de atividade HDAC interfere na capacidade de células individuais formarem novas neuroesferas, mas que estas, quando formadas, não são afetadas pelo bloqueio. Além disso, como foi possível detectar significativa redução na atividade mitocondrial em neuroesferas tratadas com altas concentrações de TSA, principalmente a partir de 40nM (Figura 13), optamos por esta concentração como a ideal para trabalho.

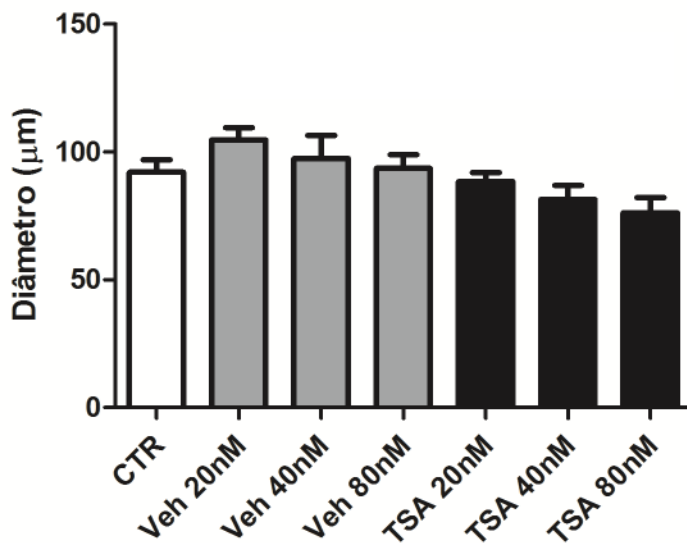


Figura 11 – O bloqueio da atividade HDAC não altera o diâmetro das neuroesferas: Análise de proliferação por ensaio de neuroesferas. O tratamento com concentrações crescentes de TSA (20-80nM) não alterou significativamente o diâmetro das neuroesferas. NPCs foram mantidas em cultura por 7 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=3

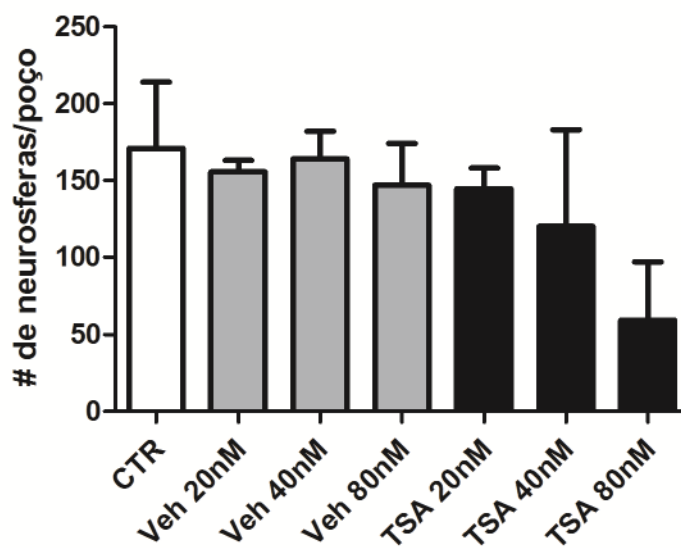


Figura 12 – Análise de proliferação de NPCs por ensaio de neuroesferas. O tratamento com TSA a partir de 40nM não alterou significativamente o total de neuroesferas formadas. NPCs foram mantidas em cultura por 7 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental, feitas em triplicata. CTR: Controle; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=3

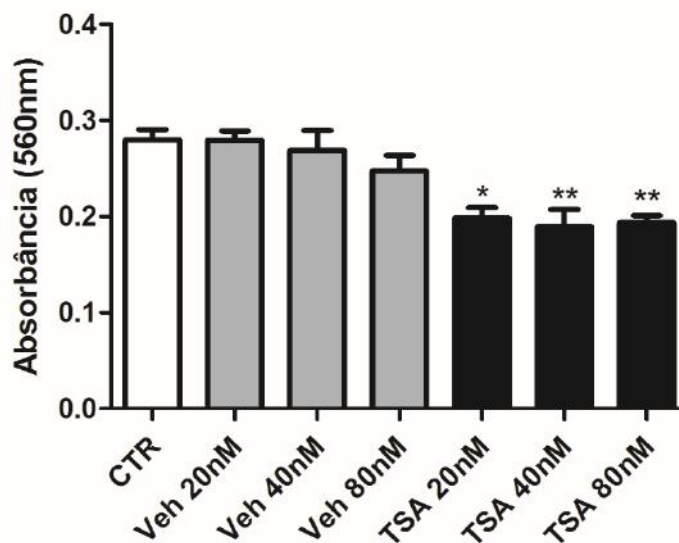


Figura 13 – O bloqueio de HDAC reduziu a viabilidade de neuroesferas. O tratamento com concentrações crescentes de TSA (20-80nM) provocou redução na atividade mitocondrial de NPCs. Estas foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. N=6; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. CTR: Controle; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=6

5.2. IL-1 β não altera a viabilidade de NPCs mas causa redução no diâmetro das neuroesferas

O efeito da IL-1 β sobre as NPCs da V-SVZ ainda é um tanto controverso devido à ausência de trabalhos que mostrem, *in vitro*, a presença do receptor IL-1R1 nas células B e C. Para avaliar se essa citocina provocava alterações na viabilidade celular, inicialmente foi feito o ensaio de MTT utilizando concentrações crescentes desta (1-20ng/mL). No entanto, nenhuma alteração significativa foi vista (Figura 14). Portanto, decidimos testar a concentração 10ng/mL, previamente utilizada na literatura (Crampton *et al.*, 2012). Nesse grupo experimental foi possível observar a alteração significativa do tamanho das neuroesferas (Figura 15), indicando que é possível que a IL-1 β esteja interferindo na capacidade proliferativa das NPCs, sem alterar a viabilidade ou a formação de neuroesferas (Figura 16).

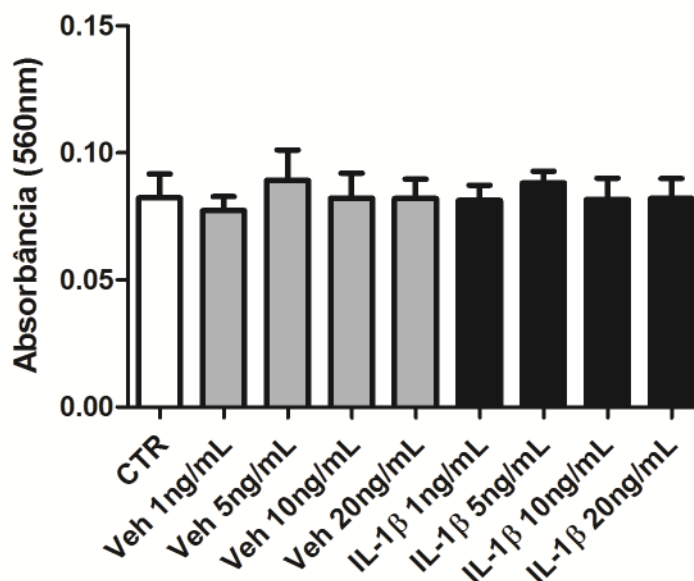


Figura 14 – IL-1 β não altera a viabilidade de NPCs: O tratamento com concentrações crescentes de IL-1 β (1-20ng/mL) não provocou alterações na viabilidade celular. NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; Veh: Veículo. N=6

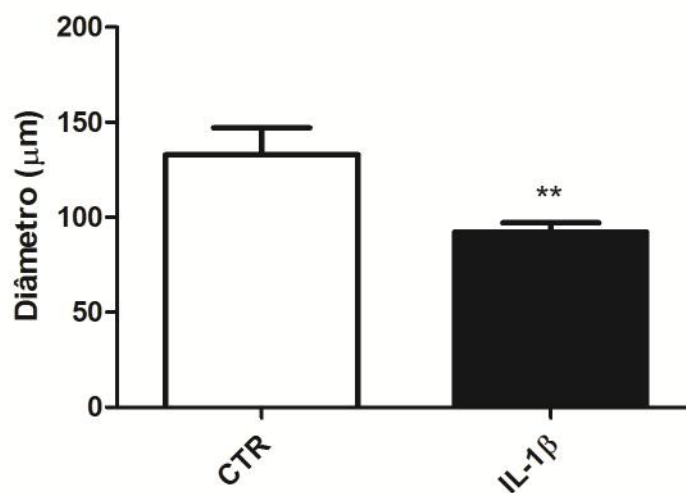


Figura 15 – IL-1 β causa redução no diâmetro das neuroesferas de NPCs: O tratamento com 10ng/mL de IL-1 β interferiu significativamente na proliferação celular. NPCs foram mantidas em cultura por 7 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. ** p <0,01. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β . N=3

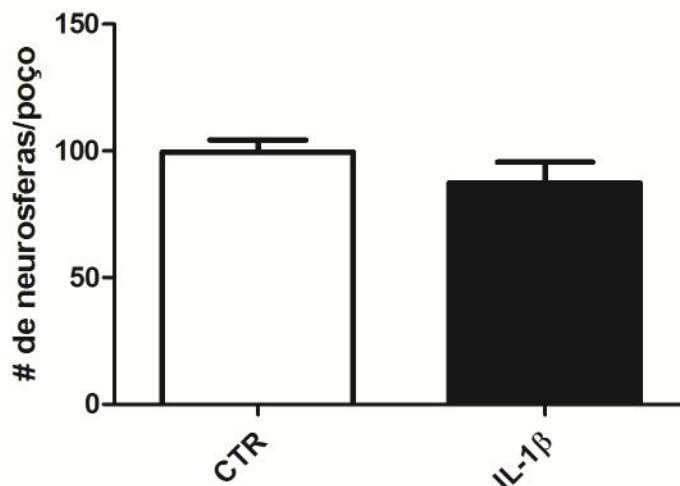


Figura 16 – IL-1 β não altera a capacidade proliferativa de NPCs mas causa redução no diâmetro das neuroesferas. O tratamento com 10ng/mL de IL-1 β não alterou a viabilidade celular. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β . N=3

5.3. Efeito da IL-1 β sobre a viabilidade de NPCs com inibição ou não de atividade de HDAC

Tendo em mente a mencionada capacidade de indução de apoptose induzida tanto por inibidores de HDAC (Ungerstedt *et al.*, 2005; Kankaaranta *et al.*, 2010) quanto pela IL-1 β , decidimos testar se esta citocina e o TSA possuiriam efeito sinérgico ou não através do ensaio de MTT. Após 5 dias de tratamento, o ensaio revelou que, quando tratadas com 40nM de TSA e 10ng/mL de IL-1 β , as NPCs apresentavam redução em sua atividade mitocondrial (Figura 17), indicando que a atividade HDAC é um fenômeno necessário para sobrevivência celular em um ambiente inflamatório. Isso também foi evidenciado através do ensaio de neuroesferas uma vez que, nestas mesmas condições, NPCs cuja atividade HDAC foi inibida e tratadas com IL-1 β não foram capazes de formar novas neuroesferas (Figuras 21 e 22). Portanto, para avaliar se esse efeito era decorrente de interferência no ciclo celular, NPCs foram tratadas com CFSE e mantidas em cultura por 5 dias, e foi visto que o tratamento com TSA 40nM e IL-1 β 10ng/mL diminuiu a taxa de proliferação celular, evidenciado pela não-redução na média de intensidade de fluorescência – uma vez que esta diminui em células proliferativas (Figura 21).

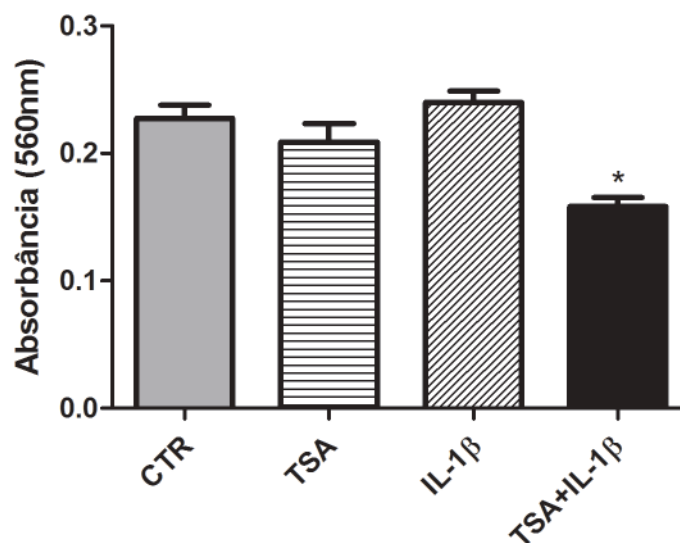


Figura 17 – O bloqueio de HDAC reduziu a viabilidade de neuroesferas tratadas com IL-1 β . O tratamento com 40nM de TSA provocou redução na atividade mitocondrial de NPCs tratadas com IL-1 β 10ng/mL. NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. N=6; *p<0,05. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A.

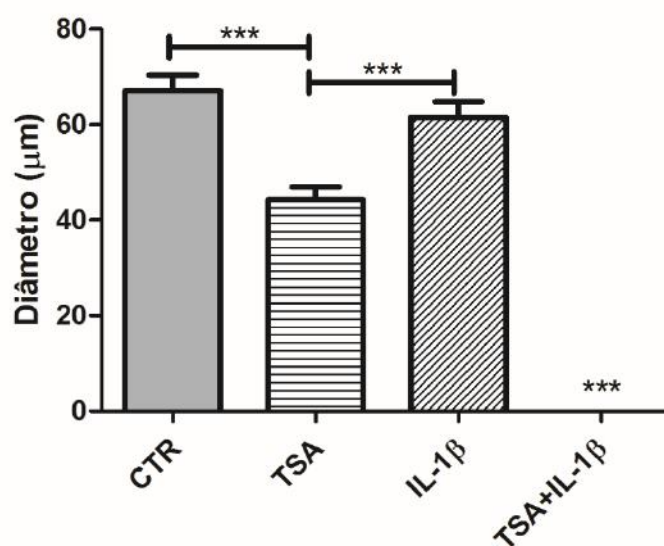


Figura 18 – O bloqueio de HDAC reduziu o diâmetro de neuroesferas tratadas ou não com IL-1 β . O tratamento com 40nM de TSA provocou redução no diâmetro de neuroesferas derivadas de NPCs tratadas ou não com IL-1 β 10ng/mL. NPCs foram mantidas em cultura por 7 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. N=3; ***p<0,001. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A. N=3

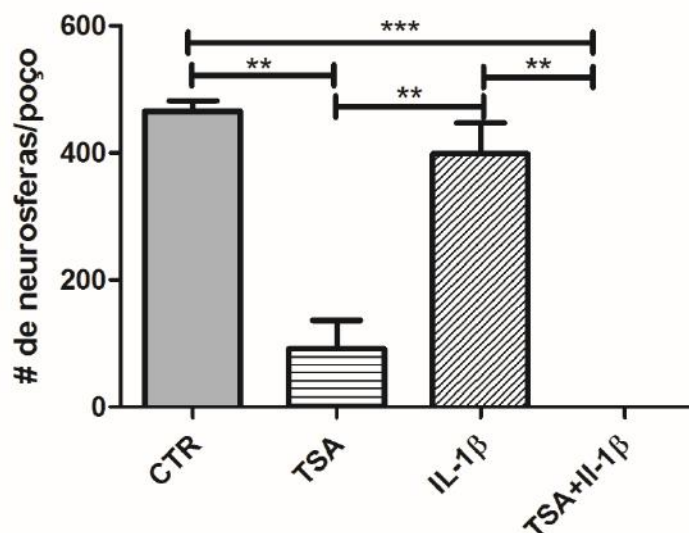


Figura 19 – O bloqueio de HDAC interferiu na capacidade de formação de neuroesferas tratadas ou não com IL-1 β . O tratamento com 40nM de TSA provocou redução na capacidade de de NPCs tratadas ou não com IL-1 β 10ng/mL de formar neuroesferas. NPCs foram mantidas em cultura por 7 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. N=3; **p<0,01; ***p<0,001. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A. N=3

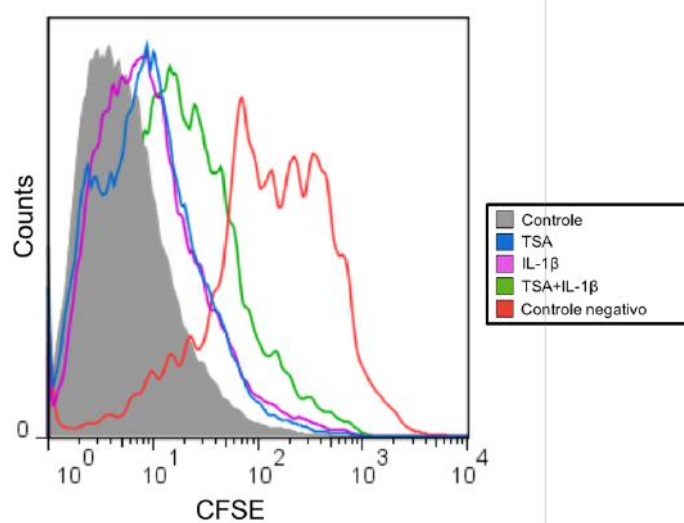


Figura 20 – Histograma representativo da expressão de CFSE em NPCs após o período de cultivo. CFSE: Succinimidil 6-carboxifluoresceína éster; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A.

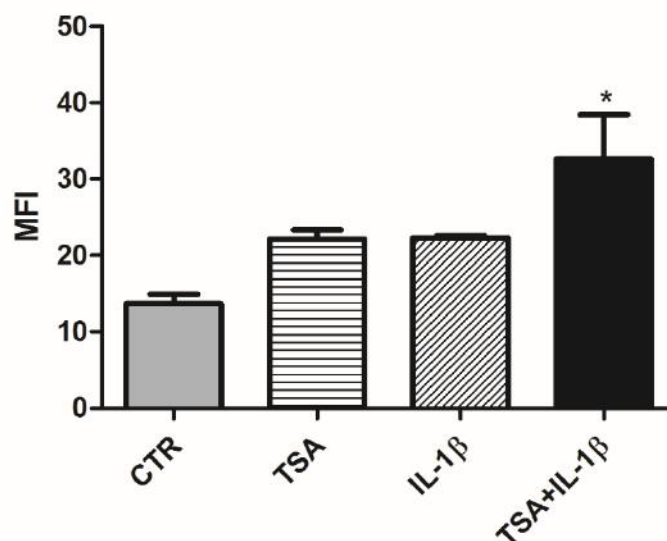


Figura 21 – O bloqueio de HDAC interferiu na capacidade de proliferação de NPCs tratadas com IL-1 β . O tratamento com 40nM de TSA provocou redução na capacidade de de NPCs tratadas com IL-1 β 10ng/mL de proliferar. NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. N=3; *p<0,05. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A. N=3

^aMFI: Média de intensidade de fluorescência

5.4. Efeito da IL-1 β sobre a diferenciação de NPCs com inibição ou não de atividade de HDAC

Tem sido mostrado na literatura que a inibição da atividade HDAC provoca aumento na geração de novos neurônios (Pataskar *et al.*, 2015) associada a uma queda na expressão geral de *GFAP* (Kanski *et al.*, 2014). Já a exposição de NPCs à IL-1 β provoca depleção neuronal (Silva-Vargas, Crouch e Doetsch, 2013; Guadagno *et al.*, 2015) mas estimula oligodendrogênese (Miron, Kuhlmann e Antel, 2011; Patel e Klein, 2011). Assim, considerando-se que o bloqueio da atividade HDAC e o sinal de IL-1 β apresentam efeitos antagônicos na geração de neurônios e glia, decidimos testar se IL-1 β e HDAC atuam no mesmo *branch* de sinalização ou se atuam de forma paralela. Para testar essa hipótese, investigamos os efeitos do tratamento com TSA, IL-1 β , ou a combinação de ambos sobre a diferenciação celular de NPCs *in vitro*. O tratamento com TSA 40nM não reduziu o fenótipo da expressão de GFAP total (Figura 22; Tabela 2), mas aumentou significativamente; a geração de neurônios, em contrapartida, apresentou tendência ao aumento quando células tratadas com IL-1 β tiveram sua atividade HDAC inibida por TSA (Figura 23; Tabela 3). O fenótipo dos oligodendrócitos correspondeu ao esperado,

uma vez que a exposição ao TSA sugeriu tendência à redução de sua geração, o tratamento com IL-1 β aumentou, e o co-tratamento depletou estas células (Figura 24; Tabela 4).

Tabela 2 – Quantificação de células diferenciadas em astrócitos e células totais.

	GFAP ^a	Hoescht
Controle	298	2241
Veículo	385	1925
TSA ^b	865	2086
IL-1 β ^c	474	1711
TSA+IL-1 β	533	1307

^aGFAP: Proteína glial fibrilar ácida

^bTSA: Tricostatina A

^cIL-1 β : Interleucina 1 β

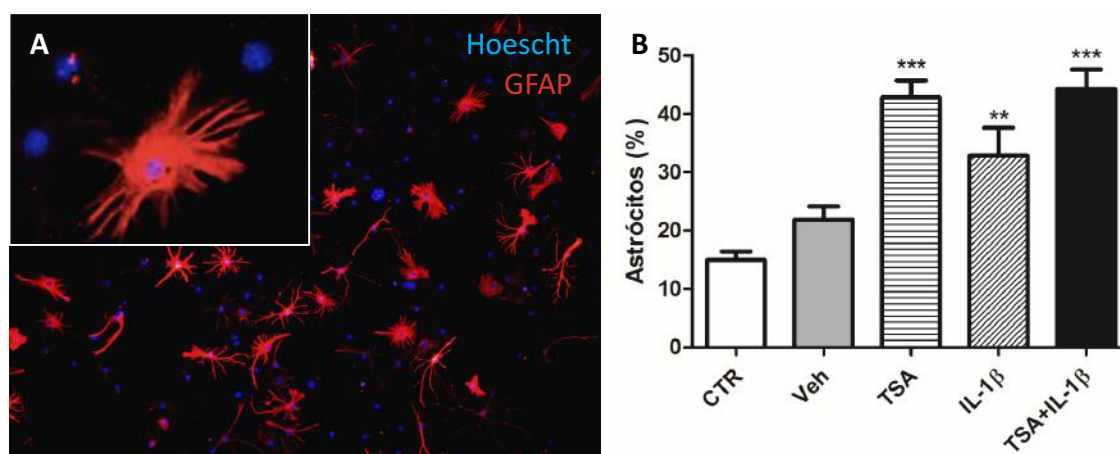


Figura 22 – Quantificação da porcentagem de células diferenciadas em astrócitos. **A.** Astrócitos em vermelho marcados positivamente para GFAP; núcleos corados em azul. **B.** O tratamento com TSA aumentou o total de astrócitos formados em relação ao controle independente da presença de IL-1 β . NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=3

Tabela 3 – Quantificação de células diferenciadas em neurônios e células totais.

	β III-tub ^a	Hoescht
Controle	51	2012
Veículo	22	1339
TSA ^b	9	960
IL-1 β ^c	6	1228
TSA+IL-1 β	36	820

^a β III-tub: β -tubulina de classe III

^bTSA: Tricostatina A

^cIL-1 β : Interleucina 1 β

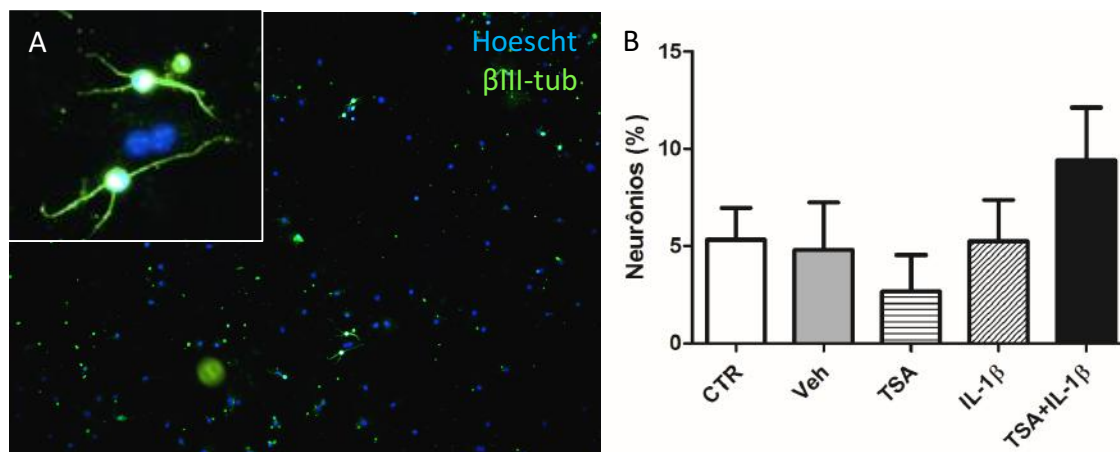


Figura 23 – Quantificação da porcentagem de células diferenciadas em neurônios. **A.** Neurônios em verde marcados positivamente para β -tubulina de classe III; núcleos corados em azul. **B.** O tratamento com IL-1 β ou TSA não interferiu significativamente na diferenciação neuronal. NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=3

Tabela 4 – Quantificação de células diferenciadas em oligodendrócitos e células totais.

	CNPase	Hoescht
Controle	14	2213
Veículo	19	2294
TSA ^a	4	1032
IL-1 β ^b	16	1005
TSA+IL-1 β	0	900

^aTSA: Tricostatina A

^bIL-1 β : Interleucina 1 β

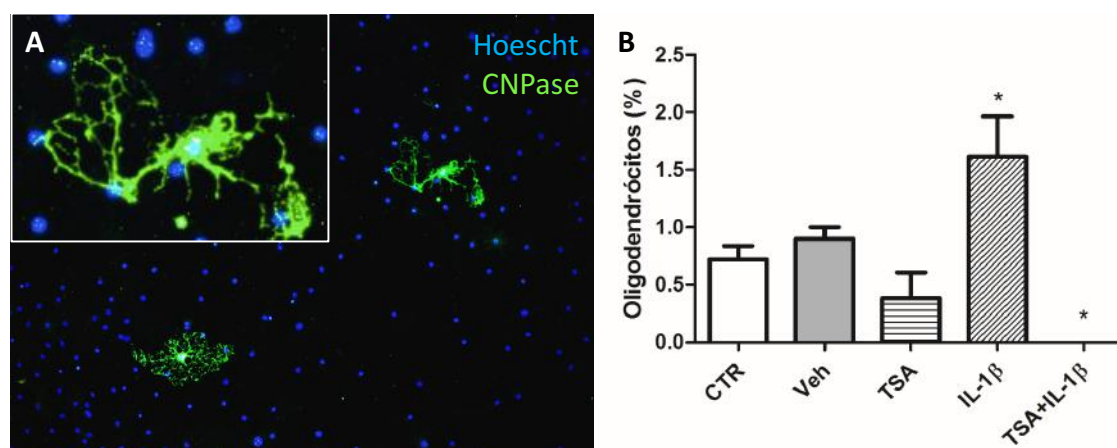


Figura 24 – Quantificação da porcentagem de células diferenciadas em oligodendrócitos. **A.** Oligodendrócitos em verde marcados positivamente para CNPase; núcleos corados em azul. **B.** O tratamento com TSA provavelmente interferiu na capacidade da IL-1 β de aumentar a diferenciação oligodendrocítica. NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. * $p < 0,05$. CTR: Controle; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A; Veh: Veículo. N=3

5.5. Efeito da IL-1 β sobre a acetilação e diferenciação de NPCs com inibição ou não de atividade de HDAC

Após avaliar o fenótipo de diferenciação de NPCs, decidimos avaliar se havia correlação entre este e os níveis de acetilação da lisina 8 de histona H4, uma vez que esta já havia sido descrita previamente como alvo de hiperacetilação após tratamento com IL-1 β (Ito *et al.*, 2000). Portanto, as células foram cultivadas em condições para diferenciação por 5 dias, para posterior marcação imunocitoquímica e leitura em citômetro de fluxo. Este revelou que nenhuma população sofreu hiperacetilação em H4K8, ou alteração no fenótipo de diferenciação em neurônios (Figuras 25 e 26) e oligodendrócitos (Figuras 27 e 28). Devido a uma limitação técnica, não foi possível analisar a população de astrócitos.

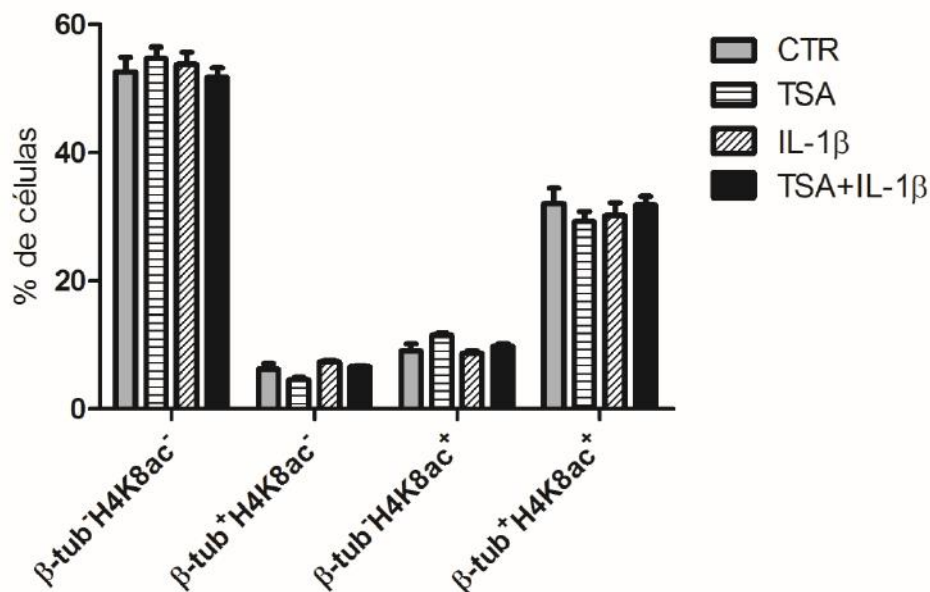


Figura 25 – Quantificação da relação entre acetilação de lisina 8 na histona 4 e a diferenciação neuronal. Os tratamentos não provocaram nenhuma alteração nas populações neuronais mais ou menos acetiladas em H4K8. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. β -tub: β -tubulina de classe III; CTR: Controle; H4K8ac: Acetilação da lisina 8 de histona H4; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A. N=3

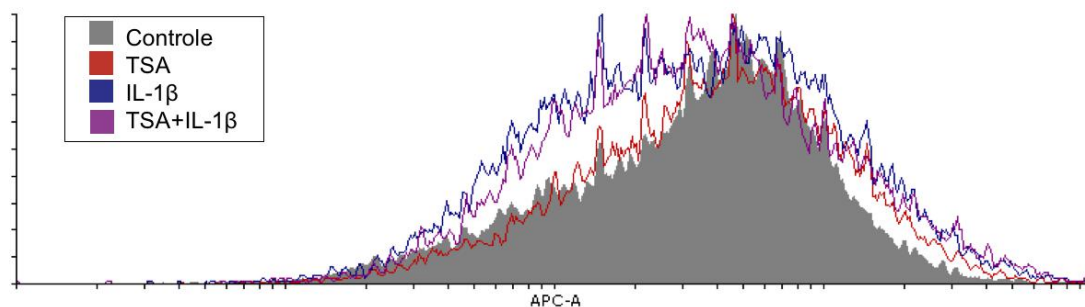


Figura 26 – Histograma representativo da diferenciação neuronal na população H4K8ac⁺, indicado como média da intensidade de fluorescência. IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A.

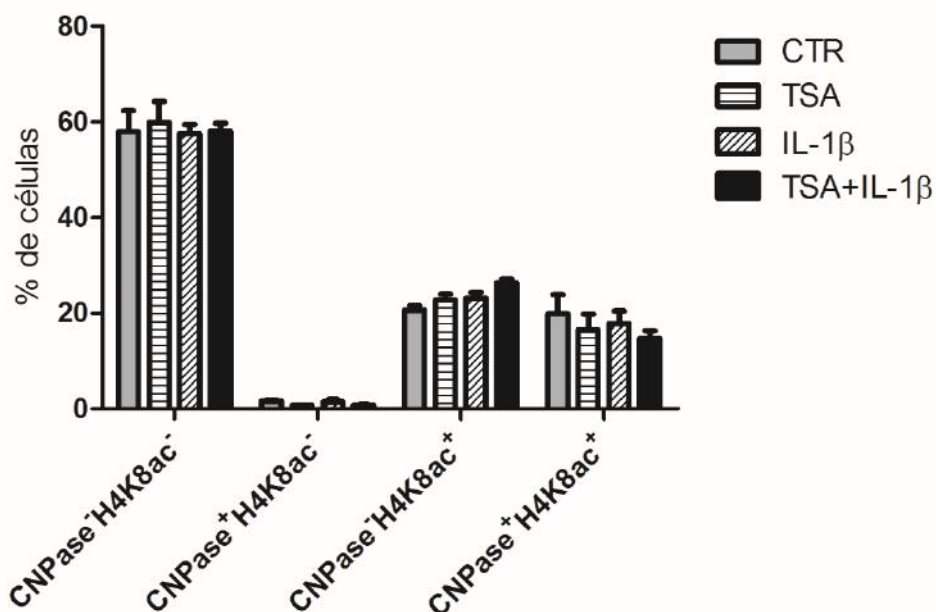


Figura 27 – Quantificação da relação entre acetilação de lisina 8 na histona 4 e a diferenciação oligodendrocítica. Os tratamentos não provocaram nenhuma alteração nas populações de oligodendrócitos mais ou menos acetilados em H4K8. NPCs foram mantidas em cultura por 5 dias. Os dados são representados como as médias \pm SEM e são representativos de cultivos de células de 3 animais distintos em cada condição experimental. CTR: Controle; H4K8ac: Acetilação da lisina 8 de histona H4; IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A. N=3

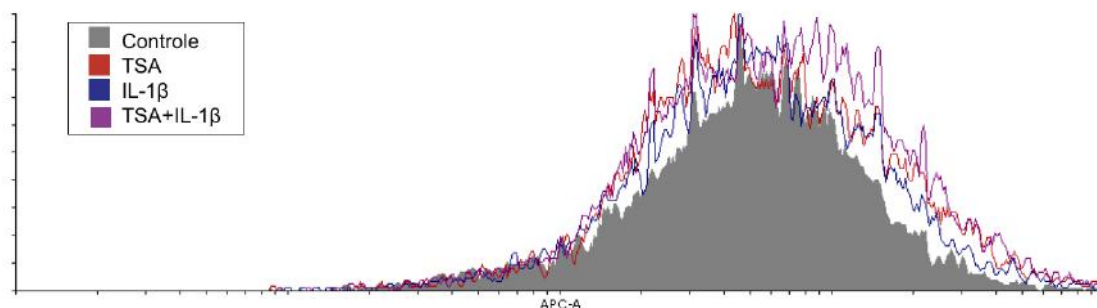


Figura 28 – Histograma representativo da diferenciação oligodendrocítica na população H4K8ac⁺, indicado como média da intensidade de fluorescência. IL-1 β : Interleucina 1 β ; TSA: Tricostatina A.

5.6. IL-1 β é capaz de ativar de forma funcional a sinalização celular por NF- κ B

Devido à escassez de indícios na literatura sobre a presença de IL-1R1 nas NPCs da V-SVZ ou de sua funcionalidade, fez-se necessário avaliar a capacidade destas células de translocarem NF- κ B para o núcleo, uma vez que isso é consequência da cascata de sinalização do receptor de IL-1 (Abbas, Lichtman e Pillai, 2015).

Portanto, para certificação de que os fenótipos observados eram de fato decorrentes da ativação do IL-1R1 pós-tratamento com IL-1 β , foi feita uma imunocitoquímica para NF- κ B, para avaliar de forma qualitativa se sua localização era predominantemente citosólica ou se havia marcação intranuclear. Após 24 horas de tratamento, foi possível

observar a presença de células cujo núcleo apresentava este fator de transcrição, ausente nas células não-tratadas, indicando que os fenótipos eram de fato provocados pela IL-1 β (Figura 29).

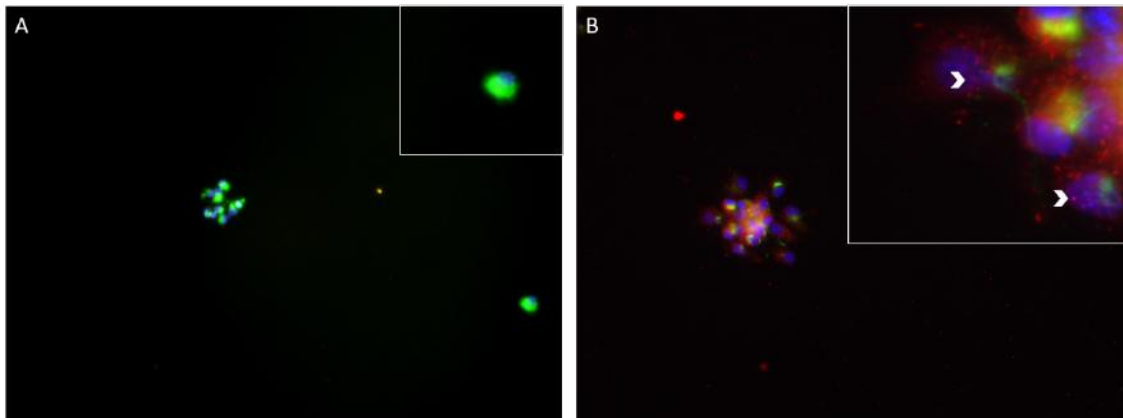


Figura 29 – Imunocitoquímica para células progenitoras. **A.** Células progenitoras em verde marcadas positivamente para Nestina. **B.** NPCs em verde marcadas positivamente em vermelho para NF- κ B. Núcleos corados em azul. Cabeças de seta indicando presença de NF- κ B intranuclear. NPCs foram mantidas em cultura por 24h. Aumento de 20x. N=4

6. Discussão

O fenótipo das células-tronco neurais da V-SVZ é sujeito a alterações decorrentes dos mais diversos fatores – desde extrínsecos, como citocinas ou fatores de crescimento provenientes do sangue, do líquido ou fatores parácrinos, até intrínsecos, como modificações pós-traducionais em histonas ou mecanismos de edição pós-transcricional em mRNA.

Neste trabalho, identificamos inicialmente o efeito da inibição farmacológica da desacetilação de histonas, através de um inibidor pan-HDAC, na viabilidade, sobrevivência e proliferação de NPCs. O tratamento com TSA em concentrações mais baixas não foi capaz de alterar a viabilidade, a proliferação ou a capacidade de formar neuroesferas de NPCs; apenas no espectro mais concentrado de títulos deste fármaco que foi possível observar uma alteração na viabilidade, que pode ter sido provocada por indução de autofagia por ativação de FOXO1 (Zhang *et al.*, 2015), uma das possíveis consequências do tratamento com TSA. Deste modo, o que nos motivou a escolher a concentração de 40nM, a ser usada neste trabalho, foi a redução significativa da viabilidade com relação ao controle, mais efetiva que 20nM, evidenciada pelo ensaio de MTT.

Em seguida, determinamos a concentração ideal de IL-1 β tendo como base 10ng/mL, já usada na literatura (Crampton *et al.*, 2012; Kuzumaki *et al.*, 2010) e concentrações próximas, entre 1ng/mL e 20ng/mL. Como o MTT não revelou nenhuma alteração na viabilidade, submetemos as NPCs a um ensaio de neuroesferas com 10ng/mL da citocina, que indicaria de forma indireta a velocidade do ciclo celular e a responsividade destas células a fatores externos. Os experimentos demonstraram uma redução no diâmetro das neuroesferas, o que é causado por células que não estão proliferando, seja por ciclo celular mais longo, indução de quiescência (Kokovay *et al.*, 2012) ou morte celular (Guadagno *et al.*, 2015), então consideramos que esta era a concentração ideal para trabalho.

Após esta etapa preliminar, avaliamos a relação entre acetilação de histonas, o tratamento com IL-1 β , a viabilidade celular e a proliferação de NPCs. Em outros modelos celulares, TSA já foi descrito como uma droga com uso terapêutico em potencial, já que é capaz de inibir a desacetilação de algumas lisinas de NF- κ B – principal fator de transcrição ativo após o tratamento com IL-1 β – de forma a reprimi-lo (Ziesché *et al.*, 2013). Entretanto, observamos um fenômeno contrário: em vez de minimizar os efeitos provocados pela citocina, a inibição de HDAC teve um efeito mais grave sobre as NPCs.

Estas tiveram proliferação mais lenta, queda na viabilidade e na capacidade de formar neuroesferas, sugerindo que, de algum modo, a desacetilação de histonas é um fenômeno essencial para a sobrevivência e proliferação celular de NPCs num ambiente inflamatório.

Ao analisar o fenótipo de diferenciação, vimos que NPCs tratadas com IL-1 β geravam mais oligodendrócitos de um modo provavelmente dependente de HDAC, já que sua inibição impediu a diferenciação nestas células, evidenciado pela ausência de oligodendrócitos na análise imunocitoquímica de células tratadas com TSA e IL-1 β . Estes dados corroboram outros apresentados na literatura de que a diferenciação destas células é HDAC-dependente (Lilja, Heldrig e Hermanson, 2013) e estimulada por IL-1 β (Miron, Kuhlmann e Antel, 2011; Patel e Klein, 2011). A diferenciação neuronal, por outro lado, não foi alterada em nenhum dos outros tratamentos. O esperado, de acordo com a literatura, era que fosse visto ao menos um aumento na geração de neurônios, já que a inibição de HDAC induz a expressão de diversos fatores hélice-volta-hélice (bHLH) responsáveis por esta via (Hirabayashi e Gotoh, 2010; Castelo-Branco *et al.*, 2014; Pataskar *et al.*, 2015). Por outro lado, não é impossível que o tempo de análise seja um fator limitante: como a inibição prolongada de HDAC provoca morte neuronal (Forgione e Tropepe, 2011), nosso ponto de análise pode estar perdendo neurônios mortos. Uma análise mais precoce, em contrapartida, poderia induzir falsos negativos, devido à presença de células imaturas não reconhecidas pelo anticorpo. Isso poderia ser resolvido com o auxílio de outras técnicas capazes de avaliar esta via de diferenciação, como hibridação *in situ*, capaz de detectar mRNA em células mais ou menos diferenciadas.

A diferenciação de astrócitos apresentou o resultado menos esperado. De acordo com a literatura, a inibição de HDAC deveria diminuir a diferenciação destas células, provocado por uma expressão compensatória de HDAC3 (Kanski *et al.*, 2014). Todavia, isso pode ser explicado porque os modelos são diferentes: enquanto Kanski trabalha com astrocitoma ou NSCs fetais, nós utilizamos NPCs de camundongos adultos, o que justificaria a diferença no comportamento das mesmas. O aumento na diferenciação glial visto no tratamento com IL-1 β pode ter sido provocado pela secreção autócrina/parácrina de IL-6, que induz astrogliose e formação de cicatriz glial em lesões cerebrais (Giulian e Lachman, 1985; Lin *et al.*, 2006). Como a diferenciação de astrócitos após o tratamento com IL-1 β e inibição de HDAC manteve-se alta, é possível que esta via de diferenciação seja dependente não de atividade HDAC, mas sim HAT, de modo que sua inibição provoque um aumento ainda maior na acetilação de histonas.

Contudo, quando foi feita a análise por citometria, não foi possível avaliar a diferenciação de astrócitos por uma limitação técnica: como ambos os anticorpos primários a serem utilizados eram produzidos no mesmo animal, ainda que se usassem anticorpos secundários conjugados a fluoróforos diferentes, o risco de reação cruzada seria muito alto, podendo induzir falsos negativos ou positivos. Deste modo, quantificamos apenas neurônios e oligodendrócitos, e não houve alteração significativa em nenhuma dessas populações ou nos níveis de acetilação.

Isso provavelmente ocorreu devido a uma extrapolação do princípio da incerteza de Heisenberg, segundo o qual ao se determinar com precisão a posição de um elétron, torna-se impossível quantificar seu momentum. O mesmo vale para análise da acetilação de histonas: ao focarmos em um ponto específico com base em evidências da literatura (Ito *et al.*, 2000), H4K8, inevitavelmente deixamos de lado a acetilação de outras lisinas das histonas H3 e H4, que poderiam estar sofrendo alterações mais significativas com nosso tratamento. Se investigássemos níveis globais de acetilação, talvez encontrássemos resultados mais significativos, mas perderíamos em precisão. Portanto, o ideal seria que pudéssemos avaliar tanto os níveis globais quanto o estado de cada lisina, associado a técnicas de imunoprecipitação de cromatina, que nos diriam se essas acetilações ocorrem ou não em regiões promotoras de genes essenciais para as vias de diferenciação de neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. É possível, também, que isso tenha acontecido devido à diferença de paradigmas: o trabalho a partir do qual selecionamos H4K8 não tem nenhuma relação direta com o SNC ou suas células, então as condições altamente diferentes podem ter sido fator impeditivo para a observação de alterações na acetilação.

Estes resultados sugerem a possibilidade de um efeito prejudicial no uso terapêutico de inibidores de HDAC em doenças neurodegenerativas. Por ter característica anti-inflamatória (Kim *et al.*, 2007), o uso desses inibidores pode não só interferir no potencial pró-mielinizante da IL-1 β (Miron, Kuhlmann e Antel, 2011; Patel e Klein, 2011) e provocar morte neuronal (Forgione e Tropepe, 2011), como também provocar sequelas a longo prazo. Não há evidências na literatura sobre consequências neurológicas provocadas pelo uso do TSA, o que nos sugere que nossos dados estão trazendo à tona uma preocupação sem precedentes. Todavia, não descartamos a possibilidade de que estas observações não se reproduzam deste modo *in vivo*, uma vez que em nosso modelo não são levados em conta o microambiente, as diversas citocinas e quimiocinas que são liberadas numa situação inflamatória, dentre outros fatores, que poderiam interferir no fenótipo celular. Deste modo, é fundamental analisar a diferenciação celular em modelo

in vitro – tanto com injeção de IL-1 β e TSA como com indução de inflamação e subsequente tratamento com o inibidor de HDAC – para avaliar se essa depleção é reprodutível no animal e capaz de provocar uma mielinização defectiva.

Por fim, determinamos se os efeitos observados pelo tratamento com IL-1 β eram de fato causados pela citocina, já que as evidências na literatura são conflitantes. Isto foi feito de forma indireta, através da determinação da presença do principal fator de transcrição associado a essa citocina, NF- κ B, no núcleo ou no citoplasma das células. Este foi encontrado apenas em células tratadas com IL-1 β , indicando que possivelmente há uma relação de causalidade entre a citocina e os efeitos observados. Entretanto, não podemos descartar que haja ativação deste fator devido à secreção de alguns fatores, como BDNF ou o fator de crescimento derivado de nervos (NGF), tendo em vista evidências na literatura de que células do SNC são capazes de induzir ativação de NF- κ B através destas moléculas (Snow e Albeni, 2016).

Ao final deste trabalho, algumas questões foram deixadas em aberto. Apesar de sabermos as consequências, não analisamos extensamente suas causas. Conhecemos os efeitos da inibição de HDAC pelo TSA, assim como os efeitos da citocina IL-1 β , na proliferação e na diferenciação de NPCs, mas ainda não foi possível observar se houve alteração na acetilação de resíduos de lisinas nas histonas. Também é necessário avaliar se essas alterações ocorrem em regiões promotoras específicas, e se provocam alteração na expressão de genes relacionados à manutenção da multipotência, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Seria interessante acrescentar dados com relação à migração celular, através de explante da V-SVZ, e à indução de quiescência, através da análise por citometria de diferentes marcadores como Sox2, CD133 e EGFR. Para concluir esta etapa *in vitro*, será necessário identificar a presença de IL-1R1 nas células B, C e A, usando uma combinação de marcadores por citometria, o que solucionaria a discordância da literatura. A longo prazo, será interessante avaliar *in vivo* os parâmetros estudados nesse trabalho, uma vez que a inibição de HDAC é um potencial alvo terapêutico em diversas doenças inflamatórias (Suh *et al.*, 2010; Ziesché *et al.*, 2015; Leus, Zwinderman e Dekker, 2016).

7. Conclusões

- A desacetilação de histonas é um evento necessário para a sobrevivência de NPCs expostas à IL-1 β ;
- NPCs expostas à IL-1 β não são capazes de proliferar sem atividade HDAC;
- A inibição de HDAC é capaz de alterar parcialmente o fenótipo de diferenciação de NPCs expostas à IL-1 β ;
- As alterações fenotípicas observadas não estão relacionadas com alterações nos níveis de H4K8ac;
- NPCs são responsivas à IL-1 β via NF- κ B;
- Deve ser feita nova análise por citometria para quantificar os níveis de acetilação global para avaliar se o TSA está de fato inibindo a desacetilação;
- É necessário avaliar a expressão de genes-mestre dos programas de diferenciação e proliferação celular para corroborar os dados de imunocitoquímica e citometria.

8. Referências:

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. (2015). *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. São Paulo: Elsevier. 552 p.
- Ajmone-Cat, M. A., Cacci, E., Ragazzoni, Y., Minghetti, L. e Biagioni, S. (2010) Pro-gliogenic effect of IL-1 α in the differentiation of embryonic neural precursor cells *in vitro*. *Journal Of Neurochemistry*, [s.l.], v. 113, n. 4, p.1060-1072. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06670.x>.
- Altman, J. (2011). The Discovery of Adult Mammalian Neurogenesis. In: SEKI, Tatsunori et al (Ed.). *Neurogenesis in the Adult Brain I*. Tóquio: Springer. Cap. 1. p. 3-46.
- Altman, J.; Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal Of Comparative Neurology*, [s.l.], v. 124, n. 3, p.319-335. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901240303>.
- Alvarez-Buylla, A. (1992). Neurogenesis and plasticity in the CNS of adult birds. *Experimental Neurology*, [s.l.], v. 115, n. 1, p.110-114. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886\(92\)90232-f](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886(92)90232-f).
- Alvarez-Buylla, A.; Theelen, M.; Nottebohm, F. (1988). Mapping of radial glia and of a new cell type in adult canary brain. *The Journal Of Neuroscience*, NY, v. 8, n. 8, p.2707-2712.
- Alvarez-Buylla, A.; Theelen, M.; Nottebohm, F. (1990). Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron*, [s.l.], v. 5, n. 1, p.101-109. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90038-h](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(90)90038-h).
- Aoi, Y., Nakahama, K., Morita, I. E Safronova, O. (2011) The involvement of DNA and histone methylation in the repression of IL-1 β -induced MCP-1 production by hypoxia. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [s.l.], v. 414, n. 1, p.252-258. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.066>.
- Bátiz, L. F., Castro, M. A., Burgos, P. V., Velásquez, Z. D., Muñoz, R. I., Lafourcade, C. A., Troncoso-Escudero, P., Wyneken, U. (2016). Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, [s.l.], v. 9, n. 501, p.1-28. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00501>.
- Belarbi, K.; Rosi, S. (2013). Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, [s.l.], v. 7, p.1-8. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00145>. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00145/full>>.
- Belenguer, G., Domingo-Muelas, A., Ferrón, S. R., Morante-Redolat, J.M., Fariñas, I. (2016) Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation*, [s.l.], v. 91, n. 4-5, p.28-41. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2016.01.005>.
- Bond, A. M.; Ming, G.; Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, [s.l.], v. 17, n. 4, p.385-395. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.003>.
- Braun, S. M. G.; Jessberger, S. (2014). Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development*, [s.l.], v. 141, n. 10, p.1983-1986. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.104596>.
- Braun, S. M. G.; Jessberger, S. (2014). Review: Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function. *Neuropathol Appl Neurobiol*, [s.l.], v. 40, n. 1, p.3-12. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/nan.12107>.

- Castelo-Branco, G., Lilja, T., Wallenborg, K., Falcão, A.M., Marques, S.C., Gracias, A., Sollum, D., Paap, R., Walfridsson, J., Teixeira, A.I., Rosenfeld, M.G., Jepsen, K., Hermanson, O. (2014). Neural Stem Cell Differentiation Is Dictated by Distinct Actions of Nuclear Receptor Corepressors and Histone Deacetylases. *Stem Cell Reports*, [s.l.], v. 3, n. 3, p.502-515. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.07.008>.
- Cocucci, E.; Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends In Cell Biology*, [s.l.], v. 25, n. 6, p.364-372. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.
- Dodega, P., Silva-Vargas, V.; Paul, A.; Maldonado-Soto, A.R.; De Leo, A.M.; Pastrana, E.; Doetsch, F.. (2014) Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*, [s.l.], v. 82, n. 3, p.545-559. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.039>.
- Deichmann, U. (2016). Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Developmental Biology*, [s.l.], p.1-20. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.005>.
- Díaz-Guerra, E., Pignatelli, J., Nieto-Estévez, V. E Vicario-Abejón, C. (2013). Transcriptional Regulation of Olfactory Bulb Neurogenesis. *Anat. Rec.*, [s.l.], v. 296, n. 9, p.1364-1382. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.22733>.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell*, [s.l.], v. 97, n. 6, p.703-716. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80783-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80783-7).
- Doetsch, F.; Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, [s.i.], v. 25, n. 93, p.14895-14900.
- Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience* 17: 5046–5061.
- Escaffre, O.; Borisevich, V.; Rockx, B. (2013). Pathogenesis of Hendra and Nipah virus infection in humans. *J Infect Dev Ctries*, [s.l.], v. 7, n. 04, p.308-311. *Journal of Infection in Developing Countries*. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.3648>.
- Faigle, R.; Song, H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects*, [s.l.], v. 1830, n. 2, p.2435-2448. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.002>.
- Fenlon, L. R, Liu, S., Gobius, I., Kurniawan, N.D., Murphy, S., Moldrich, R.X., Richards, L.J. (2015) Formation of functional areas in the cerebral cortex is disrupted in a mouse model of autism spectrum disorder. *Neural Dev*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-14, 3. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/s13064-015-0033-y>.
- Forgione, N.; Tropepe, V. (2011) Histone deacetylase inhibition promotes Caspase-independent cell death of ventral midbrain neurons. *Molecular And Cellular Neuroscience*, [s.l.], v. 48, n. 2, p.117-128. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2011.06.012>.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., E Alvarez-Buylla, A. (2015) Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, [s.l.], v. 161, n. 7, p.1644-1655. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.041>
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., Gotoh, Y. (2015) Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, [s.l.], v. 18, n. 5, p.657-665. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3989>.
- Gallagher, D., Norman, A.A., Woodard, C.L., Yang, G., Gauthier-Fisher, A., Fujitani, M., Vessey, J.P., Cancino, G.I., Sachewsky, N., Woltjen, K., Fatt, M.P., Morshead, C.M., Kaplan, D.R., Miller, F.D. (2013) Transient Maternal IL-6 Mediates Long-Lasting Changes in Neural Stem Cell Pools by Dereglulating an Endogenous Self-Renewal Pathway. *Cell Stem Cell*, [s.l.], v. 13, n. 5, p.564-576. Elsevier BV. [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Stem.2013.10.002](http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Stem.2013.10.002).

García-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A., Alvarez-Buylla, A. (1998) Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Journal Of Neurobiology*, [s.i.], v. 2, n. 36, p.234-248.

Giulian, D.; Lachman, L. (1985). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science*, [s.l.], v. 228, n. 4698, p.497-499. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.3872478>.

Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience*, [s.l.], v. 226, p.270-281, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.053>.

Guadagno J, Swan P, Shaikh R, Cregan S P. (2015) Microglia-derived IL-1 β triggers p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis in neural precursor cells. *Cell Death Dis*, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1-10. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.151>.

Han, D. W., Do, J. T., Araúzo-Bravo, M. J., Lee, S. H., Meissner, A., Lee, H. T., Jaenisch, R. and Schöler, H. R. (2009) Epigenetic Hierarchy Governing Nestin Expression. *Stem Cells*, [s.l.], v. 27, n. 5, p.1088-1097. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.43>.

Han, S.B. & Lee, J.K. (2009) Anti-inflammatory effect of Trichostatin-A on murine bone marrow-derived macrophages. *Arch. Pharm. Res.* 32: 613. doi:10.1007/s12272-009-1418-4

Harrison, I.F.; Dexter, D.T. (2013) Epigenetic targeting of histone deacetylase: Therapeutic potential in Parkinson's disease?. *Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 140, n. 1, p.34-5. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.010>.

Haseeb, A.; Makki, M.S.; Haqqi, T.M. (2014). Modulation of Ten-Eleven Translocation 1 (TET1), Isocitrate Dehydrogenase (IDH) Expression, α -Ketoglutarate (α -KG), and DNA Hydroxymethylation Levels by Interleukin-1 β in Primary Human Chondrocytes. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 289, n. 10, p.6877-6885. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m113.512269>.

Hirabayashi, Y.; Gotoh, Y. (2010) Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nature Reviews Neuroscience*, [s.l.], v. 11, n. 6, p.377-388. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2810>.

Hong, S.; Dissing-Olesen, L.; Stevens, B. (2016) New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current Opinion In Neurobiology*, [s.l.], v. 36, p.128-134. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2015.12.004>.

Horgusluoglu E, Nudelman K, Nho K, Saykin AJ. (2016) Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *Am. J. Med. Genet.*, [s.l.], p.1-20. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.32429>.

Ihrle, R.A.; Álvarez-Buylla, A. (2011) Lake-Front Property: A Unique Germinal Niche by the Lateral Ventricles of the Adult Brain. *Neuron*, [s.l.], v. 70, n. 4, p.674-686. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.004>.

Ito, K.; Barnes, P. J.; Adcock, I. M. (2000). Glucocorticoid Receptor Recruitment of Histone Deacetylase 2 Inhibits Interleukin-1 β -Induced Histone H4 Acetylation on Lysines 8 and 12. *Molecular And Cellular Biology*, [s.l.], v. 20, n. 18, p.6891-6903. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.20.18.6891-6903.2000>.

Jawerka, M., Colak, D., Dimou, L., Spiller, C., Lager, S., Montgomery, R.L., Olson, E.N., Wurst, W., Göttlicher, M. e Götz, M. (2010) The specific role of histone deacetylase 2 in adult neurogenesis. *Neuron Glia Biol.*, [s.l.], v. 6, n. 02, p.93-107. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1740925x10000049>.

Kanski, R., Sneboer, M.A., van Bodegraven, E.J., Sluijs, J.A., Kropff, W., Vermunt, M.W., Creighton, M.P., De Filippis, L., Vescovi, A., Aronica, E., van Tijn, P., van Strien, M.E., Hol, E.M. (2014) Histone acetylation in astrocytes suppresses GFAP and stimulates a reorganization of the intermediate filament network. *Journal Of Cell Science*, [s.l.], v. 127, n. 20, p.4368-4380. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.145912>.

- Kim H. J., Rowe M., Ren M., Hong J. S., Chen P. S., Chuang D. M. (2007) Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 892–901
- Kohman, R.A.; Rhodes, J.S. (2013). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, And Immunity*, [s.l.], v. 27, n. 1, p.22-32. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.003>.
- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., Temple, S. (2012) VCAM1 Is Essential to Maintain the Structure of the SVZ Niche and Acts as an Environmental Sensor to Regulate SVZ Lineage Progression. *Cell Stem Cell*, [s.l.], v. 11, n. 2, p.220-230. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.016>.
- Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-Modifying Enzymes. *Cell*, [s.l.], v. 131, n. 4, p.822-822. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.005>.
- Kriegstein, A.; Alvarez-Buylla, A. (2009) The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.*, [s.l.], v. 32, n. 1, p.149-184. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>.
- Kuzumaki, N., Ikegami, D., Imai, S., Narita, M., Tamura, R., Yajima, M., Suzuki, A., Miyashita, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., Ushijima, T., Suzuki, T. e Narita, M. (2010) Enhanced IL-1 β Production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Synapse*, [s.l.], v. 9, n. 64, p.721-728. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/syn.20800>.
- Lamm, O., Ganz, J., Melamed, E. e Offen, D.. (2014) Harnessing neurogenesis for the possible treatment of Parkinson's disease. *Journal Of Comparative Neurology*, [s.l.], v. 522, n. 12, p.2817-2830. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23607>.
- Lampron, A.; Pimentel-Coelho, P.M.; Rivest, S. (2013). Migration of bone marrow-derived cells into the CNS in models of neurodegeneration. *Journal Of Comparative Neurology*, [s.l.], v. 17, n. 521, p.3863-3876. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23363>.
- Leus, N.G.J.; Zwinderman, M.R.H.; Dekker, Fj. (2016) Histone deacetylase 3 (HDAC 3) as emerging drug target in NF- κ B-mediated inflammation. *Current Opinion In Chemical Biology*, [s.l.], v. 33, p.160-168. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.019>.
- Li, X.; Bao, X.; Wang, R. (2016) Neurogenesis-based epigenetic therapeutics for Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, [s.l.], v. 14, n. 2, p.1043-1053. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5390>.
- Lilja, T.; Heldring, N.; Hermanson, O. (2013). Like a rolling histone: Epigenetic regulation of neural stem cells and brain development by factors controlling histone acetylation and methylation. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects*, [s.l.], v. 1830, n. 2, p.2354-2360. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.011>.
- Lim, DA.; Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-33. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>.
- Lin, H. W., Basu, A., Druckman, C., Cicchese, M., Krady, J. K., e Levison, S. W (2006) Astrogliosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *Journal Of Neuroinflammation*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.3-15. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-3-15>.
- Llorens-Bobadilla, E.; Zhao, S.; Baser, A.; Saiz-Castro, G.; Zwadlo, K.; Martin-Villalba, A. (2015) Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, [s.l.], v. 17, n. 3, p.329-340. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002>.
- Marcuzzo, S., Bonnano, S., Kapetis, D., Barzago, C., Cavalante, P., D'Alessandro, S., Mantegazza, R., Bernasconi, P. (2015) Up-regulation of neural and cell cycle-related microRNAs in brain of amyotrophic lateral sclerosis mice at late disease stage. *Molecular Brain*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-13. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/s13041-015-0095-0>.
- Markovics J. A., Araya J., Cambier S., Somanath S., Gline S., Jablons D., Hill A., Wolters P. J., Nishimura S. L. (2011) Interleukin-1 β Induces Increased Transcriptional Activation of the Transforming Growth Factor- β -activating Integrin Subunit 8 through Altering Chromatin

- Architecture. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 286, n. 42, p.36864-36874. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.276790>.
- McPherson, C.A.; Aoyama, M.; Harry, G.J. (2011). Interleukin (IL)-1 and IL-6 regulation of neural progenitor cell proliferation with hippocampal injury: Differential regulatory pathways in the subgranular zone (SGZ) of the adolescent and mature mouse brain. *Brain, Behavior, And Immunity*, [s.l.], v. 25, n. 5, p.850-862. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.003>.
- Merkle, F. T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 101, n. 50, p.17528-17532. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407893101>.
- Miron, V.E.; Kuhlmann, T; Antel, J.P. (2011) Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease*, [s.l.], v. 1812, n. 2, p.184-193. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.010>.
- Morshead, C.M; Kooy, D. vD. (2004). Disguising adult neural stem cells. *Current Opinion In Neurobiology*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.125-131. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.008>.
- Pastrana, E.; Silva-Vargas, V.; Doetsch, F. (2011). Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell*, [s.l.], v. 8, n. 5, p.486-498. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007>.
- Pataskar, A., Jung, J., Smialowski, P., Noack, F., Calegari, F., Straub, T., Tiwari, V.K. (2015). NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *The Embo Journal*, [s.l.], v. 35, n. 1, p.24-45, 29. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/embj.201591206>.
- Patel, J.R.; Klein, R.S. (2011). Mediators of oligodendrocyte differentiation during remyelination. *Febs Letters*, [s.l.], v. 585, n. 23, p.3730-3737. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.037>.
- Pierce, B.A. (2005). *Genetics: A Conceptual Approach*. New York: W.h. Freeman. 711 p.
- Purves, D. (2011) *Neuroscience*. 5. ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 858 p.
- Qiao, Y., Wang, R., Yang, X., Tang, K., Jing, N. (2014) Dual Roles of Histone H3 Lysine 9 Acetylation in Human Embryonic Stem Cell Pluripotency and Neural Differentiation. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 290, n. 4, p.2508-2520. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m114.603761>.
- Resendiz, M., Mason, S., Lo, C., Zhou, F.C. (2014) Epigenetic regulation of the neural transcriptome and alcohol interference during development. *Front. Genet.*, [s.l.], v. 5, n. 285, p.1-15. *Frontiers Media SA*. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00285>.
- Roche, J.; Bertrand, P. (2016) Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 121, p.451-483. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.047>.
- Rodd, A.L.; Ververis, K.; Karagiannis, T.C. (2012). Current and Emerging Therapeutics for Cutaneous T-Cell Lymphoma: Histone Deacetylase Inhibitors. *Lymphoma*, [s.l.], v. 2012, p.1-10. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/290685>.
- Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp, S., van Kuilenberg, ABP. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.*, [s.l.], v. 370, n. 3, p.737-749. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20021321>.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. (2003) Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science*, [s.l.], v. 301, n. 5634, p.805-809. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1083328>.
- Schuebel, K., Gitik, M., Domschke, K., Goldman, D. (2016) Making Sense of Epigenetics. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, [s.l.], p.1-28. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/pyw058>.
- Schuermann, D.; Weber, A.R.; Schär, P. (2016) Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *Dna Repair*, [s.l.], p.1-30. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.013>.

- Segain JP, , Raingeard, de la, Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut* 47(3):397–403.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S. and Alvarez-Buylla, A.. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal Of Comparative Neurology*, [s.l.], v. 478, n. 4, p.359-378. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20288>.
- Shakespeare, M.R., Halili, M.A., Irvine, K.M., Fairlie, D.P., Sweet, M.J. (2011) Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends in Immunology*, 32 (7), pp. 335-343. doi: 10.1016/j.it.2011.04.001
- Silva-Vargas, V.; Crouch, E; Doetsch, F. (2013) Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current Opinion In Neurobiology*, [s.l.], v. 23, n. 6, p.935-942. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.004>.
- Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (2005) Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *Journal Of Neuroscience*, [s.l.], v. 25, n. 1, p.10-18. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1108-04.2005>.
- Suh, HS., Choi, S., Khattar, P., Choi, N., Lee, S.C. (2010) Histone Deacetylase Inhibitors Suppress the Expression of Inflammatory and Innate Immune Response Genes in Human Microglia and Astrocytes. *Journal Of Neuroimmune Pharmacology*, [s.l.], v. 5, n. 4, p.521-532. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-010-9192-0>.
- Tao, Y., Ruan, H., Guo, X., Li, L., Shen, W. (2015) HDAC1 Regulates the Proliferation of Radial Glial Cells in the Developing Xenopus Tectum. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 3, p.1-19. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120118>.
- Tiper, I.V. & Webb, T.J. (2016) Histone deacetylase inhibitors enhance CD1d-dependent NKT cell responses to lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 65: 1411. doi:10.1007/s00262-016-1900-z
- Tong, C.K.; Alvarez-Buylla, A. (2014). SnapShot: Adult Neurogenesis in the V-SVZ. *Neuron*, [s.l.], v. 81, n. 1, p.220-220. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.004>
- Vincent, A.; van Seuningen, I. (2009) Epigenetics, stem cells and epithelial cell fate. *Differentiation*, [s.l.], v. 78, n. 2-3, p.99-107. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2009.07.002>.
- Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., Gong, Z., Wang, Q., Huang, J., Tang, C., Zou, T., Yin, P. (2016) Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature*, [s.l.], v. 534, n. 7608, p.575-578. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18298>.
- Wu, M.D., Hein, A.M., Moravan, M.J., Shaftel, S.S., Olschowka, J.A., O'Banion, M.K. (2012) Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1 β and not rescued by voluntary running. *Brain, Behavior, And Immunity*, [s.l.], v. 26, n. 2, p.292-300. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.09.012>.
- Yao, B., Christian, K., He, C., Jin, P., Ming, G., Song, H. (2016) Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, [s.l.]. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.70>.
- Zhang J, Ng S, Wang J, Zhou J, Tan S-H, Yang N, Lin Q, Xia D & Shen H-M. (2015) Histone deacetylase inhibitors induce autophagy through FOXO1-dependent pathways. *Autophagy*, [s.l.], v. 11, n. 4, p.629-642. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1023981>.
- Zhou Q, Dalgard CL, Wynder C, Doughty ML. (2011) Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells. *Bmc Neuroscience*, [s.l.], v. 12, n. 50, p.1-11. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-12-50>.