

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**A sinalização redox na diferenciação de  
células estaminais neurais**

**Luís Carlos Ribeiro Soares**

Monografia orientada pelo Professor Doutor Vasco Rui Veloso Neves  
Branco, Professor Assistente Convidado.

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2021**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**A sinalização redox na diferenciação de  
células estaminais neurais**

**Luís Carlos Ribeiro Soares**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pelo Professor Doutor Vasco Rui Veloso Neves  
Branco, Professor Assistente Convidado.

**2021**





## Resumo

A diferenciação de células estaminais neurais (NSCs) é um tema atual de extrema pertinência da a potencial aplicação destas células no tratamento de várias patologias, nomeadamente nas doenças neurodegenerativas. Este trabalho, faz uma revisão da forma como espécies reativas de oxigénio (ROS), tendencialmente associadas a disfunção celular, incluindo toxicidade neuronal e neurodegeneração, influenciam a determinação da linhagem celular a que as NSC irão dar origem. As ROS, através de reações redução-oxidação, modulam a função de várias proteínas e enzimas e definem aspetos-chave relativamente aos processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência através da oxidação de resíduos redox sensíveis, principalmente cisteína, selenocisteína e metionina. Os níveis de ROS variam de forma intercompartimental no meio intracelular e de forma intercelular pelo que é de antever que consoante a sua localização afetem variadas vias de transdução de sinal. A célula controla o seu ambiente redox, nomeadamente recorrendo à maquinaria antioxidante, regulada através do fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) e as várias alterações morfológicas e dinâmicas na mitocôndria culminam na produção de ROS e influenciam a diferenciação celular. As principais fontes de ROS são a mitocôndria e as NADPH oxidases (NOXs). As últimas são enzimas tendencialmente situadas na membrana celular e, na presença de um estímulo, nomeadamente a presença de fator de crescimento epidérmico (EGF), produzem ROS. Estes, modulam a neurogênese promovendo a diferenciação de NSCs através da via PTEN/PI3K/Akt com inativação oxidativa de PTEN ou através de p53. Os níveis de ROS podem ainda modular a astrogliogénese ou a oligodendrogénese. A primeira depende dos níveis de p53, que ao estarem associados à massa e oxidação mitocondrial, vão alterar os níveis de DNA mitocondrial (mtDNA) danificado – que quando alto, fará a célula seguir astrogliogénese. De seguida, a oligodendrogénese é modulada através de PKC que é o indutor central de diferenciação e está presente tanto a montante dos ROS, como a jusante ao ser ativado por ROS. Desta forma, é gerado um feedback positivo que induz uma fosforilação contínua da cinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) e a ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), resultando no aparecimento de marcadores de diferenciação MBP e Olig-2. Assim, os ROS influenciam de forma determinante tanto a linhagem glial como neural.

**Palavras-chave:** ROS; Nrf2; NSCs; redox; PTEN

## Abstract

The differentiation of neural stem cells (NSCs) is a topic of extreme relevance. In this work, we studied the way in which reactive oxygen species (ROS), which tend to be associated with cell dysfunction, including neuronal toxicity and neurodegeneration, influence the neural cell lineage. ROS, through reduction-oxidation reactions, modulate the function of several proteins and enzymes and define key aspects regarding the processes of differentiation, proliferation and survival through the oxidation of redox sensitive residues, mainly cysteine, selenocysteine and methionine. ROS levels vary between compartments in the intracellular environment and intercellularly, so it is foreseeable that, depending on their location, they affect various signal transduction pathways.

The way in which the cell controls its redox environment is discussed, namely using its antioxidant machinery, regulated by the nuclear erythroid factor 2 related to factor 2 (Nrf2) and the various morphological and mitochondrial dynamic changes that culminate in the production of ROS and influence cell differentiation. In addition to mitochondria ROS production, there are NADPH oxidases (NOXs), which are enzymes that tend to be located in the cell membrane and in the presence of a stimulus, namely the presence of epidermal growth factor (EGF), produce ROS. These modulate neurogenesis by promoting the differentiation of NSCs through the PTEN/PI3K/Akt pathway with the oxidative inactivation of PTEN or through p53. ROS levels can also modulate astroglialogenesis or oligodendrogenesis. The first depends on p53 levels which, when associated with mitochondrial mass and oxidation, will alter the levels of damaged mitochondrial DNA (mtDNA) – which when higher, will make the cell follow astroglialogenesis. Oligodendrogenesis is modulated through PKC, which is the central inducer of differentiation and is present both upstream of ROS and downstream when activated by ROS. In this way, a positive feedback is generated that induces a continuous phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and the activation of cAMP response element binding protein (CREB), resulting in the appearance of markers of differentiation MBP and Olig-2. Thus, ROS can influence and determine NSCs lineage and fate.

**Keywords:** ROS; Nrf2; NSCs; redox; PTEN

# Agradecimentos

Quero agradecer a todos os que tornaram possível a realização deste curso.

Aos meus pais: quero agradecer-vos o esforço megalómano que tiveram de fazer para que eu pudesse estudar e ser alguém. Obrigado do fundo do meu coração.

A ti mãe, obrigado pelos teus discursos de motivação e pelas vezes em que partilhavas as minhas alegrias e tristezas do curso.

A ti Andreia, pela importância que tens. Acompanhaste-me neste percurso quase desde início, foste o meu poço de motivação naquelas horas tardias, sem ti não seria possível.

À minha família, pelo carinho e compreensão.

Aos meus colegas de faculdade, que me ajudaram durante o caminho e tornaram todo este caminho mais fácil.

Por fim, estou grato por estar a chegar ao fim deste percurso, sinuoso, repleto de alegrias e tristezas, muitos sacrifícios, mas acima de tudo a certeza que fiz sempre tudo o que estava ao meu alcance. Cheguei à meta.

Obrigado



# Abreviaturas

ARE – Elemento de resposta antioxidante

Cys – Cisteína

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EPRE – Elemento responsivo eletrófilo

GFAP – Proteína fibrilar ácida da glia

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

HIF1 – Fator induzível por hipóxia 1 $\alpha$

LIF – Fator inibidor de leucemia

Met – Metionina

Msr – Metionina sulfoxidoreductase

mPTP – Poro de permeabilidade mitocondrial

NOX – NADPH oxidase

Nrf2 - Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

NSCs – Célula estaminal neural

NPSC – Células estaminais neurais progenitoras

Oct4 – Fator de transcrição associado à pluripotência

Oxphos – Fosforilação oxidativa

Pigs – Genes indutíveis por p53

NCAM – Molécula de adesão associada à célula estaminal

RMS – Fluxo migratório rostral

SGZ – Zona subgranular

SOX2 – (Região determinante de sexo Y)-box2

SVZ – Zona subventricular

TIGAR - Glicólise induzida por TP53 e regulador de apoptose

VZ – Zona ventricular

## Índice:

1	Objetivo.....	11
2	Materiais e Métodos.....	12
3	Células estaminais neurais .....	13
3.1	Zona Subventricular (SVZ).....	13
3.2	Zona subgranular (SGZ) .....	16
4	ROS, <i>stress</i> oxidativo e diferenciação .....	18
4.1	ROS.....	18
4.1.1	Perspetiva histórica .....	19
4.2	Stress oxidativo .....	19
4.3	Sinalização celular .....	22
5	Estado redox das NSCs.....	23
5.3	Resposta pro-oxidante.....	24
5.3.1	Microambiente hipóxico .....	24
5.3.2	ROS derivados da mitocôndria .....	25
5.3.2.1	Metabolismo .....	25
5.3.2.2	Fosforilação oxidativa (OXPHOS) .....	26
5.3.3	Flashes/Bursts de superóxido.....	27
5.3.4	Morfologia e dinâmica mitocondrial .....	27
5.3.5	ROS de origem não mitocondrial .....	28
5.3.5.1	Família NOX e DUOX .....	28
5.4	Sinalização antioxidante .....	29
5.4.1	Sinalização Nrf2.....	29
5.4.2	Sinalização dependente de (NADP <sup>+</sup> )/(NADPH).....	30
5.4.2.1	Sistema tiorredoxina (TRX).....	31
5.4.2.2	Sistema glutaredoxina (GRXs).....	31
5.4.2.3	Sistema peroxirredoxina (PRX).....	31
5.4.2.4	Sistema nucleorredoxina (NRX).....	33
5.5	Oligodendrogénese .....	34
5.5.1	ERK1/2 e CREB .....	35
5.6	Neurogénese.....	36
5.6.1	NGF.....	36
5.6.2	Nrg .....	37
5.7	Astroglíogénese.....	38
6	Conclusões .....	40
	Referências Bibliográficas .....	41
	Anexos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Índice de Figuras:

- Fig. 1 Representação de zona subventricular e respectivas populações celulares. V, Ventriculo; VZ, zona ventricular; SVZ, zona subventricular; CSF, liquido cefaloraquidiano; RMS, fluxo migratório rostral..... 14
- Fig.2 Representação esquemática das principais áreas neurogénicas no cérebro adulto. Os marcadores específicos das NSCs são definidos para a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais (LV) e para zona subgranular (SGZ) do giro denteado no hipocampo. Neurónios imaturos da região SVZ migram ao longo do

fluxo migratório rostral (RMS), enquanto que os neurónios imaturos derivados da SGZ migram em direção à camada celular granulosa (GCL).....	15
Fig. 3 Representação de zona subgranular e respectivas populações celulares. SGZ, zona subgranular; GCL, camada de células granulares; ML, camada molecular.....	17
Fig. 4 Representação da cadeia respiratória mitocondrial. Ocorre a formação de anião superóxido resultante da captura de elétrons pelo O <sub>2</sub> e, de seguida, transformação do mesmo (através das SOD1 e SOD2) em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Por último, o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> é transformado em H <sub>2</sub> O. ....	21
Fig. 5 Representação esquemática dos efeitos de “hipóxia fisiológica” a nível celular. O decréscimo do oxigénio molecular provoca diretamente um aumento dos níveis de ROS, ativação de Fator induzido por hipóxia (HIF-1) e de variadas respostas como alterações nos níveis de glutathione e na dinâmica mitocondrial.	25
Fig. 6 Representação das principais mudanças que ocorrem durante o processo de diferenciação. A célula, ao avançar para um nível de diferenciação mais avançado, o seu ambiente redox torna-se significativamente mais oxidado. Além disso, a expressão de Nrf2 diminui, assim como a glicólise, dando origem a uma síntese mitocondrial intensa com conseqüente transição para fosforilação oxidativa, com vista a suprir as necessidades energéticas dos neurónios maduros. (45).....	26
Fig. 7 O impacto da dinâmica e morfologia mitocondrial na diferenciação celular. A mitocôndria alongada e reduzidos níveis de ROS provocam a ativação de genes associados à replicação. A mitocôndria fragmentada, associada a níveis de ROS aumentados provocam a inibição da replicação e expressão de genes associados à diferenciação. ....	28
<b>Fig. 8 Vias de transdução de sinal ativadas após estimulação do recetor EGF. ...</b>	<b>29</b>
Fig. 9 Indução da diferenciação neural através das PRX e JNK. Na ausência de ROS, JNK forma um complexo com a proteína GST. Quando os níveis de ROS aumentam, GST é oxidado. Assim formação de um complexo com JNK é inibida, permitindo a sua ativação. Finalmente, a cascata JNK induz a perda de stemness através da <i>downregulation</i> de Oct4 e induz a expressão de genes neurais. GST, glutathione S-transferase.....	33
Fig. 10 Resumo da ação das nucleoredoxinas na indução da diferenciação neural. Adaptado de (1).....	34
Fig. 12 Esquema demonstrativo da via de transdução de sinal do processo de diferenciação de oligodendrócitos (64).....	36
Fig. 13 Resumo das vias de sinalização referentes à diferenciação neuronal (37).....	38
Fig. 14 Resumo de fatores preponderantes na diferenciação de NSCs em astrócitos.(66).....	39

## Índice de Tabelas:

Tabela 1.1 Resumo das características das populações celulares na zona subventricular (SVZ). ....	16
---	----



# **1 Objetivo**

A presente monografia tem como objetivo clarificar a forma como as reações oxidação-redução modulam as vias de sinalização que comandam a diferenciação de células estaminais neurais e, com isso, determinam a linhagem a seguir pela própria célula: glial (astrócito ou oligodendrócito) ou neuronal.

## **2 Materiais e Métodos**

A presente monografia de revisão apoiou-se em artigos científicos relevantes para o tópico da mesma, publicados em revistas científicas. Foram utilizados como descritores os termos “redox signalling neurogenesis”, “neural stem cell differentiation”, “cell differentiation pathways” e “astrocyte differentiation redox”.

Os critérios de inclusão das fontes bibliográficas centraram-se na data de publicação (artigos tendencialmente dos últimos 10 anos, mas não só), fidedignidade, relevância para o tema em questão e idioma do artigo (língua inglesa). A pesquisa das fontes bibliográficas foi realizada através da consulta da base de dados eletrónica PubMed, com início a Março de 2021 e término a Novembro de 2021.

## **3 Células estaminais neurais**

Células estaminais neurais (NSCs) são células pluripotentes capazes de se diferenciar e proliferar sem limites. O processo de diferenciação origina células descendentes que se diferenciam tendo em conta as diferentes linhagens – neuronal, dando posteriormente origem aos neurónios e – glial, originando oligodendrócitos e astrócitos (1). Encontram-se principalmente em zonas neurogénicas, que podem diferir. A zona subventricular (SVZ) e ventricular (VZ) estão associadas ao estadio embrionário e pós-embrionário e a zona subgranular (SGZ) associada ao adulto. (1,2)

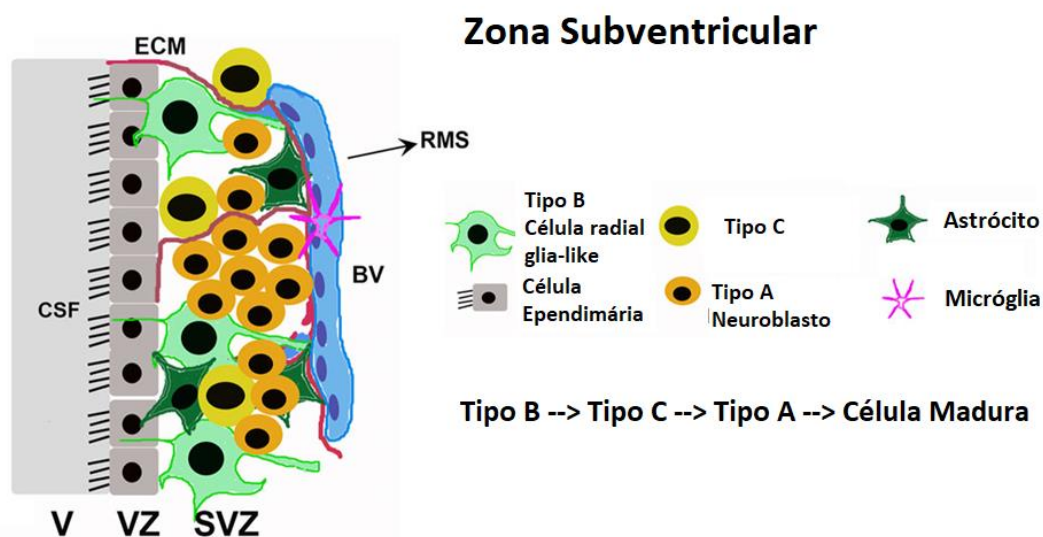
Apesar das diferenças significativas entre a SVZ e SGZ, estas áreas ou nichos, partilham arquiteturas comuns que permitem um contacto próximo entre NSCs de ambas as áreas. A sua atividade é maioritariamente de suporte às NSCs nas suas atividades fundamentais: diferenciação e proliferação em resposta a um estímulo (2)

### **3.1 Zona Subventricular (SVZ)**

A SVZ (Fig. 1) é a maior área neurogénica do cérebro adulto e encontra-se associada à formação dos neurónios do bulbo olfatório. Contém células nos diversos estadios de desenvolvimento como células estaminais e células progenitoras e localiza-se junto às células endimárias do ventrículo na parede lateral ventricular. As NSCs proliferam lentamente (3,4), expressam a proteína ácida fibrilar glial (GFAP+) e caracterizam-se pela inexistência de recetores fator de crescimento epidérmico (EGF) (4). NSCs da região SVZ podem ainda gerar astrócitos no bulbo olfatório e oligodendrócitos no córtex e corpo caloso (4).



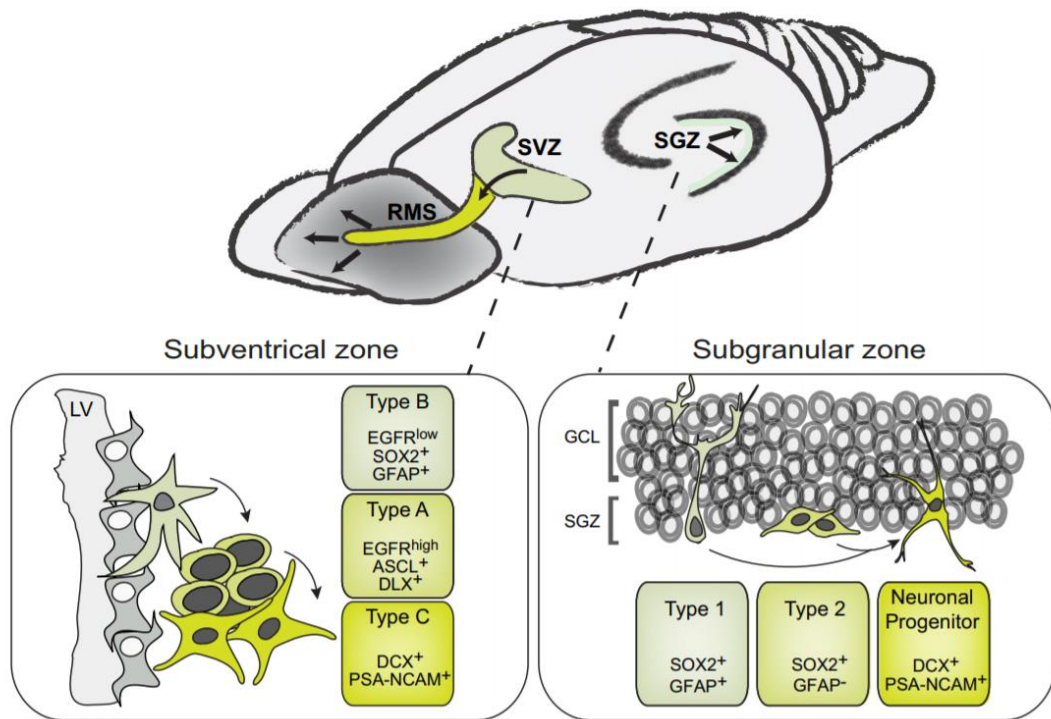
A diferenciação e proliferação celular nesta região é iniciada após um estímulo, pelo que o estudo e conhecimento desses estímulos terá grande relevância. Está descrita a inervação da região SVZ pelo núcleo ventromedial do hipotálamo e que esta pode induzir ou inibir a diferenciação (5).



**Fig. 1** Representação de zona subventricular e respectivas populações celulares. V, Ventriculo; VZ, zona ventricular; SVZ, zona subventricular; CSF, liquido cefalorraquidiano; RMS, fluxo migratório rostral. Adaptado de (6)

Após a sua ativação, as células Tipo B aumentam a presença de recetores EGF, proliferam rapidamente e dão origem a células multipotentes do Tipo C (7) que retêm a sua atividade mitótica (8). É comum utilizar a denominação de NSPC em referência a uma população mista de células B e C. As células Tipo C dão origem principalmente a neurónios imaturos (células Tipo A ou neuroblastos) que migram ao longo do fluxo migratório rostral (RMS) para o bulbo olfatório e geram interneurónios. Estas células expressam marcadores neuronais imaturos, como por ex.

doublecortina (DCX) e a molécula de adesão celular neural polissialilada (PSA-NCAM). (Fig 2)



**Fig.2** Representação esquemática das principais áreas neurogênicas no cérebro adulto. Os marcadores específicos das NSCs são definidos para a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais (LV) e para zona subgranular (SGZ) do giro dentado no hipocampo. Neurónios imaturos da região SVZ migram ao longo do fluxo migratório rostral (RMS), enquanto que os neurónios imaturos derivados da SGZ migram em direção à camada celular granulosa (GCL). Adaptado de (9)

<b>Tipo de célula</b>	<b>Características</b>	<b>Ritmo de Proliferação</b>	<b>Localização</b>
Ependimais (Ep)	Separar o líquido cefaloraquidiano da SVZ	---	Formam o epitélio ventricular
Neuroblastos ou Tipo A	Capacidade migratória para atingir o bulbo olfatório. Pouco diferenciados	+++++	Bulbo olfatório
Tipo B	De grandes dimensões, quiescentes e de fenótipo similar a células gliais; Geram células tipo C	++	Próximas das C. ependimais
Tipo C	Dividem-se 1 a 2 vezes. Geram células tipo A	+	

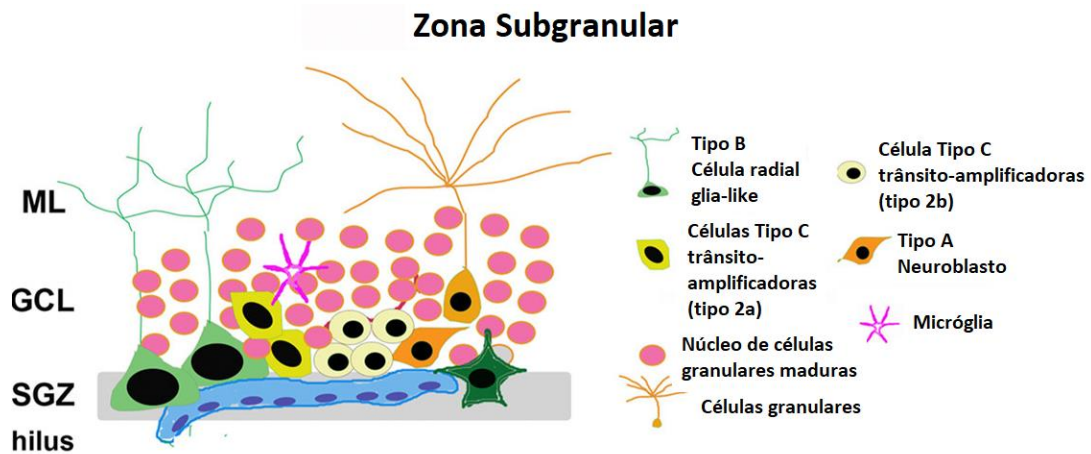
**Tabela 1.1 Resumo das características das populações celulares na zona subventricular (SVZ).**

**Adaptado de (8)**

### **3.2 Zona subgranular (SGZ)**

A SGZ (Fig. 3) encontra-se localizada no giro denteado do hipocampo. Existem dois tipos de NSCs nesta região: as células do tipo 1, que se dividem lentamente e têm uma estrutura radial. Estas células expressam o marcador sex determining region Y box-2 (SOX2) e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP). As células tipo 2, progenitoras, são

GFAP negativo e proliferam mais extensivamente em comparação com o Tipo 1. Ambas as populações dão origem a neurónios imaturos DCX-positivos que migram e se integram na camada de células granulares (10,11). As células estaminais da SGZ são igualmente capazes de gerar astrócitos (10).



**Fig. 3** Representação de zona subgranular e respectivas populações celulares. SGZ, zona subgranular; GCL, camada de células granulares; ML, camada molecular. Adaptado de (6)

## 4 ROS, *stress* oxidativo e diferenciação

As células estão constantemente expostas a várias formas de *stress*, seja extra ou intracelular. Esse *stress* promove a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), incluindo espécies radicais ou não radicais de oxigénio (12). Os tipos de ROS incluem radical superóxido, peróxido de hidrogénio e radical hidroxiloo.(13). Todavia, essa produção de ROS também acontece de forma passiva, nomeadamente a produção de superóxido mitocondrial. Este é gerado através da fuga de eletrões da cadeia transportadora, localizada na membrana interna. Esses eletrões são então capturados pelo oxigénio molecular transformando-o em superóxido.(14) (Fig. 4)

Os ROS, dentro de níveis aceitáveis, tipicamente baixos, atuam como um segundo mensageiro, desempenhando um papel importante no crescimento, função e diferenciação celular, através da qual a sinalização redox celular e a homeostasia são reguladas (15). Porém, uma alta concentração de ROS, além de ser tóxica e prejudicial às células (p.ex, através peroxidação lipídica na membrana celular) induz um desequilíbrio na sua regulação que atua como *stress* oxidativo, tornando-se causa de várias patologias (1, 4). Assim, é de extrema importância manter os ROS em níveis toleráveis pelo organismo e para isso, as células possuem sistemas de defesa para a sua remoção efetiva (5), constituídos maioritariamente por enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes são, entre outras, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e peroxirredoxina (Prx) (16).

### 4.1ROS

Espécies reativas de oxigénio é um termo utilizado para descrever um conjunto de moléculas e radicais derivados do oxigénio molecular ( $O_2$ ), altamente reativos, presentes em todos os seres vivos aeróbios. Estes resultam, principalmente, do metabolismo energético aeróbio, sendo gerados na forma de subprodutos pela cadeia transportadora de eletrões mitocondrial. Podem ainda ser gerados através de

complexos enzimáticos designados por NADPH oxidases. (17,18)

#### **4.1.1 Perspetiva histórica**

Aquando da sua descoberta, a teoria aceite pela comunidade científica era que a produção de ROS era exclusivamente de células fagocíticas, enquanto parte do seu mecanismo de defesa.(19) Gradualmente, com a crescente evidência nos últimos anos, os ROS foram associados não só ao *onset* de determinadas patologias, tais como doenças neurodegenerativas, oncológicas e diabetes, como se acredita que têm um papel importante na manutenção das funções celulares, nomeadamente através das suas ações enquanto segundo mensageiro nas mais variadas vias de transdução de sinal. (1,20)

#### **4.2 Stress oxidativo**

A produção de ROS é regulada de diversas formas, resultando num balanço adequado que permite a sobrevivência da célula e a ativação de determinadas vias de transdução de sinal. Este balanço diverge consoante o local, sendo diferente não só de célula para célula, como entre os próprios compartimentos celulares, assim como da fase do ciclo celular e metabolismo. Por exemplo, no início do processo de diferenciação, a concentração de moléculas antioxidantes é significativamente superior, com conseqüente menor concentração de ROS e o ambiente celular tenderá para níveis reduzidos. Conforme vai decorrendo o processo de diferenciação e envelhecimento celular, ocorre uma mudança deste panorama – o ambiente torna-se mais oxidado e com menor conteúdo em moléculas antioxidantes.(21)

O balanço redox é igualmente capaz de ditar as funções celulares. Tal como foi dito anteriormente, as células do sistema imunitário com capacidade fagocitária possuem altos níveis de ROS para que possam exercer a sua função, enquanto que os hepatócitos possuem numerosas moléculas antioxidantes com o objetivo de neutralizar os xenobióticos que por ele passam. (18)

As mitocôndrias são a principal fonte de ROS nas células, nomeadamente através da produção de anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Este, pode ser formado no complexo mitocondrial III, recorrendo à citocromo C oxidase e no complexo I, localizado na membrana interna da mitocôndria, como resultado da cadeia transportadora de eletrões, ou formado a nível citosólico com recurso às NOX (Reação 1) (Fig. 4) (22). Estas enzimas encontram-se principalmente na membrana celular. O superóxido é

convertido em peróxido de hidrogénio (Reação 2) pela superóxido dismutase citosólica (SOD1) e mitocondrial (SOD2). O peróxido de hidrogénio, dadas as suas características, difunde através da membranas e atua como mensageiro nas mais variadas vias de sinalização (23), e, apesar da sua reduzida atividade pode dar origem ao radical hidroxiloo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), que não pode ser removido e resulta em grande dano celular. Este radical é gerado através da reação de Fenton, a qual é catalisada pelo ião ( $\text{Fe}^{2+}$ ). (Reação 3). O controlo dos níveis de peróxido de hidrogénio é crítico na manutenção dos níveis de radical hidroxilo. Por exemplo, após a ingestão de bebidas alcóolicas, há um aumento transiente dos níveis de peróxido de hidrogénio que devido à saturação das enzimas destoxicantes não é imediatamente removido e dá origem ao radical hidroxiloo.(24).

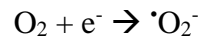
O radical hidroxiloo é capaz de reagir com uma variedade sistemas endógenos, incluindo os fosfolípidos membranares, levando à sua destabilização – com peroxidação lípídica e formação de radicais lipídicos – e morte celular. Os peróxidos lipídicos podem igualmente seguir reação de Fenton, culminando numa ciclicização da produção de radicais hidroxilo, e em grande dano celular. (Reação 3) (25) Quanto aos radicais lipídicos, estes podem ser removidos com recurso à Vitamina E, esta com poder antioxidante. Os seus níveis são críticos para a manutenção celular, podendo tanto originar espécies altamente reativas com capacidade de danificar a célula ou atuar como mensageiros intervindo em diversas vias de transdução de sinal. O controlo destas espécies pode ser feito recorrendo a moléculas ou grupos antioxidantes, ou seja, que tenham a capacidade de neutralizar estes compostos. Nesta neutralização são preponderantes as reações dependentes dos sistemas redox ativos da glutathione peroxidase e peroxirredoxinas que se baseiam nas propriedades redox-sensíveis dos grupos selenol ( $\text{SeH}$ , presente no aminoácido selenocisteína) e tiol ( $\text{SH}$ , cisteína), respetivamente, e representam a principal *pool* antioxidante de peróxidos.(26)

## Formação de ROS

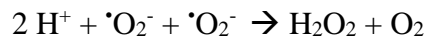
O oxigénio atómico tem dois eletrões desemparelhados em orbitais diferentes no último nível eletrónico, tornando-o suscetível à formação de radicais. A formação de radicais ocorre em passos sequenciais, como demonstrado a seguir.

### Redução do oxigénio molecular (Reação 1)

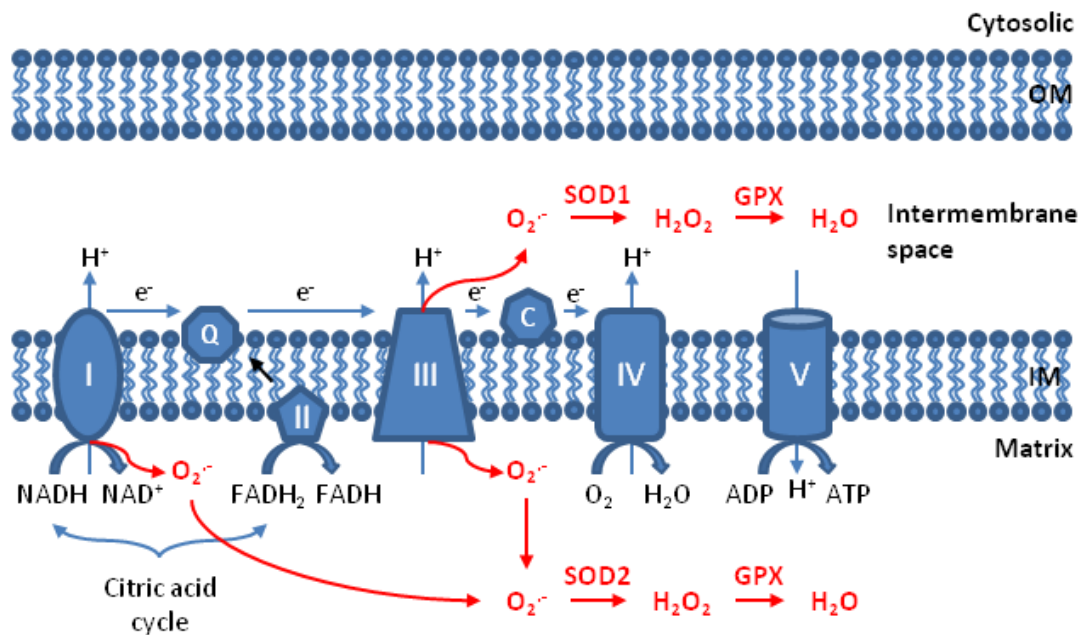
A redução do oxigénio molecular ( $O_2$ ) resulta na produção de superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), precursor de outras espécies reativas de oxigénio.



### Dismutação do superóxido (Reação 2)



### Formação do radical hidroxilo (Reação 3)



**Fig. 4** Representação da cadeia respiratória mitocondrial. Ocorre a formação de anião superóxido resultante da captura de eletrões pelo  $O_2$  e, de seguida, transformação do mesmo (através das SOD1 e SOD2) em  $H_2O_2$ . Por último, o  $H_2O_2$  é transformado em  $H_2O$ .

Adaptado de (27)



No decorrer desta monografia, serão abordadas mais concretamente as vias afetadas pela sinalização recorrendo a ROS, especialmente no contexto de diferenciação e proliferação de NSCs e quais as moléculas antioxidantes com maior papel na regulação destas espécies.

### **4.3 Sinalização celular**

No último capítulo foram referidos os possíveis danos que são mediados pela presença de ROS a nível celular. Contudo, a evidência científica sobre a existência de uma função fisiológica associada aos ROS tem vindo a crescer nos últimos anos. Os ROS são capazes de oxidar resíduos de cisteína, nomeadamente o seu grupo tiol, regulando assim a ação das proteínas em que estes se inserem. Tendo em conta a riqueza em resíduos de cisteína existente nos organismos biológicos, é possível ter uma ideia da magnitude de vias de sinalização reguladas pelos ROS. (28)

A importância da cisteína na fisiologia prende-se com a sua capacidade de formar ligações covalentes com os principais elementos presentes nos organismos biológicos (C, O, H, N, P). (28) . O grupo tiol na cisteína é imediatamente oxidado por ROS, como o peróxido de hidrogénio, e é transformado de forma transitória em ácido sulfénico (-SOH) e depois em dissulfeto (-S-S-). De dissulfeto, pode ainda sofrer posterior oxidação em ácido sulfínico (-SO<sub>2</sub>H) e de seguida a ácido sulfónico (-SO<sub>3</sub>H), irreversível. Dependendo do conteúdo antioxidante da célula, é possível reverter a transformação em dissulfeto. (29).

A metionina (Met), é um aminoácido que contém enxofre na sua estrutura. Como tal, está sujeita às reações redox típicas, nomeadamente oxidação a metionina sulfóxido (S=O) e a respetiva redução pela metionina sulfoxidoreductase (Msr). Esta propriedade confere à Met uma função única enquanto interface entre o meio intracelular e extracelular mediada pelos ROS. (30)

Contudo, nem todos os grupos tiol são facilmente oxidáveis. Determinadas enzimas, como as tiorredoxinas, glutarredoxinas e a molécula glutathione têm um potencial redox reduzido, atuando como tampão e em última instância como um fator *major* na regulação das vias de sinalização redox sensíveis. (31,32)

## 5 Estado redox das NSCs

O estado redox intracelular é definido pelo equilíbrio entre a produção e eliminação de pares redox, como por exemplo NADP<sup>+</sup>/NADPH, NAD<sup>+</sup>/NADH, glutatona oxidada/reduzida (GSSG/GSH), anião superóxido/oxigénio ( $\bullet\text{O}_2^-/\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogénio/água ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ). Acumulação de espécies oxidantes, tais como ROS ou espécies reativas de nitrogénio (RNS) por eliminação ineficiente ou produção excessiva resulta num estado intracelular oxidado e promove reações de oxidação. Este ambiente terá consequências a níveis estruturais para as moléculas presentes, nomeadamente oxidação de proteínas e enzimas como fosfatases e cinases, sendo que as últimas regulam várias vias de sinalização, nomeadamente do ciclo celular e diferenciação. (33–35). As ROS são mantidas dentro de determinados parâmetros por enzimas como SOD, glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), tioredoxinas ou elementos não enzimáticos como a glutatona. As fontes endógenas de ROS na célula tornaram-se essenciais para a sua expansão clonal e diferenciação e a modulação dessas fontes pode alterar a sua linhagem de neuronal para glial ou vice-versa.

Uma análise comparativa, permite concluir que no sistema nervoso central, as zonas neurogénicas possuem níveis de ROS mais elevados. (33,36) Nessa mesma região, ao seleccionar e ordenar os neurónios corticais de acordo com os níveis de ROS, é possível concluir que as NSCs com níveis mais altos diferenciam-se posteriormente em neurónios, enquanto que níveis mais baixos estão associados à diferenciação primeiramente em astrócitos e oligodendrócitos. Além disso, o tratamento antioxidante de uma cultura celular de NSCs resulta numa alteração da proporção dos tipos de neurónios presentes.(37) Estes factos permitem-nos concluir que os ROS possuem um papel fulcral na diferenciação. Este é um processo complexo que envolve um conjunto de vias de sinalização, particularmente vias sensíveis às reações redox que vão influenciar o futuro da célula. O controlo das variáveis que influenciam os

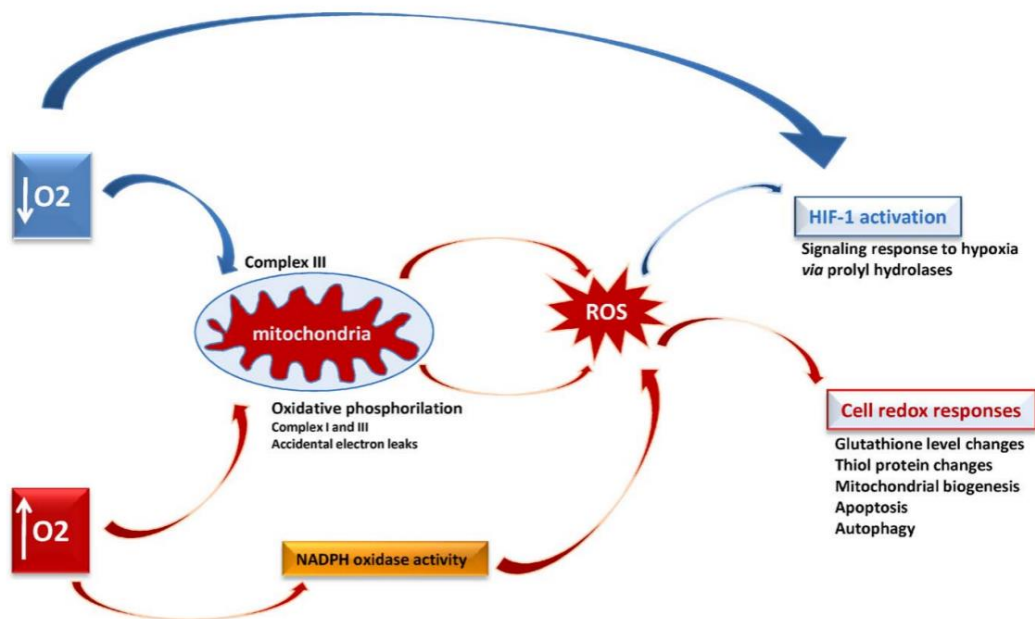
níveis de ROS celular tais como capacidade antioxidante, expressão de NOX, entre outros é feito de forma rigorosa. O estado redox celular é relevante durante grande parte do processo de diferenciação, inclusive durante o desenvolvimento axonal e dendrítico. Mais à frente serão realçadas as vias de sinalização com impacto na diferenciação assim como as moléculas redox-sensíveis e de que forma os ROS têm um impacto na sua regulação.

## **5.3 Resposta pro-oxidante**

### **5.3.1 Microambiente hipóxico**

A saturação de oxigénio média no cérebro dos mamíferos centra-se entre os 0.1–5.3%. Nas regiões típicas de diferenciação como é o caso do giro denteado do hipocampo, os níveis médios de O<sub>2</sub> são 1.3%.(39). Tendo em conta que os níveis de oxigénio atmosférico são cerca de 20%, e que a partir de 5% são considerados níveis hipóxicos, as NSCs propagam-se e diferenciam-se em ambiente hipóxico. Este facto vem demonstrar a existência de uma “hipóxia fisiológica” necessária para a sobrevivência e renovação celular.(38,39)

A hipóxia fomenta o aparecimento de ROS através do aumento da expressão das NOX membranares e por alteração da atividade mitocondrial, sendo que ambos potenciam o processo de diferenciação (Fig 5). Consequentemente, com o aumento dos níveis de ROS, resulta a ativação de HIF-1 que interage com OCT4 (fator de transcrição associado à pluripotência).(39)



**Fig. 5** Representação esquemática dos efeitos de “hipóxia fisiológica” a nível celular. O decréscimo do oxigênio molecular provoca diretamente um aumento dos níveis de ROS, ativação de Fator induzido por hipóxia (HIF-1) e de variadas respostas como alterações nos níveis de glutatona e na dinâmica mitocondrial. Adaptado de (39)

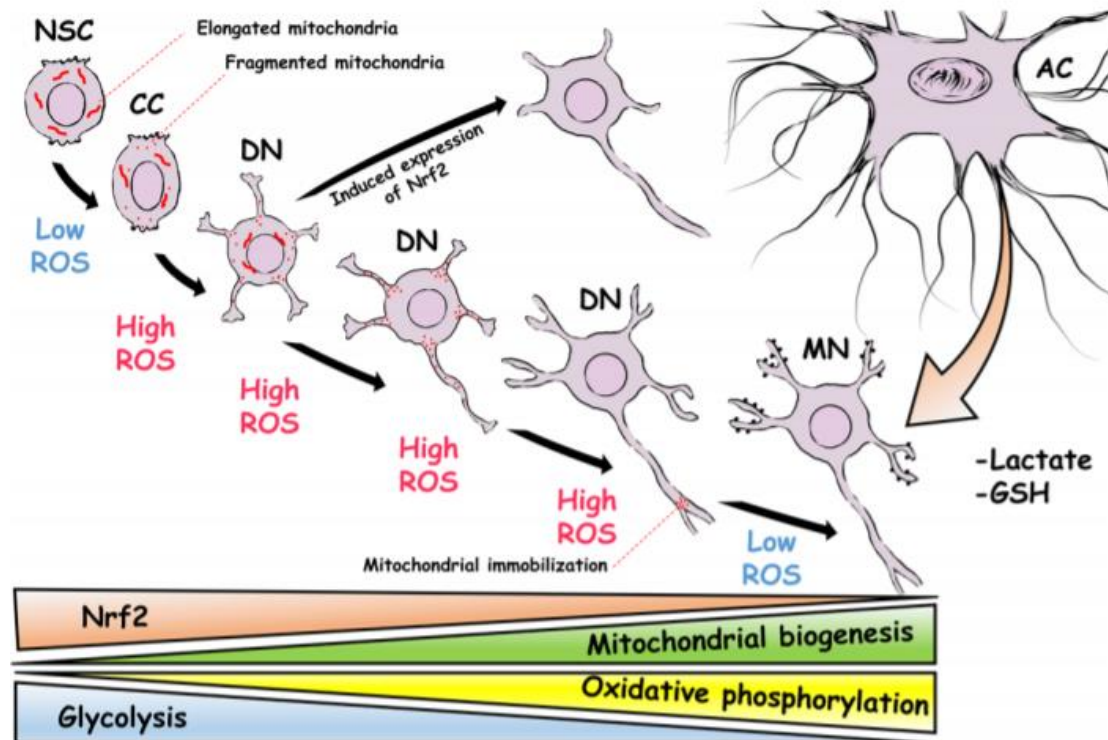
### 5.3.2 ROS derivados da mitocôndria

Durante a diferenciação neuronal de NSCs, há um aumento do número de mitocôndrias e níveis intrínsecos de ROS (40). O número, integridade e dinâmica mitocondrial exerce igualmente uma função moduladora sobre o processo de diferenciação de NSCs. Por exemplo, neurónios em estadios avançados de diferenciação possuem níveis superiores de enzimas mitocondriais associadas ao metabolismo oxidativo (como é o caso da fumarato redutase ou citocromo c oxidase) em comparação com as suas células precursoras (13, 20)

#### 5.3.2.1 Metabolismo

O metabolismo de NSCs depende principalmente da glicólise e de  $\beta$ -oxidação. Conforme o processo de diferenciação decorre, há uma transição para um perfil metabólico envolvendo fosforilação oxidativa, principalmente em neurónios. Com efeito, esta transição é um requisito e não uma consequência da diferenciação e tem como principal objetivo suprir as necessidades energéticas neuronais. (42,43)

Com a mudança de perfil metabólico, ocorre um aumento dos níveis complexo I e níveis reduzidos de SOD 1, que é acompanhada por níveis elevados de ROS mitocondrial e citoplasmático necessários para modificar o perfil de transcrição genético das células progenitoras comprometidas (CC), e como consequência, há uma promoção da diferenciação. (42,43)



**Fig. 6** Representação das principais mudanças que ocorrem durante o processo de diferenciação. A célula, ao avançar para um nível de diferenciação mais avançado, o seu ambiente redox torna-se significativamente mais oxidado. Além disso, a expressão de Nrf2 diminui, assim como a glicólise, dando origem a uma síntese mitocondrial intensa com consequente transição para fosforilação oxidativa, com vista a suprir as necessidades energéticas dos neurónios maduros. (44)

### 5.3.2.2 Fosforilação oxidativa (OXPHOS)

OXPHOS ou fosforilação oxidativa mitocondrial produz altos níveis de ATP e ROS que são gerados pela cadeia transportadora de eletrões. Estes são gerados

principalmente pelo Complexo I (NAD:ubiquinona oxidoreductase) e Complexo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductase). (46) Os elétrons são gerados a partir da NADH e FADH<sub>2</sub> que de seguida passam pela cadeia de transportadora de elétrons e, no fim, reduzem o O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O no complexo IV. No complexo I e III a produção de ROS resulta num extravasamento de elétrons que ao encontrarem um aceitador como é o caso do O<sub>2</sub>, provocam a sua redução, resultando no aparecimento de superóxido. Superóxido é produzido na matriz no complexo I, enquanto no complexo III o mesmo é libertado tanto para na matriz como para o espaço intermembranar mitocondrial. (45) Uma vez gerado o superóxido, este sofre dismutação (reação 2) pela SOD1 ou SOD2 dependendo do local. Posteriormente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é totalmente reduzido a água pela GPX. Há alguma evidência que os neurónios utilizam lactato proveniente dos astrócitos na OXPHOS para produzir ATP. (45)

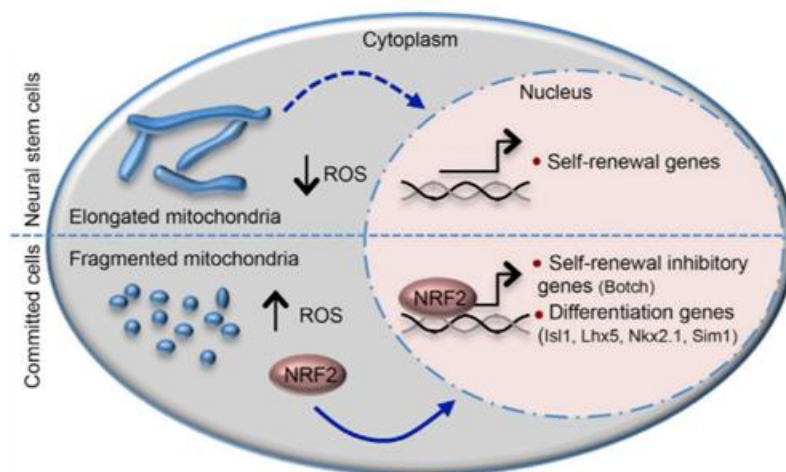
### **5.3.3 Flashes/Bursts de superóxido**

A diferenciação de NSCs está associada ao aumento de *bursts* oxidativos de superóxido, isto é, o aumento súbito de superóxido na mitocôndria causado pela abertura de um poro específico, poro de permeabilidade mitocondrial (mPTP). Este processo é efêmero e não ocorre uma alteração da concentração global de ROS efetiva. A frequência dos *bursts* oxidativos relaciona-se com a percentagem de oxigénio presente no meio e influxos de Ca<sup>2+</sup>. A abertura do poro é crucial para a diferenciação e a sua inibição farmacológica resulta em ausência de diferenciação celular. Por último, a deleção dos genes SOD1 e SOD2 e conseqüente inexistência de metabolismo do superóxido resulta num impacto significativo na linhagem celular com a decisão a favorecer transição para a linhagem glial. (46) A depleção de glutathiona (GSH) provoca uma mudança no destino celular no sentido da linhagem glial. (47)

### **5.3.4 Morfologia e dinâmica mitocondrial**

As propriedades morfológicas e dinâmica mitocondrial parecem ter impacto regulador a montante nas decisões sobre o destino das NSCs. A dinâmica e morfologia mitocondrial é estabelecida através de fissões e fusões reguladas e têm um grande impacto na identidade, capacidade mitótica e futuro celular ao regular o Complexo I mitocondrial, e como tal, os níveis de ROS que daí advém, tendo por isso um papel fisiológico muito importante. (43) A dinâmica mitocondrial direciona o destino das

NSCs através da modificação dos níveis de ROS e da respetiva transdução de sinal ao ativar a via de sinalização Nrf2 de forma retrógrada, que desencadeia um programa celular duplo: suprime a capacidade mitótica e ao mesmo tempo promove o compromisso de diferenciação celular ao estimular a transcrição de variados genes, como demonstrado na Fig 7 (43)



**Fig. 7 O impacto da dinâmica e morfologia mitocondrial na diferenciação celular. A mitocôndria alongada e reduzidos níveis de ROS provocam a ativação de genes associados à replicação. A mitocôndria fragmentada, associada a níveis de ROS aumentados provocam a inibição da replicação e expressão de genes associados à diferenciação.**

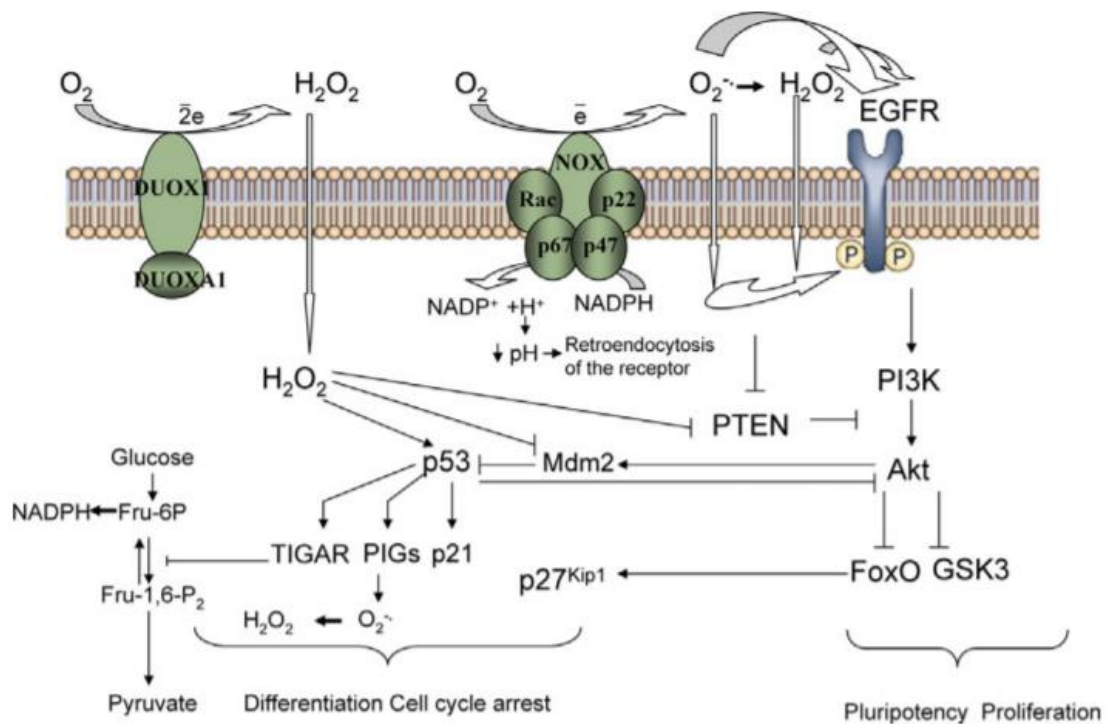
Adaptado de (48)

### 5.3.5 ROS de origem não mitocondrial

#### 5.3.5.1 Família NOX e DUOX

As NOX e DUOX são as principais fontes celulares de ROS, sendo maioritariamente expressas na zona subventricular e modulam a neurogênese que ocorre nessa região. Os níveis de ROS são estritamente controlados dentro de dois parâmetros: concentração e localização intracelular. Estes parâmetros permitem não só que a diferenciação decorra como mantém a integridade celular. A ativação das NOX inicia-se assim que EGF interage com o seu recetor celular. A família NOX está amplamente distribuída pelo organismo e é constituída pelas oxidases (NOX 1-5) e duo-oxidases (DUOX 1 e 2). Estas, modulam a neurogênese promovendo a proliferação ou a diferenciação de NSCs (5,49) através da via PTEN/PI3K/Akt com inativação

oxidativa de PTEN ou através de p53 (50). Os aniões superóxido e moléculas de peróxido de hidrogénio podem difundir-se através da membrana celular. Os aniões superóxido gerados podem sofrer ação da Zn-Cu-SOD ou sofrem reação de dismutação espontâneamente. Está igualmente demonstrado que os ROS regulam a via que determina a autofagia e apoptose através da modificação oxidativa do aminoácido metionina na catepsina L.(51). A ativação da via PTEN/Akt e consequentemente de Mdm2 resulta numa degradação de p53 com consequente paragem do ciclo celular e iniciação do processo de diferenciação. PTEN inibe a ativação de Akt e como tal, a diferenciação (Figura 7). A ativação de p53 induz expressão de PIGs (genes indutíveis por p53) e TIGAR (glicólise induzida por TP53 e regulador de apoptose) que estão envolvidos no aparecimento de radicais superóxido associados à paragem da diferenciação celular.



**Fig. 8** Vias de transdução de sinal ativadas após estimulação do recetor EGF.

## 5.4 Sinalização antioxidante

### 5.4.1 Sinalização Nrf2

A capacidade antioxidante de uma célula é regulada durante todo o seu tempo de vida e varia de acordo com o seu estadió de diferenciação, sendo maior nas NSCs face aos



neurónios diferenciados. O aumento da capacidade antioxidante é causado pelo fator de transcrição Nrf2 e resulta numa maior resistência face a *bursts* oxidativos e outras variações de ROS. A ativação do Nrf2 culmina com elevação dos níveis de transcrição de proteínas antioxidantes. (1,52)

Em condições normais, Nrf2 está localizado no citoplasma celular onde interage com a Keap1, rico em resíduos de cisteína. Oxidação dos resíduos de cisteína leva à separação do Nrf2/Keap1, e o Nrf2 é translocado para o núcleo celular. No núcleo ocorre a ligação ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ou elemento responsivo eletrófilo (EpRE), culminando na expressão de genes associados à defesa antioxidante (p. ex tiorredoxinas) (53,54)

Nrf2 suporta a regeneração tecidual com base em células estaminais e diferenciação neuronal. (1)

Conforme o processo de diferenciação vai decorrendo, a capacidade antioxidante das NSC vai decrescendo, mais concretamente o conteúdo em glutatona, um dos principais agentes antioxidantes, resultando numa alteração significativa do estado redox. (1)

Através da análise do níveis de mRNA de Nrf2 de NSCs em estágios iniciais de diferenciação, é possível concluir que há um súbito decréscimo da expressão de Nrf2, resultando numa capacidade antioxidantes reduzida. Este decréscimo é mediado por repressão epigenética do promotor de Nrf2, resultando numa redução da expressão dos genes alvo: Hmox1, Srxn1, xCt, Cat e Gclc (1,60,61)

#### **5.4.2 Sinalização dependente de (NADP<sup>+</sup>)/(NADPH)**

O NADPH fornece os equivalentes redutores necessários para regeneração de uma variedade de enzimas reguladoras de redox, especialmente membros da família tioredoxina, como as oxidorreduções. Enzimas desta família são fulcrais na sinalização redox-dependente. Essas enzimas possuem a capacidade de reverter oxidações dos grupos tiol e remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio.(55) Modificações oxidativas, por ex. formação de dissulfetos e ácidos sulfénicos, S-glutationilação ou S-nitrosilação, ocorrem em resíduos de cisteína específicos e modulam as atividades de um número significativo de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal.(56)

#### **5.4.2.1 Sistema tiorredoxina (TRX)**

O sistema tiorredoxina (Trx) (tiorredoxina/tiorredoxina redutase + NADPH) reduz dissulfetos (-S-S-) e tióis S-nitrosilados. São compostos por um sítio ativo com dois resíduos de cisteína, constituídos por grupos ditiol/dissulfeto, com impacto na regulação redox celular e essenciais para a síntese de DNA e crescimento neuronal. (29)

Trx participa ativamente no processo de proliferação e diferenciação celular. O ciclo celular é regulado por diversas proteínas, entre elas a Akt, pertencente à via de sinalização PTEN/PI3K/Akt. (Fig. 8). Trx1 ao reduzir resíduos de cisteína do grupo fosfatase homóloga à tensina (PTEN), inibe a sua atividade de fosfatase e forma-se um dissulfeto Trx-PTEN. De seguida, ocorre ativação do Akt através de reação com o dissulfeto - conhecido mediador de diferenciação e sobrevivência celular. (1,59)

Trx é ainda responsável pela ligação de cisteínas oxidadas ao domínio de ligação ao DNA. Como consequência ocorre um aumento da atividade transcricional do fator de transcrição do OCT4 – altamente associado ao processo de diferenciação (1,58,59).

A Trx regula igualmente a proteína mediadora de resposta à colapsina (CRMP 2), que é responsável pelo direcionamento e ramificações axonais assim como número de dendrites. Isto acontece devido ao peróxido de hidrogénio que é gerado nos cones em crescimento, que oxida a CRMP2, sendo de seguida reduzida pela Trx. De seguida, ocorre fosforilação do CRMP2, que culmina num colapso do cone de crescimento.(1)

#### **5.4.2.2 Sistema glutarredoxina (GRXs)**

A GRX2, faz parte da família das tiorredoxinas. O sistema glutarredoxina, além dos dissulfetos, é capaz de reduzir tióis glutationados. GRX 1 e 2 são capazes de interagir com o SIRT1, um regulador major da célula. Tem ainda a capacidade de regular o grupo tiol do CRMP2 através de uma indução de mudança de conformação e como tal, o regular o crescimento axonal. (2)

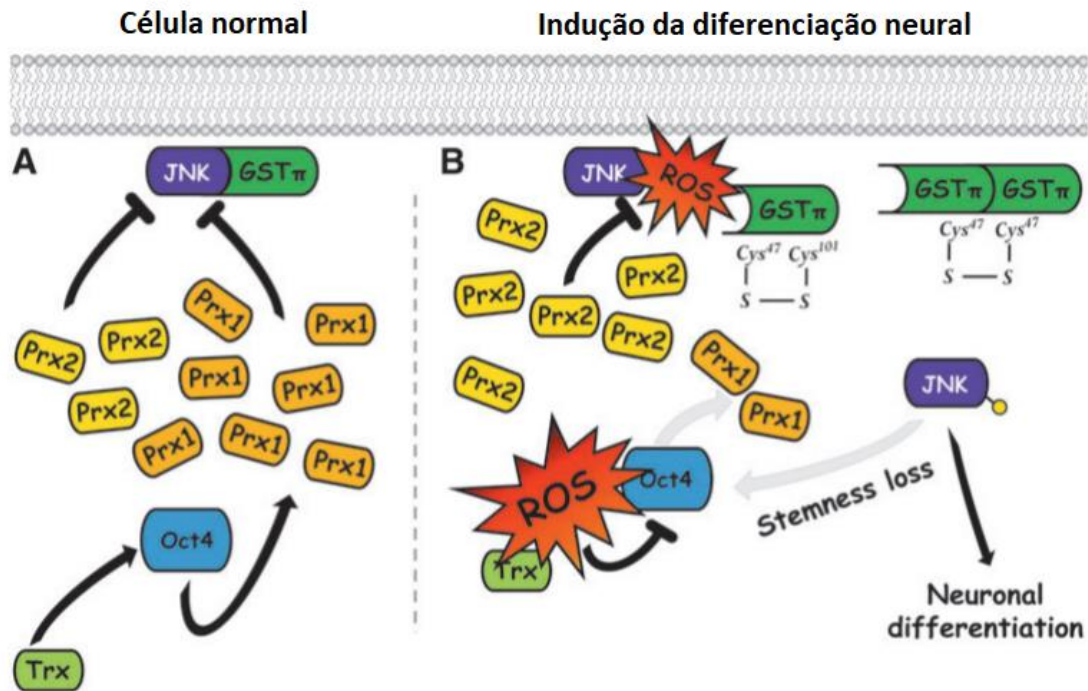
#### **5.4.2.3 Sistema peroxirredoxina (PRX)**

Existem seis Prxs divididas em três classes mediante as suas características estruturais: típico 2-Cys (Prx 1-4), atípico 2-Cys (Prx5) e 1-Cys (Prx6). Peroxirredoxinas (Prxs) têm vindo a ser implicadas na manutenção da *stemness*, uma vez que 1) são um conjunto de enzimas cuja função principal é catalisar a eliminação

peróxido de hidrogénio (cuja eficiência é comparável à GPx e catalase), funcionando assim como sensor primário para a sinalização da sua presença e 2) a deleção dos genes correspondentes à Prx1 e Prx2 provoca um aumento aberrante dos níveis de ROS e diferenciação prematura. A Prx ao reagir com as moléculas de peróxido de hidrogénio, sofre oxidação do resíduo típico 2-Cys. Este resíduo pode reagir com uma segunda Prx, formando uma ponte dissulfeto sendo depois reduzido pela tioredoxina.

Num modelo de NSCs, as Prxs controlam a progressão temporal da diferenciação neuronal. Durante a diferenciação neuronal, há um aumento nos níveis de ROS e Prx2 e uma diminuição nos níveis de Prx1 (87). O aumento dos ROS resultam numa fosforilação e consequente ativação de JNK, fundamental para o processo de diferenciação. (87).

A expressão de Prx1 está relacionada com os níveis de Oct4, uma vez que o silenciamento de Oct4 reduz os níveis de Prx1, mas não os níveis de Prx2 (87). A oxidação de Oct4 leva à diminuição da atividade, enquanto a redução de Oct4 pela tioredoxina aumenta sua atividade (56). A atividade de JNK pode ser regulada por ROS ao modificar a interação entre JNK e a glutathione S-transferase p (GSTp). O complexo formado entre estas proteínas inibe a atividade JNK (2). ROS promove a formação de um dissulfeto entre Cys 47 e Cys 101 de GSTp, evitando a interação com JNK e permitindo sua atividade (56). Assim, Prx1/2 contribui para a supressão de JNK, reduzindo os níveis de ROS. Após o estímulo de diferenciação, as NSCs aumentam os níveis de ROS para ativar a cascata JNK, resultando em downregulation de Oct4 que controla a expressão de Prx1. Quando ocorre o estímulo de diferenciação, Prx2 controla os níveis de ROS, suportando a ideia que o estado redox da célula é determinante do destino da célula por controlar a função de diferentes proteínas envolvidas na processo de diferenciação (Fig. 3)



**Fig. 9** Indução da diferenciação neural através das PRX e JNK. Na ausência de ROS, JNK forma um complexo com a proteína GST. Quando os níveis de ROS aumentam, GST é oxidado. Assim formação de um complexo com JNK é inibida, permitindo a sua ativação. Finalmente, a cascata JNK induz a perda de stemness através da *downregulation* de Oct4 e induz a expressão de genes neurais. GST, glutationa S-transferase.

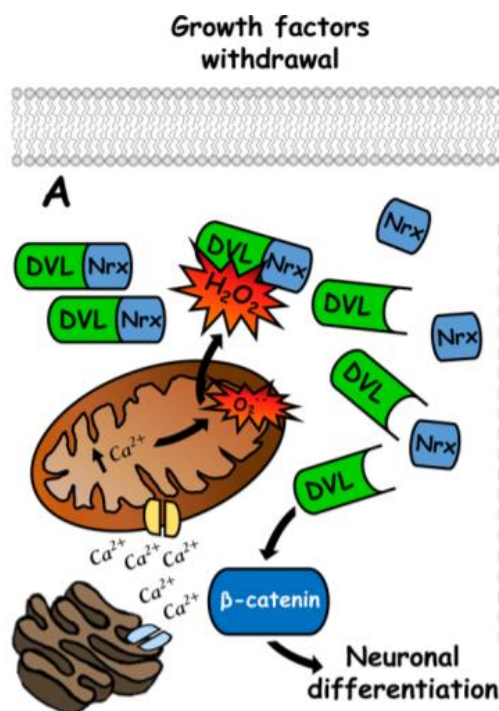
Adaptado de (1)

#### 5.4.2.4 Sistema nucleorredoxina (NRX)

Nucleoredoxinas são oxidoreduções que têm um papel preponderante na diferenciação neural. Mais concretamente, regulam a via de sinalização WNT/  $\beta$ -catenina, basilar para o processo de diferenciação. (60)

O início do processo é marcado por um desequilíbrio do conteúdo de ROS. De seguida, cálcio é libertado através de recetores IP3 tipo 1 do retículo endoplasmático, entrando parte deste para o interior da mitocôndria através de um uniporter. Esta entrada, resulta num aumento transitório de ROS, que reverte a ligação entre a Nrxe e DVL, com conseqüente ativação da via  $\beta$ -catenina, aumentando a transcrição do gene MAP2 e culminando na diferenciação celular. Em condições basais, a Nrxe e DVL

formam um complexo que os inativa, impedindo a ativação da via. Contudo, na presença de peróxido de hidrogénio exógeno ou ROS mitocondriais, esta ligação é inibida e ocorre ativação da  $\beta$ -catenina por parte da DVL. Durante o processo de diferenciação, há um aumento transitório de Nr<sub>x</sub> de forma a controlar os níveis de DVL livres, controlando assim, a ativação da via  $\beta$ -catenina. (60–62)



**Fig. 10** Resumo da ação das nucleorredoxinas na indução da diferenciação neural. A diferenciação neural é induzida através da remoção do fator de crescimento que induz a libertação de cálcio do retículo endoplasmático através de IP3. Uma parte do cálcio entra na mitocôndria através do uniporter mitocondrial, induzindo a produção de ROS. Os ROS mitocondriais ativam a B-catenina dissociando o DVL e a nucleoredoxina (Nr<sub>x</sub>). Assim que o DVL é libertado, ativa a via da B-catenina, induzindo diferenciação neural Adaptado de (1)

## 5.5 Oligodendrogénese

A diferenciação de NSCs em oligodendrócitos é regulada pelos níveis de ROS. Ao analisar NSCs obtidas da zona subventricular, o peróxido de hidrogénio induz diferenciação não só da linhagem neuronal, como da glial, originando

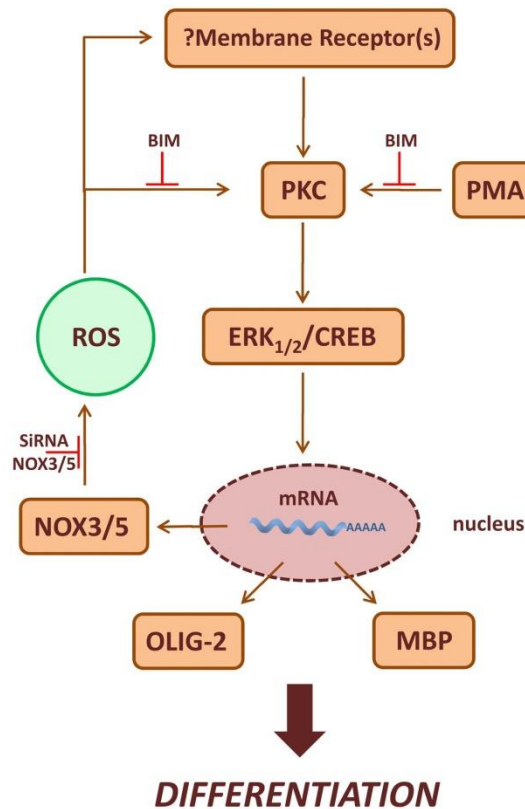
oligodendrócitos (1). Os níveis de ROS podem condicionar a diferenciação de uma cultura de NSCs em oligodendrócitos, sendo que quanto mais altos, maior a extensão de diferenciação. De forma contrária, tratamento antioxidante resulta num decréscimo da diferenciação celular.(1)

### **5.5.1 ERK1/2 e CREB**

Um conjunto de enzimas NOX são responsáveis pela regulação da diferenciação de oligodendrócitos. As NSCs cujos níveis de NOX3 e 5 são baixos, comparativamente às células controle, geram um número de células diferenciadas inferior(63). Estas enzimas encontram-se ligadas uma vez que depleção de uma delas, resulta numa redução de expressão da outra. PKC é o indutor central de diferenciação e está presente de forma assídua: tanto a montante dos ROS (com a fosforilação e ativação da subunidade p47phox e consequente produção de ROS) como a jusante, ao ser ativado por ROS, nomeadamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1,63,64). Desta forma, é gerado um feedback positivo que induz uma fosforilação contínua da cinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) e a ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), resultando no aparecimento de marcadores de diferenciação MBP e Olig-2. ERK1-2 e CREB controlam a diferenciação de oligodendrócitos tanto em estágios iniciais como tardios, promovendo ainda crescimento da mielina no caso de serem mielinizantes.(63,64). Além de entrarem na via de sinalização propriamente dita, ROS produzidos por enzimas NOX estabilizam os receptores de membrana envolvidos na diferenciação de OLs, amplificando assim os sinais a jusante de PKC.

Existem muitos receptores de membrana que ativam NOXs, e ROS produzidos após a interação ligante-recetor, funcionam como moléculas de segundo mensageiro mediando vários eventos celulares, sendo a diferenciação um deles. No entanto, até ao momento não foi encontrado um recetor membranar que esteja envolvido na sinalização in vivo redox que leve à diferenciação em oligodendrócitos, sendo necessária uma maior investigação neste ponto.(1,63)

PKC pode ainda ser fosforilado recorrendo ao acetato de miristato de forbol (PMA), induzindo igualmente a diferenciação.(63)



**Fig. 11** Esquema demonstrativo da via de transdução de sinal do processo de diferenciação de oligodendrócitos. PKC é um indutor central que é ativado tanto por ROS, como ativa a produção dos mesmos, resultando em feedback positivo e em expressão de proteínas associadas à diferenciação. (63)

## 5.6 Neurogênese

Com o objetivo de compreender os mecanismos que influenciam a diferenciação neuronal, foi observado um modelo celular que é passível de reproduzir o processo de diferenciação em NSCs: células PC12. Os níveis de  $\beta$ III-tubulina e GAP-43 foram medidos para avaliar o progresso – proteínas características de neurónios. (66,67,68)

### 5.6.1 NGF

O fator de crescimento nervoso (NGF) é usado para induzir a diferenciação em células PC12. Após a indução, os ROS atuam como mensageiro secundário ao regular as principais vias de sinalização. Estes são produzidos principalmente pela mitocôndria, mas também pela NOX, após ativação de Rac1. (66,67) (Fig 11).

Nas células PC12, NGF começa por provocar a autofosforilação do TrkA, resultando na sua ativação e recrutamento de um conjunto de proteínas, as quais vai ativar: **Shc**,

fosforilando-a, e de seguida forma o complexo recetor TrkA-Shc-Grb2-Sos, que está ligado à via de sinalização MAP cinase (MAPK), através de Ras (proteína G), e **PLC $\gamma$** , que está ligado a PKC-Raf e que leva à ativação da via de sinalização Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2, ambas com fosforilação final de ERK. A fosforilação contínua de ERK resulta no desenvolvimento de características fenotípicas de neurónio diferenciado. O recetor TrkA ativa igualmente a via de sinalização PI3K-Akt, incumbida da sobrevivência celular e de diferenciação (1,65,66) e, por fim, o aumento do nível de fatores de transcrição como AP-1, que induzem igualmente a diferenciação celular. No seguimento da ativação do receptor TrkA, também decorre a ativação das NOX, necessárias para a fosforilação de ERK1/2 através da indução da ativação de PKC.

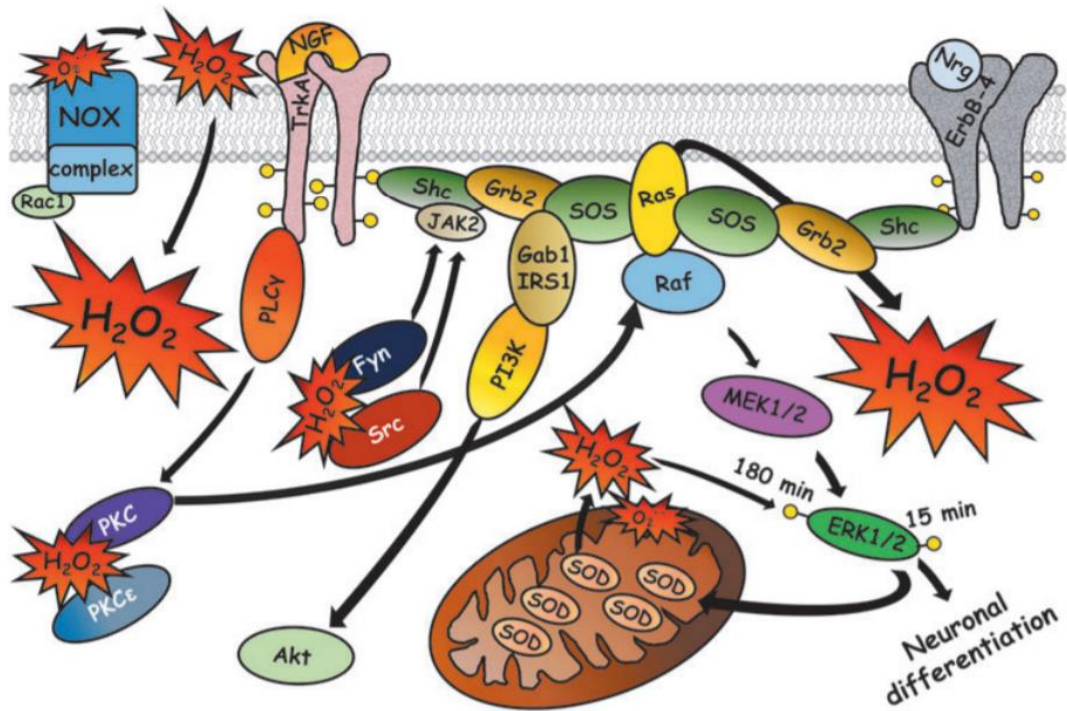
Inicialmente, NGF provoca a fosforilação de ERK1/2, contudo, a duração desta é reduzida. Este pico primário de fosforilação provoca um aumento na expressão e atividade de MnSOD, que por sua vez aumenta a conversão de superóxido em peróxido de hidrogénio que é indispensável na indução de um segundo pico de fosforilação de ERK1/2. Este segundo pico, de duração superior, é fundamental para o processo de diferenciação (inibição do segundo pico com glutathione peroxidase inibe totalmente a diferenciação) (67)

ROS gerado pelas NOX pode induzir a ativação de PKC, culminando na ativação de ERK1/2. ROS também pode ativar Fyn e/ou Src, utilizando a via de sinalização Jak2-Shc-Grb2-Sos-Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. NGF induz não só a produção de ROS, como de moléculas antioxidantes, cujo propósito ainda não compreendido. (67)

### **5.6.2 Nrg**

A neuregulina (Nrg) ativa o receptor ErbB-4, provocando a produção de ROS que por sua vez ativam a via de sinalização Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. A ativação de ERK e Ras é dependente da presença de ROS (53), e como tal, o processo de diferenciação também o será. A produção de ROS é regulada ativação de Ras, e esta última é regulada pela presença de ROS, resultando num efeito de feedback positivo entre a ativação de Ras e produção ROS. A ativação sustentada de Erk1/2 por ROS induz a diferenciação neuronal. (1)



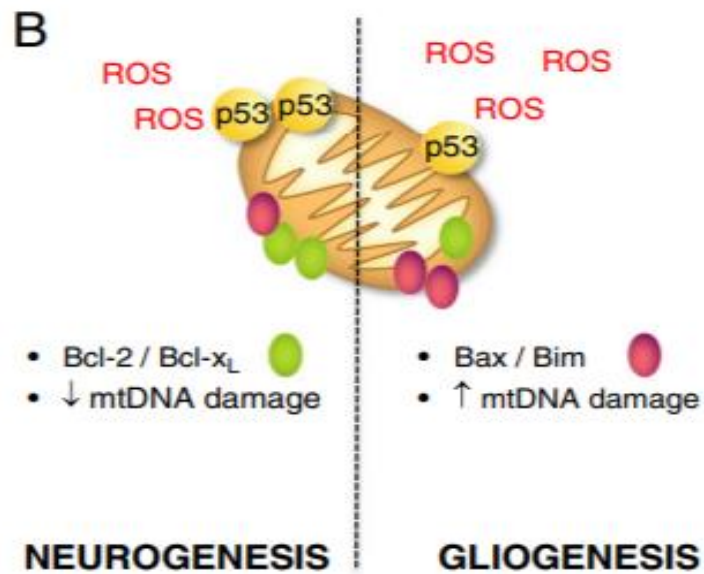


**Fig. 12** Resumo das vias de sinalização referentes à diferenciação neuronal (36)

## 5.7 Astrogliogênese

As reações de oxidação-redução podem modular a linhagem celular e ter impacto directo sobre o seu futuro. O processo de diferenciação acaba por se iniciar através de p53, que medeia o aumento do metabolismo aeróbio mitocondrial (através da atividade do seu fator de transcrição nuclear) (64), da massa mitocondrial e capacidade antioxidante, e por fim, regula os níveis de DNA mitocondrial (mtDNA) danificado (ou oxidado) através do controlo dos níveis de ROS. A quantidade de mtDNA oxidado depende tanto dos níveis de p53 como da sua localização mitocondrial. Assim, uma mudança no estado redox com consequente aumento na fração de mtDNA oxidado tem influência na linhagem celular – há uma preferência pela astrogliogênese ao invés da neurogênese.(68) A sua reparação é efetuada pela 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) que é igualmente importante para a sobrevivência celular. A expressão de OGG1 está associada à neurogênese uma vez que na sua presença a quantidade de mtDNA oxidado será menor. Diminuição dos níveis de OGG1 resulta em astrogliogênese com ativação da SIRT1 através do aumento do balanço de espécies oxidadas face às reduzidas de NAD/NADH. (69)

Há também um envolvimento da família Bcl-2 na neurogênese e na astrogliogênese. Esta família está tipicamente associada às vias apoptóticas mas cada vez mais é ligada aos mecanismos de diferenciação. Este processo surge através do Bcl-xL, que promove a neurogênese e regride a astrogliogênese. De forma contrária, a expressão de Bax é coincidente com a astrogliogênese e a sua redução demonstrou não qualquer efeito na neurogênese. Assim, a linhagem celular é escolhida consoante o balanço de proteínas da família Bcl-2 (Bcl-xL / Bax), como indicado na Fig 11.(64,70,71)



**Fig. 13** Resumo de fatores preponderantes na diferenciação de NSCs em astrócitos. A linhagem celular é escolhida consoante o balanço de proteínas da família Bcl-2 e de mtDNA oxidado. (64)

## 6 Conclusões

Foi estudada a forma como espécies reativas de oxigénio (ROS), tendencialmente associadas a patologias degenerativas, têm um verdadeiro impacto na sinalização celular, ou seja, de que forma é que os ROS afetam as vias de transdução de sinal, fazendo com que a célula siga uma determinada linhagem. Para isso, recorri à bibliografia disponível.

A diferenciação de NSCs está dependente de um conjunto vasto de mecanismos que, entre todos, regulam o ambiente redox celular. O desajuste de um deles, poderá levar à morte celular ou seguimento de uma nova linhagem de diferenciação.

Como tal, é importante ampliar o estudo sobre os astrogliogénese e o seu processo de diferenciação dependente de ROS, assim como investigar recetores membranares que tenham impacto direto na diferenciação ao modular a homeostasia redox além dos mencionados na monografia. Era igualmente interessante perceber qual a razão pela qual o NGF induz não só a produção de ROS, como de moléculas antioxidantes cujo propósito ainda não foi compreendido.

## Referências Bibliográficas

1. Olguín-Albuerne M, Morán J. Redox Signaling Mechanisms in Nervous System Development. *Antioxidants Redox Signal*. 2018;28(18):1603–25.
2. Ostrakhovitch EA, Semenikhin OA. The role of redox environment in neurogenic development. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013;534(1–2):44–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.08.002>
3. Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6387–92.
4. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*. 2006;26(30):7907–18.
5. Bórquez DA, Urrutia PJ, Wilson C, Van Zundert B, Núñez MT, González-Billault C. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development. *J Neurochem*. 2016;137(4):506–17.
6. Dodson M, Anandhan A, Zhang DD, Madhavan L. An NRF2 Perspective on Stem Cells and Ageing. *Front Aging*. 2021;2(June):1–15.
7. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, DeLeo AM, Pastrana E, et al. Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* [Internet]. 2014;82(3):545–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.039>
8. Mich JK, Signer RAJ, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, Vue TY, et al. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife*. 2014;2014(3):1–27.
9. Prozorovski T, Schneider R, Berndt C, Hartung HP, Aktas O. Redox-regulated fate of neural stem progenitor cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2015;1850(8):1543–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.01.022>
10. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FHH. In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2+

- Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):515–28.
11. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. 2008;132(4):645–60.
  12. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981–90.
  13. Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
  14. Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto KI, Tamura M, Nagano Y, et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*. 2015;56(1):1–7.
  15. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(Figure 1).
  16. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*. 2017;398(10):1095–108.
  17. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park A-M, Kira Y, Imada I, et al. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Curr Med Chem*. 2005;10(23):2495–505.
  18. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxidants Redox Signal*. 2013;19(6):595–637.
  19. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):657–70.
  20. Umeno A, Biju V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, and diabetes. *Free Radic Res*. 2017;51(4):413–27.
  21. Jones DP. Redox sensing: Orthogonal control in cell cycle and apoptosis

- signalling. *J Intern Med.* 2010;268(5):432–48.
22. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo Y Do. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells.* 2011;32(6):491–509.
  23. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758(8):994–1003.
  24. Formation of Reactive Oxygen Species and Cellular Damage – The Alcohol Pharmacology Education Partnership [Internet]. [cited 2021 Nov 13]. Available from: <https://sites.duke.edu/apep/module-5-alcohol-and-babies/biology-and-chemistry-connections/formation-of-reactive-oxygen-species-and-cellular-damage/>
  25. Zhao Z. Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer’s disease. *Aging Med.* 2019;2(2):82–7.
  26. Wang X, Quinn P. Vitamin E and its functions in biological membranes. *Prog Lipid Res.* 1999;38:309–36.
  27. Dröse S, Brandt U, Wittig I. Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2014;1844(8):1344–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.006>
  28. Zheng Y, Merchant ML, Merchant ML, Burke TJ, Ritzenthaler JD, Li M, et al. Redox States of Protein Cysteines in Pathways of Protein Turnover and Cytoskeleton Dynamics Are Changed with Aging and Reversed by Slc7a11 Restoration in Mouse Lung Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
  29. Spadaro D, Yun BW, Spoel SH, Chu C, Wang YQ, Loake GJ. The redox switch: Dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiol Plant.* 2010;138(4):360–71.
  30. Iqbal MA, Eftekharpour E. Regulatory Role of Redox Balance in Determination of Neural Precursor Cell Fate. *Stem Cells Int.* 2017;2017.
  31. Martins L, Trujillo-Hernandez JA, Reichheld JP. Thiol based redox signaling in plant nucleus. *Front Plant Sci.* 2018;9(May):1–9.
  32. Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. Redox potentials of glutaredoxins and

- other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein- protein redox equilibria. *J Biol Chem.* 1997;272(49):30780–6.
33. Noble M, Pröschel C, Mayer-Pröschel M. Oxidative-reductionist approaches to stem and progenitor cell function. *Cell Stem Cell.* 2011;8(1):1–2.
  34. Noble M, Mayer-Pröschel M, Pröschel C. Redox regulation of precursor cell function: Insights and paradoxes. *Antioxidants Redox Signal.* 2005;7(11–12):1456–67.
  35. Fike JR, Rosi S, Limoli CL. Neural Precursor Cells and Central Nervous System Radiation Sensitivity. *Semin Radiat Oncol* [Internet]. 2009;19(2):122–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2008.12.003>
  36. Coyoy A, Olgúin-Albuerne M, Martínez-Briseño P, Morán J. Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum. *Neurochem Int.* 2013;62(7):998–1011.
  37. Tsatmali M, Walcott EC, Makarenkova H, Crossin KL, Jay J, Drive H, et al. NIH Public Access. 2007;33(4):345–57.
  38. De Filippis L, Delia D. Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(17):2831–44.
  39. Vieira HLA, Alves PM, Vercelli A. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2011;93(3):444–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.007>
  40. Walton NM, Shin R, Tajinda K, Heusner CL, Kogan JH, Miyake S, et al. Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress. *PLoS One.* 2012;7(4).
  41. Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou M V., Elia AJ, Dinsdale D, et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* 2016;23(9):1502–14.
  42. Justyna W. *Physiol Behav.* 2017;176(5):139–48.
  43. Khacho M, Clark A, Svoboda DS, Azzi J, MacLaurin JG, Meghaizel C, et al. Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by

- Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016;19(2):232–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.015>
44. Ahn S, Joyner AL. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature*. 2005;437(7060):894–7.
  45. Cole LA. Adenosine Triphosphate Energetics. *Biol Life*. 2016;(Chapter 5):65–77.
  46. Hendrix Sloane, Misuraca, & Moore A. NIH Public Access. *Bone*. 2013;23(1):1–7.
  47. Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, et al. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol*. 2008;10(4):385–94.
  48. Laaper M, Jahani-Asl A. Regulation of neural stem cell fate decisions by mitochondrial dynamics. *Neural Regen Res*. 2018;13(9):1548–9.
  49. Nayernia Z, Colaianna M, Robledinos-Antón N, Gutzwiller E, Sloan-Béna F, Stathaki E, et al. Decreased neural precursor cell pool in NADPH oxidase 2-deficiency: From mouse brain to neural differentiation of patient derived iPSC. *Redox Biol* [Internet]. 2017;13(April):82–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.026>
  50. Manuscript A, Manner A. Neural stem cell properties influenced by ROS levels through akt/pi3k pathway. 2012;8(1):59–71.
  51. Nagakannan P, Eftekharpour E. Differential redox sensitivity of cathepsin B and L holds the key to autophagy-apoptosis interplay after Thioredoxin reductase inhibition in nutritionally stressed SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017;108(January):819–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.005>
  52. Kahroba H, Ramezani B, Maadi H, Sadeghi MR, Jaberie H, Ramezani F. The role of Nrf2 in neural stem/progenitors cells: From maintaining stemness and self-renewal to promoting differentiation capability and facilitating therapeutic application in neurodegenerative disease. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2021;65:101211. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101211>



53. Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2017;69(3):393–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.12.011>
54. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2018;1865(5):721–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
55. E.-M. H, J.R. G, C. B, C. H, C.H. L. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants Redox Signal* [Internet]. 2013;19(13):1539–605. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013672535>
56. Sies H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: Redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;289(13):8735–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>
57. Zhang Y, Park J, Han SJ, Yang SY, Yoon HJ, Park I, et al. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling. *Redox Biol* [Internet]. 2020;34(May):101553. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101553>
58. Cell S, Program B, Graham J, Cancer B. *Apid Ommunication* ®. 2003;363–71.
59. Deleidi M, Cooper O, Hargus G, Levy A, Isacson O. Oct4-induced reprogramming is required for adult brain neural stem cell differentiation into midbrain dopaminergic neurons. *PLoS One*. 2011;6(5).
60. Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits wnt-β-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol*. 2006;8(5):501–8.
61. Rharass T, Lemcke H, Lantow M, Kuznetsov SA, Weiss DG, Panáková D. Ca<sup>2+</sup>-mediated Mitochondrial Reactive Oxygen Species Metabolism Augments Wnt/β-Catenin Pathway Activation to Facilitate Cell Differentiation.

- J Biol Chem. 2014;289(40):27937–51.
62. Haack F, Lemcke H, Ewald R, Rharass T, Uhrmacher AM. Spatio-temporal Model of Endogenous ROS and Raft-Dependent WNT/Beta-Catenin Signaling Driving Cell Fate Commitment in Human Neural Progenitor Cells. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(3):1–28.
  63. Accetta R, Damiano S, Morano A, Mondola P, Paternò R, Avvedimento E V., et al. Oxygen species derived from NOX3 and NOX5 drive differentiation of human oligodendrocytes. *Front Cell Neurosci*. 2016;10(JUN):1–17.
  64. Solá S, Morgado AL, Rodrigues CMP. Death receptors and mitochondria: Two prime triggers of neural apoptosis and differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(1):2160–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.021>
  65. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(3):381–91.
  66. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action Patapoutian and Reichardt 273 Trk-mediated signaling. 2001;272–80.
  67. Cassano S, Agnese S, D'Amato V, Papale M, Garbi C, Castagnola P, et al. Reactive oxygen species, Ki-Ras, and mitochondrial superoxide dismutase cooperate in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem*. 2010;285(31):24141–53.
  68. Park J, Wang P, Matsumoto T, Sung HJ, Choi JW, Anderson SA, et al. NIH Public Access. 2010;105(7):705–12.
  69. Wang W, Esbensen Y, Kunke D, Suganthan R, Rachek L, Bjørås M, et al. Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate. *J Neurosci*. 2011;31(26):9746–51.
  70. Liste I, García-García E, Bueno C, Martínez-Serrano A. Bcl-XL modulates the differentiation of immortalized human neural stem cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(11):1880–92.
  71. Krajewska M, Mai JK, Zapata JM, Ashwell KW, Schendel SL, Reed JC, et al. Dynamics of expression of apoptosis-regulatory proteins Bid, Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak during development of murine nervous system. *Cell Death Differ*.

2002;9(2):145–57.