



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
MORFOLÓGICAS

**LILIANE FONSECA BARBOSA**

**“O ACOPLAMENTO CELULAR E A DEFINIÇÃO DE  
COMPARTIMENTOS NA ZO NA VENTRICULAR DO  
TELENCÉFALO EMBRIONÁRIO DO RATO”**

TESE APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO COMO PRÉ -REQUISITO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

RIO DE JANEIRO  
AGOSTO  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LILIANE FONSECA BARBOSA**

**O ACOPLAMENTO CELULAR E A DEFINIÇÃO DE  
COMPARTIMENTOS NA ZONA VENTRICULAR DO  
TELENCÉFALO EMBRIONÁRIO DO RATO**

TESE APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PRÉ-REQUISITO À  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

Orientadores: Prof. João Ricardo Lacerda de Menezes  
Profa. Maira Monteiro Fróes

Rio de Janeiro  
Agosto  
2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

FONSECA, Liliane.

O ACOPLAMENTO CELULAR E A DEFINIÇÃO DE COMPARTIMENTOS NA ZONA VENTRICULAR DO TELAÇO CÉFALO EMBRIONÁRIO DO RATO / LILIANE FONSECA BARBOSA . RIO DE JANEIRO , 2007.  
xii, 101 f

Orientador: Prof. João Ricardo Lacerda de Menezes  
Orientadora: Maira Monteiro Fróes

Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas) – UFRJ – Instituto de Ciências Biomédicas – Programa de Pós - Graduação em Ciências Morfológicas, 2007.

1. Comunicação juncional. 2. Subdivisões telencefálicas. 3. Zona Ventricular. I. Menezes, João Ricardo. II. Fróes, Maira Monteiro. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós - Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Título.

**LILIANE FONSECA BARBOSA**

O ACOPLAMENTO CELULAR E A DEFINIÇÃO DE COMPARTIMENTOS NA ZONA VENTRICULAR DO  
TELENÉFALO EMBRIONÁRIO DO RATO ”

TESE APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PRÉ-REQUISITO À  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

Aprovada por:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Prof. Vivaldo Moura Neto  
Presidente da Banca

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Prof. João Ricardo Lacerda de Menezes  
Membro

Prof a. Dr. \_\_\_\_\_  
Prof a. Helena Araújo  
Revisora e suplente

Prof a. Dr. \_\_\_\_\_  
Prof a. Cláudia Batista  
Membro

Prof a. Dr. \_\_\_\_\_  
Prof a. Cristiane del Corso  
Membro

Prof a. Dr. \_\_\_\_\_  
Prof a. Cecília Hedin Pereira  
Membro

Aos meus pais,  
Cléo e Carmem.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha existência e pelos amigos que nela tenho encontrado, enquanto sigo tentando aprender a ser e viver, neste mundo de tantos descaminhos.

Em meio a tantas pessoas que me despertam alegria, uma delas suplanta em muito todas as outras, mesmo que involuntariamente. Trata-se da minha filha Júlia, que a cada dia me dedica seu amor, genuíno e despretensioso. Obrigada, Juju, por ser meu raio de sol.

Muito do nosso existir é efêmero. Muitos sentimentos se extinguem e deixam apenas lembranças borradas, perdidas no espaço-tempo da vida. Mas, às vezes, o amor acontece e quer permanecer em nós, indelével, indissociável de nós mesmos. Agradeço ao meu marido, Alexandre, principalmente porque me faz ter a certeza de que o amor vale a pena.

Agradeço aos meus pais, Carmem e Cléo, por desde muito cedo terem me ensinado a importância do amor e da família, além de terem sido meus mais entusiasmados incentivadores, na busca diária pelo conhecimento.

Agradeço ao meu orientador, João Ricardo, por fazer de minha jornada científica uma experiência pitoresca e bem-humorada. Obrigada por estar sempre disposto a colaborar e por elucidar minhas dúvidas, que surgem a todo momento. Mas, chefe, sobretudo, te considero um amigo e espero que possamos nos encontrar pela vida.

Obrigada à Maira, minha co-orientadora, por ter colaborado, em momentos árduos, para a realização desta tese. Agradeço por seu olhar criterioso e imparcial. Obrigada à Cecília, pelos comentários positivos e pela torcida.

Aos amigos do Laboratório de Neuroanatomia Celular, um agradecimento todo especial, carregado de ternura, afeto. Galera, vocês são capazes de alegrar os dias mais nebulosos. Espertos, descolados, sensíveis, “bem informados” e ... amigos. Vocês têm lugar cativo no meu coração! Obrigada por todo incentivo. A saudade vai ser grande...

Agradeço ao Adiel, nosso bioterista, pela ajuda com os animais.

**Liliane Fonseca Barbosa**

**O ACOPLAMENTO CELULAR E A DEFINIÇÃO DE COMPARTIMENTOS NA ZONA VENTRICULAR DO TELENCEFALO EMBRIONÁRIO DO RATO**

Tese de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas (Neurobiologia do Desenvolvimento), Departamento de Anatomia, no Instituto de Ciências Biomédicas Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas (Neurobiologia do desenvolvimento).

Esta tese foi desenvolvida, no Laboratório de Neuroanatomia Celular, sob a orientação do Prof. João Ricardo Lacerda de Menezes e co-orientação da Prof.<sup>a</sup> Maira Monteiro Fróes e contou com o apoio financeiro das seguintes entidades: CAPES, CNPq, CNPq/PRONEX, FAP ERJ, FUJB.

Rio de Janeiro  
2007

## RESUMO

FONSECA, Liliane Barbosa. O ACOPLAMENTO JUNCIONAL E A DEFINIÇÃO DE COMPARTIMENTOS NA ZONA VENTRICULAR DO TENCEFALO EMBRIONÁRIO DO RATO. Rio de Janeiro, 2007. Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

A comunicação juncional mediada por *gap junctions* é uma propriedade comum de precursores neurais e foi relacionada à formação de rombômeros, segmentos do tronco encefálico em desenvolvimento. Neste trabalho pretendemos investigar se o acoplamento celular mediado por estes canais pode estar envolvido no estabelecimento ou manutenção das principais subdivisões telencefálicas – córtex e corpo estriado. Estudamos principalmente a fronteira córtico-estriatal, entre as porções ventral (corpo estriado) e dorsal (córtex cerebral) da zona ventricular (VZ) do telencefalo. Para tanto, utilizamos a técnica de *transection loading* para demonstrar o padrão de acoplamento celular *in situ* nas camadas germinativas do telencefalo de ratos embrionários E15 -E19. Verificamos a presença de uma barreira ao acoplamento entre a VZ cortical e estriatal; com uma atenuação desta ao final do período neurogenético do Ctx (E19). Em ensaios de reagregação, combinações celulares homotípicas (púras; Ctx+ Ctx, GE + GE) mostraram intensa transferência de corante permeante de junções comunicantes; enquanto que em combinações heterotípicas (mistas; Ctx + GE) tal evento foi fortemente reduzido. Esses achados indicam que, embora o acoplamento celular esteja presente dentro de cada compartimento telencefálico, ele é inibido entre eles através de um mecanismo celular autônomo. A distribuição das conexinas 26 e 43 foi homogênea entre estes compartimentos germinativos. Isto reduz a possibilidade de que diferenças no repertório de conexinas expressas pudessem responder pela restrição ao acoplamento juncional entre estes domínios. Nossos achados revelam a presença de uma barreira funcional que, embora ainda de natureza desconhecida, atenua ou impede o acoplamento celular entre os domínios das zonas ventriculares cortical e estriatal. Esta barreira não parece ser determinada por fatores locais na borda córtico-estriatal, mas pode ser decorrente de uma modulação do acoplamento juncional por características celulares distintas de cada compartimento germinativo. A notável restrição na transferência de corantes na borda córtico-estriatal sugere que, num modo similar àquele do desenvolvimento rombomérico, o acoplamento celular contribui para o estabelecimento dos diferentes compartimentos neurogênicos no eixo dorsoventral da vesícula telencefálica embrionária.

## ABSTRACT

FONSECA, Liliane Barbosa. CELL COUPLING AND THE DEFINITION OF COMPARTMENTS IN THE TELECEPHALIC VENTRICULAR ZONE OF EMBRYONIC RATS. Rio de Janeiro, 2007. Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Gap junction mediated cellular communication is a common characteristic of neural precursors, and was shown to be involved in the formation of rhombomeres. In this work we intend to investigate if cell coupling is also involved in the either establishment or maintenance of the major telencephalic subdivisions – cortex and *striatum*. Our focus is in the cortico-striatal border, a frontier between the ventral (*striatum*) and dorsal (cerebral cortex) domains of the ventricular zone (VZ) of the developing telencephalon. We have employed the “transection loading” method to reveal the “in situ” pattern of cellular dye coupling within the germinal layers of the telencephalon of embryonic rats aged between E15 -E19. We have demonstrated an acute barrier for cell coupling between the cortical (Ctx) and striatal (GE) ventricular zones; that dwindles by the end of the neurogenetic period of the cerebral cortex (E19). In a reaggregation assay, pure dissociated VZ cells from either Ctx or GE showed intense dye coupling, while in mixed aggregates (Ctx and GE) dye coupling was strongly reduced. Together these data indicate that although cell coupling is present within each telencephalic compartment, it is inhibited between them in a cell autonomous manner. The expression of connexins 26 and 43 was homogenous between these germinal compartments. This reduces the possibility that differences in the repertory of connexins could trigger the restriction to the junctional coupling between Ctx and *striatum* anlagen. Our data reveal the presence of a functional barrier that attenuates or prevent cellular coupling between cortical and striatal VZ domains. This barrier, does not seem to be determined by local factors at the cortico-striatal border, but may be due to a modulation of junctional coupling by distinct cellular features, unique to each germinal compartment. The remarkable restriction of dye transfer at the cortico-striatal border suggests that, in a similar manner as rhombomere development, cell coupling contributes to the establishment of different compartments within dorsoventral axis of the embryonic telencephalic vesicle.

## Lista de Abreviaturas

AJ – acoplamento juncional  
BrdU - bromodeoxiuridina  
cad-6 – caderina -6  
CGE – eminência ganglionar caudal  
CP – placa cortical  
Ctx – córtex cerebral  
DAPI - 4',6' -diamidina -2' -fenilindol  
FCE – fronteira córtico -estriatal  
GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GFAP – proteína acídica fibrilar glial  
GFP – proteína fluorescente verde  
IZ – zona intermediária  
LGE – eminência ganglionar lateral  
LY – Lucifer Yellow  
MCS – meio de cultura com soro  
MGE – eminência ganglionar medial  
MSS – meio de cultura se m soro  
MZ – zona marginal  
PBS – solução salina tamponada com fosfato  
PFA - paraformaldeído  
Rcad – R-caderina  
RD – Rodamina Dextrana  
sey/sey – animais mutantes PAX6 -/-  
SFB – soro fetal bovino  
SNC – sistema nervoso central  
SSG – solução salina Gey's  
SVZ – zona subventricular  
SVZa – zona subventricular anterior  
TA – temperatura ambiente  
VZ – zona ventricular  
 $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup> - livre de Ca<sup>2+</sup>

# Sumário

<b>1. <u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	.01
1. 1. FORMAÇÃO DO TELENCEFALO .....	.01
1. 1. 1. Camadas Geminativas .....	03
1. 1. 1. 1 . Zona Ventricular .....	04
1. 1. 1. 2 . Zona Subventricular .....	08
1. 1. 2. Desenvolvimento do Córtex Cerebral .....	10
1. 1. 3. Desenvolvimento do Corpo Estriado .....	12
1. 2. MIGRAÇÃO CELULAR .....	13
1. 2. 1. Mecanismos Celulares de Migração Radial .....	14
1. 2. 2. Mecanismos Celulares de Migração Tangencial .....	14
1. 3. COMPARTIMENTALIZAÇÃO NO SNC DE VERTEBRADOS .....	15
1. 3. 1. Segmentação .....	16
1. 3. 2. Rombômeros .....	17
1. 3. 3. Prosômeros .....	20
1. 4. REGIONALIZAÇÃO NOS DOMÍNIOS TELENCEFÁLICOS .....	22
1. 4. 1. Aspectos Histológicos e Celulares da Fronteira Córtico -Estriatal .....	23
1. 4. 2. Regionalização Gênica da Zona Ventricular .....	25
1. 5. PADRONIZAÇÃO DO TELENCEFALO E MIGRAÇÃO CELULAR .....	29
1. 6. O ACOPLAMENTO JUNCIONAL .....	32
1. 6. 1. O Acoplamento Juncional durante o Desenvolvimento .....	36
1. 6. 2. Acoplamento Juncional e a Zona Ventricular .....	37
<b>2. <u>OBJETIVOS</u></b> .....	44
2. 1. O OBJETIVO GERAL .....	44
2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	45
3. 1. ANIMAIS .....	45
3. 2. CARREGAMENTO POR TRANSECÇÃO .....	45
3. 3. ENSAIO DE REAGREGAÇÃO CELULAR .....	49

3. 4. IMUNO -HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CONEXINAS .....	52
<b>4. RESULTADOS</b> .....	55
4. 1. CARREGAMENTO POR TRANSECÇÃO .....	55
4. 2. ENSAIO DE REAGREGAÇÃO CELULAR .....	64
4. 3. IMUNO -HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CONEXINAS .....	67
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	70
5. 1. CARREGAMENTO POR TRANSECÇÃO COMO FORMA DE REVELAR O ACOPLAMENTO CELULAR MEDIADO POR JUNÇÕES COMUNICANTES .....	70
5. 2. MECANISMOS DE PADRONIZAÇÃO DO SNC E COMUNICAÇÃO JUNCIONAL.....	73
5. 3. PERMEABILIDADE JUNCIONAL NA BORDA CÓRTICO -ESTRIATAL.....	77
5. 4. ACOPLAMENTO JUNCIONAL E O CURSO TEMPORAL DA ATIVIDADE NEUROGÊNICA DA GLIA RADIAL NO TELENCEFALO .....	78
5. 5. SEGREGAÇÃO CELULAR E ACOPLAMENTO JUNCIONAL RESTRITO ENTRE VZs DE CÓRTEX E STRIATUM NÃO DEPENDEM DE BARREIRA ESTRUTURAL .....	80
5. 6. A COMUNICAÇÃO JUNCIONAL CONTRIBUI PARA A GERAÇÃO DOS VARIADOS SUBTIPOS NEURONAIS DO TELENCEFALO? .....	82
5. 7. ACOPLAMENTO JUNCIONAL FORA DAS CAMADAS GERMINATIVAS .....	82
5. 8. RESTRIÇÃO AO ACOPLAMENTO NO TELENCEFALO NÃO PARECE SER DECORRENTE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CONEXINAS .....	84
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## **1. INTRODUÇÃO**

Durante o desenvolvimento neural dos vertebrados, protuberâncias e sulcos são formados de um modo ordenado na parte anterior do tubo neural, estrutura primordial embrionária que dá origem ao Sistema Nervoso Central (SNC) e que antecede o estabelecimento das subdivisões anatômicas cerebrais. Algumas dessas subdivisões parecem ser compartimentos de linhagens celulares restritas. É o caso dos segmentos observados no rombencéfalo e no prosencéfalo – neurômeros, respectivamente denominados rombômeros e prosômeros (Fraser *et al.*, 1990; Puelles e Rubenstein, 1993). O estabelecimento de tais neurômeros como unidades metaméricas, além de contribuir para a formação da circuitaria neural cerebral, evita que as células já comprometidas com um fenótipo específico misturem-se randomicamente durante o desenvolvimento (Inoue *et al.*, 2000).

Os mecanismos de estabelecimento destes segmentos neurais a partir de um primórdio embrionário aparentemente homogêneo ainda são pouco compreendidos. Buscando trazer luz sobre este tema, o presente trabalho vem abordar as possíveis contribuições do acoplamento celular mediado por junções comunicantes, uma modalidade de interação celular, para a gênese de compartimentos cerebrais.

### **1. 1. FORMAÇÃO DO TELENCEFALO**

A vesícula prosencefálica, que é a porção mais rostral do tubo neural, origina o telencéfalo e o diencefalo. A partir da vesícula telencefálica surgem o córtex cerebral e os núcleos da base, dentre outras estruturas. Estes dois grandes

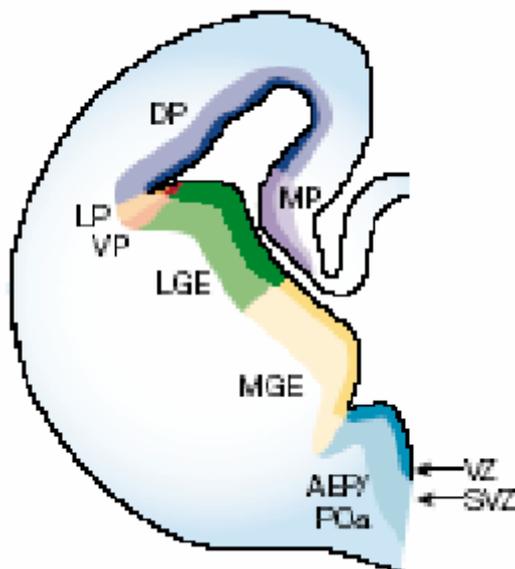


Figura 1. Subdivisões telencefálicas. O telencéfalo se divide em *pallium* e *subpallium*. O *pallium* subdivide-se em *pallium* medial (MP), dorsal (DP), lateral (LP) e ventral (VP). O *subpallium* se constitui pelas eminências ganglionares lateral (LGE) e medial (MGE). A borda córtico-estriatal localiza-se entre VP e LGE. Adaptado de Marin et al. (2001).

territórios do telencéfalo (córtex e núcleos da base), adjacentes ao longo do eixo dorso-ventral, originam-se das zonas germinativas do *pallium* (manto em latim) e *subpallium* (também chamadas de divisões cortical e subcortical, respectivamente; Fig.1). O primeiro se subdivide em *pallium* medial, dorsal, lateral e ventral, constituindo o telencéfalo dorsal e originando o córtex, dentre outras estruturas. O segundo forma a base do telencéfalo, gerando dentre outras estruturas o *pallidum* (globo pálido) e o *striatum* (corpo estriado – núcleo caudado + putâmen), os principais integrantes do conjunto de núcleos da base. *Pallidum* e *striatum* provêm das duas principais proeminências na parede do telencéfalo ventral embrionário, conhecidas como eminências ganglionares medial (MGE, *medial ganglionic eminence*, em inglês) e lateral (LGE, *lateral ganglionic eminence*, em inglês), respectivamente. O aparecimento destas eminências ocorre seqüencialmente durante o desenvolvimento, com a MGE surgindo subseqüentemente ao fechamento do tubo neural e a LGE pouco depois. Há ainda uma porção caudal da eminência ganglionar (CGE, do inglês *caudal ganglionic eminence*) (Nery et al., 2002; Xu et al.,

2004; Wonders e Anderson, 2005; Yozu *et al.*, 2005), definida como a região posterior onde MGE e LGE se fundem em uma estrutura única (Nery *et al.*, 2002). A CGE não será objeto de atenção no presente trabalho.

### **1. 1. 1. Camadas Germinativas**

Para que a partir do tubo neural sejam geradas estas estruturas complexas e com reconhecida importância funcional, o ponto inicial são as camadas germinativas. O primeiro território germinativo é a zona ventricular (VZ, *ventricular zone*, em inglês; Fig.1), que se caracteriza como um denso neuroepitélio pseudoestratificado. A VZ abriga, em primeira instância, os progenitores de todos os neurônios e células gliais do SNC (Boulder Committee, 1970). É, de um modo geral, uma camada pobre em células pós-mitóticas, já que assim que estas abandonam o ciclo celular, partem rumo a suas regiões-alvo (His, 1874; Angevine e Sidman, 1961).

Ainda durante o período embrionário e com funções adicionais à VZ surge uma população proliferativa secundária - a zona subventricular (SVZ, *subventricular zone*, em inglês; Fig.1) (Boulder Committee, 1970). A SVZ origina células gliais e neuronais, persistindo na idade adulta nos roedores (Altman, 1969; Luskin, 1993; Alvarez-Buylla e Lois, 1995; Doestch e Alvarez-Buylla, 1996; Brazel *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2003).

### 1. 1. 1. 1. Zona Ventricular

A zona ventricular constitui-se como um epitélio pseudoestratificado de células colunares com capacidade proliferativa (Fig.2). Suas células são densamente empacotadas, verticalmente orientadas e cumprem a fase M do ciclo mitótico perto do lúmen ventricular (Boulder Committee, 1970; Altman e Bayer, 1990; Götz e Huttner, 2005). As células ventriculares primordiais, também chamadas de células neuroepiteliais, apresentam típicas características epiteliais, como é o caso das junções oclusivas (do inglês *tight junctions*) e das junções aderentes (do inglês *adherens junctions*), e são altamente polarizadas ao longo de seu eixo apical-basal (Götz e Huttner, 2005).

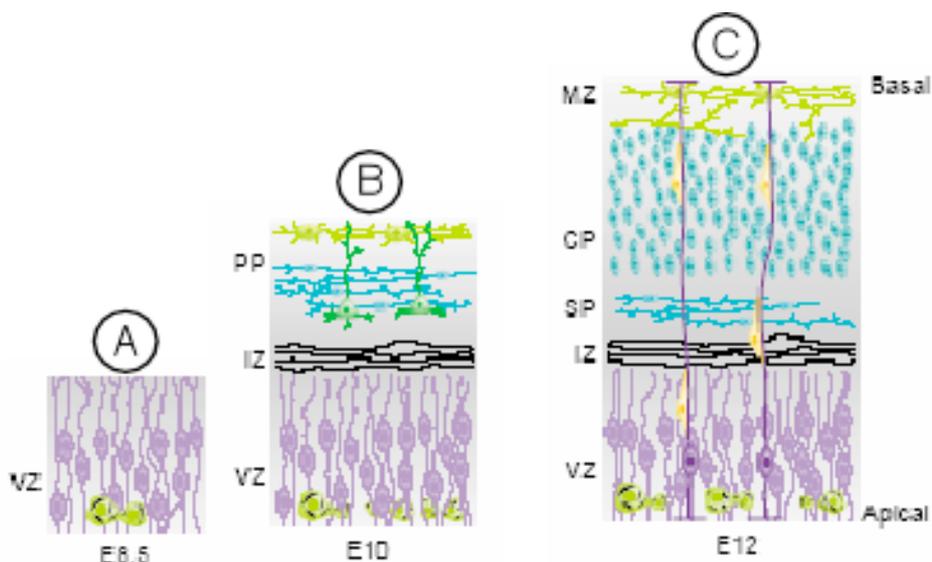


Figura 2. Histogênese do córtex cerebral. Em A, a zona ventricular (VZ) é composta apenas de células neuroepiteliais. Em B, note que as células da VZ submetem-se à migração nuclear intercinética e sofrem mitose na superfície ventricular. Os primeiros neurônios gerados formam a pré-placa (PP); seus axônios, assim como os aferentes tálamo-corticais estabelecem a zona intermediária (IZ) entre a VZ e a PP. Em C, os neurônios gerados subsequentemente constituem a placa cortical (CP). Eles migram sobre as fibras de glia radial, estabelecendo-se em meio à PP, o que acaba por dividi-la em zona marginal (MZ) e subplaca (SP). Adaptado de Campbell e Götz (2002).

A composição celular da VZ ainda não está completamente elucidada, mantendo-se como tema de grande polêmica. Inicialmente, alguns autores

postularam que haveria um progenitor específico para células gliais, estendendo prolongamentos para as superfícies ventricular e pial, e outro para neurônios, apresentando-se arredondado na superfície ventricular (His, 1904; Ramon y Cajal, 1952, Rakic, 2003). Outros sugeriram a existência de uma população única, com morfologias variadas, de acordo com a fase do ciclo celular (Schaper, 1897). A segunda hipótese foi favorecida por trabalhos que demonstraram que o DNA seria sintetizado na porção mais externa da VZ e que durante a prófase os núcleos descenderiam para a superfície ventricular e a célula tornar-se-ia arredondada pouco antes da divisão (Sauer, 1935; 1937; Angevine e Sidman, 1961; Sauer e Chittenden, 1959). Após a citocinese, as células-filhas que continuassem no ciclo estenderiam prolongamentos citoplasmáticos em direção à superfície pial e seus núcleos novamente mover-se-iam para a borda superior da VZ (Berry e Rogers, 1965). Em suma, os progenitores passariam por sucessivas mitoses, com seus núcleos transitando entre as bordas inferior e superior da VZ, conforme cruzassem as diferentes fases do ciclo celular – migração nuclear intercinética (Sauer, 1935).

A despeito destas evidências, uma distinção conceitual entre as longas células de glia radial - correspondentes aos progenitores com prolongamentos estendidos para as superfícies ventricular e pial - e as células neuroepiteliais resiste até os nossos dias (Gal *et al.*, 2006; Miyata *et al.*, 2001). As células neuroepiteliais gerariam células de glia radial a partir do início da neurogênese (Götz e Huttner, 2005). Esta transformação seria caracterizada por uma atenuação de certas características epiteliais (notavelmente, junções oclusivas, mas não junções aderentes) e a aparição de marcadores astrogliais (para uma revisão dos marcadores gliais típicos V. Malatesta *et al.*, 2003), como o transportador de glutamato específico de astrócitos (Glast, do inglês *glutamate astrocyte transporter*),

proteína acídica fibrilar glial (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*), proteína de ligação a lipídios cerebrais (BLBP, do inglês *brain lipid binding protein*) e vimentina. Além disso, células de glia radial apresentam grânulos de glicogênio, característicos da ultraestrutura de células astrogliais (Rakic, 1972). Embora sejam distintas molecular e morfológicamente em relação às células neuroepiteliais, as células de glia radial também realizam migração nuclear intercinética (Misson *et al.*, 1988; Noctor *et al.*, 2001).

A controvérsia persiste em publicações recentes, em que diferentes autores continuam discrepando quanto à constituição da VZ. Tradicionalmente, a glia radial era associada apenas ao suporte da migração radial e à geração de células gliais (Rakic, 1972). Todavia, seguidas publicações corroboraram a identidade neurogênica da glia radial (Fig.3), parecendo fazer sucumbir a idéia de que a glia radial atuaria apenas como agente coadjuvante na neurogênese (revisado em Götz *et al.*, 2002; Campbell e Götz, 2002; Rakic, 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que as células de glia radial apresentam um estágio neurogênico (Malatesta *et al.*, 2000; Noctor *et al.*, 2001; Miyata *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2004). A grande maioria dos neurônios do córtex proviria de glia radial, segundo achados recentes sugestivos de que a maioria ou mesmo a totalidade das células progenitoras da VZ cortical apresentariam características morfológicas, moleculares e eletrofisiológicas de glia radial (Noctor *et al.*, 2002; 2004). Vale ressaltar que esta contribuição à neurogênese parece variar em função do período de desenvolvimento embrionário e das regiões telencefálicas. A geração de neurônios a partir de glia radial na VZ das eminências ganglionares já estaria finalizada em E14,5 nos camundongos, enquanto que na VZ cortical ela ainda prosseguiria após esta data (Anthony *et al.*, 2004; Götz e Huttner, 2005). Desta forma, haveria uma homogeneidade no potencial neurogênico das

células de glia radial das diferentes regiões telencefálicas combinada com uma heterogeneidade na regulação temporal. Isto é, a glia radial das VZs do telencéfalo subcortical e do neocórtex estariam hábeis para gerar neurônios, embora em diferentes janelas temporais (Anthony *et al.*, 2004).

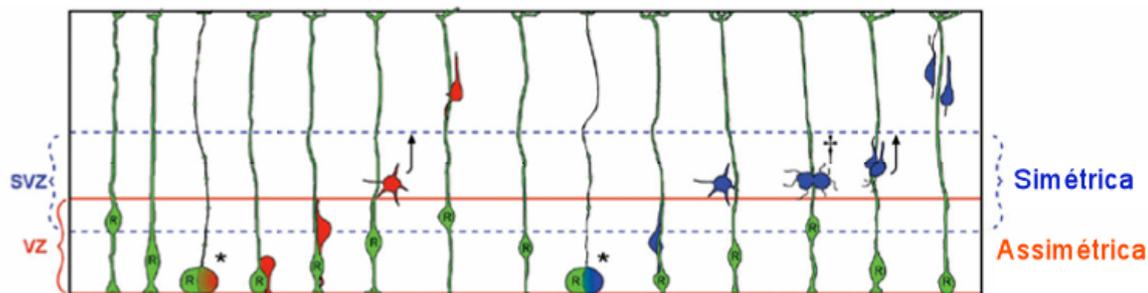


Figura 3. Esquema mostrando as diferentes localizações onde ocorrem as divisões neurogênicas assimétricas e simétricas. A glia radial neurogênica se divide assimetricamente na VZ para auto-renovação e geração direta (célula vermelha) ou indireta de neurônios através de uma célula progenitora intermediária (célula azul). As divisões simétricas finais ocorrem na SVZ. Adaptado de Noctor *et al.*, (2004).

Estudos realizados por Gal e cols (2006) apontam a existência de pelo menos duas classes celulares precursoras presentes concomitantemente na VZ. Tais classes celulares seriam distintas quanto a aspectos morfológicos, ultraestruturais e moleculares, sendo representadas por: longas células bipolares de glia radial, com o corpo celular na VZ e prolongamentos inseridos nas superfícies ventricular e pial; e células bipolares ancoradas na superfície ventricular, apresentando curtos prolongamentos ascendentes, contidos inteiramente na VZ (células precursoras neurais curtas). As células dessas duas classes exibem morfologias mitóticas distintas, já que as células precursoras curtas perdem seus prolongamentos basais, mantendo-se arredondadas na superfície ventricular, enquanto que as células de glia radial mantêm seus processos ascendentes durante a divisão mitótica (Miyata *et al.*, 2001). Vale ressaltar que precursores, ao realizar divisões mitóticas assimétricas e neurogênicas, apresentam um marcador molecular

específico - tis21 (Calegari e Huttner, 2003; Gotz e Huttner, 2005; Calegari *et al.*, 2005).

A VZ parece envolver logo após o nascimento (Tramontin *et al.*, 2003), tendo como remanescente no animal adulto a camada ependimária. As células ependimárias do adulto são pós-mitóticas e foram recentemente sugeridas como provenientes de glia radial (Spassky *et al.*, 2005).

### **1. 1. 1. 2. Zona Subventricular**

Essa zona proliferativa secundária surge logo após o início da formação da zona intermediária, situando-se entre esta e a VZ. Suas células são arredondadas ou ovais e não sofrem variações posicionais durante o ciclo mitótico, ou seja, não são submetidas à migração nuclear intercinética, como suas vizinhas, as células ventriculares (Boulder Committee, 1970).

As células subventriculares surgem a partir da mitose de células neuroepiteliais e/ou de glia radial na superfície apical da VZ (Fig.3; Noctor *et al.*, 2004). Tal transformação ocorre enquanto as células da VZ se preparam para cumprir a fase S: seus núcleos migram rumo à superfície basal da VZ e sua extensão apical sofre uma subsequente retração (Miyata *et al.*, 2004). Estas células deixariam a VZ durante a fase G2 já como células da população proliferativa secundária (Miyama *et al.*, 2001). A membrana plasmática das células da SVZ perdem contato apical e junções aderentes conforme tais células deixam a VZ e continuam sua atividade proliferativa como elementos móveis (Takahashi *et al.*, 1995b; Miyata *et al.*, 2004; Tabata *et al.* 2003).

Dados sugerem que os progenitores da SVZ são submetidos a divisões celulares simétricas e neurogênicas (Miyata *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2004; Haubensak *et al.*, 2004), e expressam o gene *tis21* (Haubensak *et al.*, 2004). Assim, o papel desses progenitores na neurogênese poderia ser ampliar o número de neurônios gerados pela VZ, através de um segundo período de atividade proliferativa, agora distante da superfície ventricular (Smart *et al.*, 2002; Haubensak *et al.*, 2004).

A SVZ é uma camada altamente dinâmica quanto a sua espessura: sofre uma expansão exponencial durante o período perinatal e uma dramática redução em estágios pós-natal tardios. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento é povoada por células pouco empacotadas, sendo identificada pela presença de figuras mitóticas abventriculares (Takahashi *et al.*, 1992). Em etapas mais avançadas no desenvolvimento, e após o nascimento, a SVZ se torna facilmente reconhecida, exibindo células densamente empacotadas (Altman, 1969).

Inicialmente, os progenitores localizados na SVZ foram relacionados apenas à gliogênese (Takahashi *et al.* 1995b; Altman e Bayer, 1990), mas nos últimos anos alguns achados os implicaram na neurogênese. Esses progenitores expressam marcadores específicos, como *Cux1/2* (Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004), *Svet1* (Tarabykin *et al.*, 2001), e *Tbr2* (Englund *et al.*, 2005), sendo os dois primeiros encontrados também nas camadas corticais supragranulares (II – IV). Desta forma, conforme sugerido por Smart e McSherry (1982), a SVZ parece realmente auxiliar a VZ na geração e especificação das camadas neocorticais. A VZ seria a origem dos neurônios de projeção destinados às camadas infragranulares (V e VI) - que são os primeiros a colonizar a placa cortical, enquanto que a SVZ daria conta dos neurônios

das camadas supragranulares (Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004; Tarabykin *et al.*, 2001).

As células subventriculares continuam proliferando no período pós-natal e na idade adulta, em córtex de mamíferos (Altman, 1969; Lois e Alvarez-Buylla, 1993). No entanto, os progenitores que povoam a SVZ mais tardiamente parecem originar-se na SVZ do *subpallium* (Anderson *et al.*, 2001; Stenman *et al.*, 2003; Pencea e Luskin, 2003; Merkle *et al.* 2004), e suas células migrarão em cadeia – corrente migratória rostral (Altman, 1969) - e estabelecer-se-ão como os neurônios granulares e periglomerulares do bulbo olfatório de roedores neonatos (Luskin, 1993) e adultos (Lois e Alvarez-Buylla, 1994).

### **1. 1. 2. Desenvolvimento do Córtex Cerebral**

No córtex cerebral, as células se organizam laminarmente, em camadas, variando de 3 camadas nas subdivisões mais primitivas como o arquicórtex (hipocampo) e paleocórtex (córtex olfatório) a 6 ou mais camadas no neocórtex. As camadas são distinguíveis por variações nas densidades e tamanhos dos corpos celulares no córtex cerebral (Krieg, 1946). Cada camada possui os dois principais tipos neuronais corticais – células piramidais e não-piramidais (Ramón y Cajal, 1911). Os neurônios piramidais são os neurônios corticais de projeção, conectando-o a estruturas corticais e subcorticais, e utilizam em geral um aminoácido excitatório, o glutamato, como neurotransmissor. São identificados facilmente pela forma de seus corpos celulares e por sua característica arborização dendrítica (Parnavelas, 1989). As células não-piramidais são interneurônios (em geral com axônios curtos) e contêm um neurotransmissor inibitório, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA,  $\gamma$ -amino-

butyric acid), e um ou mais neuropeptídeos (Parnavelas, 1989). Atualmente sabe-se que em roedores estes dois grandes grupos de neurônios são gerados a partir de regiões neurogênicas distintas, sendo que os interneurônios são gerados principalmente na região do *subpallium* (Fig.4; Wonders e Anderson, 2005).

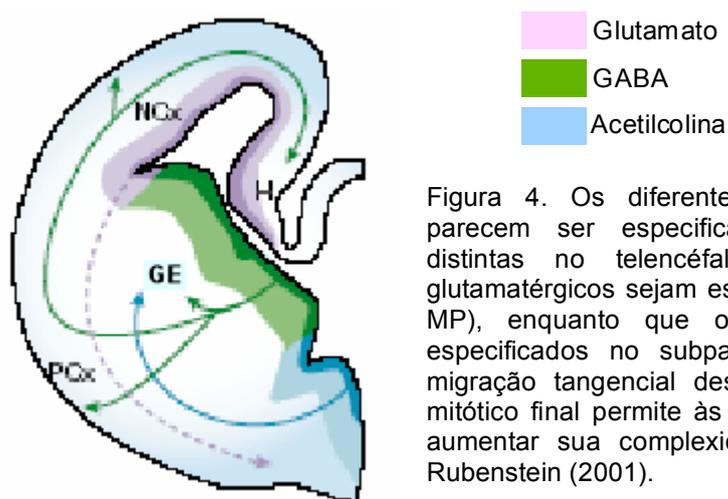


Figura 4. Os diferentes fenótipos de neurotransmissores parecem ser especificados em populações progenitoras distintas no telencéfalo. Sugere-se que os neurônios glutamatérgicos sejam especificados no pallium (VP, LP, DP e MP), enquanto que os gabaérgicos e colinérgicos são especificados no subpallium (LGE, MGE e AEP/POA). A migração tangencial destes neurônios ao seu destino pós-mitótico final permite às diferentes subdivisões do telencéfalo aumentar sua complexidade celular. Adaptado de Marin e Rubenstein (2001).

Na formação do córtex cerebral, a primeira leva de neurônios gerados na VZ migra rumo à superfície pial, estabelecendo-se logo abaixo desta e formando a pré-placa ou camada plexiforme primordial (Marin-Padilla, 1971). Entre a pré-placa e a VZ surge a zona intermediária, que comporta axônios aferentes e eferentes, e neurônios migratórios (Boulder Committee, 1970). Então, por volta do 15º dia de vida embrionária (em ratos), o contingente de neurônios que formará a placa cortical começa a migrar rumo à pia e estabelece-se em meio à pré-placa, acabando por dividi-la em zona marginal, porção imediatamente abaixo da superfície pial, e subplaca, abaixo da placa cortical (Marin-Padilla, 1978). Grande parte das células da zona marginal e da subplaca desaparecem no decorrer do desenvolvimento. As células remanescentes da zona marginal dão origem aos esparsos neurônios da camada I. O remanescente da subplaca contribui para a formação da camada VI e

origina neurônios intersticiais da substância branca. Os neurônios situados na placa cortical formarão as camadas II-VI.

A seqüência de formação das camadas neocorticais obedece um gradiente corticogênico “de dentro para fora” (Angevine e Sidman, 1961). Assim, os neurônios destinados à formação de uma dada camada atravessam as camadas previamente geradas, posicionando-se acima delas e abaixo da zona marginal.

Os neurônios juvenis migram radial ou tangencialmente (definições em seção à frente) em relação à superfície pial (Rakic, 1972; O'Rourke *et al.*, 1992, 1995). Uma vez estabelecida em sua região-alvo, ou mesmo enquanto trafega rumo a ela, o neurônio imaturo vai adequar seu fenótipo à função de sua competência, tornando-se diferenciado.

### **1. 1. 3. Desenvolvimento do Corpo Estriado**

O corpo estriado, principal componente dos núcleos da base, em contraste com o córtex, não apresenta uma histoarquitetura laminar. Seus neurônios podem ser divididos em dois compartimentos arranjados em um mosaico de sistemas neuroquímicos que estão relacionados a suas conexões neuroanatômicas: estriossomos ou manchas (do inglês “striosomes” ou “patches”) e matriz (Johnston *et al.*, 1990; Gerfen, 1982). Os neurônios desses dois compartimentos são gerados durante estágios diferentes do desenvolvimento (Van der Kooy e Fishell, 1987). Primeiramente, a partir de E13,5 nos ratos, são gerados os neurônios dos estriossomos, que vão constituir em parte a região pós-mitótica da LGE. A partir de E16, as células da matriz, originárias da SVZ estriatal, a qual supera a SVZ cortical em tamanho (Bhide, 1996), migram rumo aos primórdios do corpo estriado e

separam os neurônios dos estriossomos em grupos (Van der Kooy e Fishell, 1987). Essa migração massiva das células da matriz perdura por todo o período embrionário e elas acabam constituindo de 80-85% do corpo estriado maduro dos mamíferos (Johnston *et al.*, 1990). Dessa maneira, a SVZ estriatal é a camada germinativa preponderante para a formação dos núcleos da base, já que o influxo de células da matriz parece ser uma etapa crítica no estabelecimento da organização básica do corpo estriado (Anderson *et al.*, 1997; Hamasaki *et al.*, 2001). Esta hipótese é reforçada por achados que revelam que, em E14,5 (antes da migração de células da matriz), as células de glia radial do telencéfalo ventral já encerraram seu estágio neurogênico, o que implicaria a SVZ como fonte majoritária dos neurônios desta região (Anthony *et al.*, 2004).

Os neurônios de projeção estriatais são oriundos da LGE e constituem cerca de 90% das células do corpo estriado. A maioria deles usa o GABA como seu principal neurotransmissor, enquanto que os interneurônios estriatais - derivados da MGE e área entopeduncular anterior - utilizam a acetilcolina (Kawagushi *et al.*, 1995; Marin *et al.*, 2000).

## 1. 2. MIGRAÇÃO CELULAR

A divisão em compartimentos proliferativos e regiões pós-mitóticas obriga o neurônio jovem a cumprir uma etapa fundamental na construção das estruturas neurais: a migração celular.

A migração celular pode ocorrer em dois modos básicos, de acordo com a disposição das células migratórias em relação à parede do SNC e sua superfície pial: **radial** ou **tangencial**. Esta divisão não implica que um neurônio realize um

modo único de migração, tampouco que haja um mecanismo único para cada modo migratório.

### **1. 2. 1. Mecanismos Celulares de Migração Radial**

Neste modo migratório, acredita-se que na maioria das vezes as fibras de glia radial atuam como guias para os neurônios recém-gerados que buscam seu destino final através de migração radial (Rakic, 1972; 1978). Em alguns poucos casos, a migração radial pode acontecer de forma independente de glia radial (Nadarajah *et al.*, 2001), por mecanismos ainda não esclarecidos. No processo de migração neuronal radial, dependente da aposição entre glia radial e neurônio, uma regulação dinâmica de múltiplos eventos celulares como reconhecimento célula-célula, adesão, sinalização transmembrana e motilidade celular parece imprescindível (Rakic *et al.*, 1994; Anton *et al.*, 1996).

### **1. 2. 2. Mecanismos Celulares de Migração Tangencial**

Estudos com observação direta de células migratórias em fatias de córtex em desenvolvimento – por videomicroscopia de tempo intervalado - e análise de secções fixadas revelaram a presença de células migrando tangencialmente na zona intermediária (O'Rourke *et al.*, 1992; 1995). A íntima associação dos neurônios em migração tangencial com axônios corticofugais indica um modo migratório axonofílico (Denaxa *et al.*, 2001), ou seja, axônios desempenhando o papel de substrato migratório (Metin e Godement, 1996). Em adição a este mecanismo axonofílico, na migração tangencial, o direcionamento para o destino final – que envolve eventos

atratores e/ou repulsores – ocorreria também através de interações entre as moléculas presentes na matriz extracelular (pistas) e seus receptores, nas membranas plasmáticas dos neurônios migratórios (revisado em Marin e Rubenstein, 2001; Parnavelas, 2000).

### **1. 3. COMPARTIMENTALIZAÇÃO NO SNC DE VERTEBRADOS**

Durante o desenvolvimento de um organismo multicelular, as células não têm apenas de proliferar e diferenciar-se, mas precisam ainda organizar-se em diferentes tecidos. Em alguns tecidos, as células e seus descendentes são restritos a compartimentos, os quais se caracterizam como domínios de restrição de linhagem celular (Dahmann e Basler, 1999). A borda comum entre dois compartimentos adjacentes - fronteira compartimental - está relacionada à expressão gênica diferencial (Dahmann e Basler, 1999). O estabelecimento desta expressão gênica diferencial em grupos celulares distintos, em geral, advém da informação proveniente de gradientes de moléculas sinalizadoras – morfógenos – por sua vez estabelecidos a partir de eventos precoces que pré-padronizam o plano corporal ou estruturas específicas, dependendo do momento ontogenético (para revisão V. Wolpert, 1998 e Alberts *et al.*, 2001).

Em muitos casos, a resposta celular a um morfógeno faz-se de forma gradual. Assim, concentrações altas, intermediárias ou baixas do morfógeno podem conduzir as células-alvo a diferentes rotas de desenvolvimento. As células situadas a diferentes distâncias da origem do sinal receberiam diferentes informações posicionais, de acordo com a concentração do sinal a que fossem expostas e, então,

se comportariam diferencialmente durante o desenvolvimento (para revisão V. Alberts *et al.*, 2001).

A expressão gênica diferencial correlaciona-se também com a segregação celular, levada a cabo pela adesão celular seletiva, em que as células de compartimentos adjacentes segregam entre si em virtude de diferenças de adesividade (Dahmann e Basler, 1999). As células podem diferir qualitativa e/ou quantitativamente quanto à adesão, isto é, quanto ao repertório de moléculas de adesão expressos e/ou quanto ao nível de expressão de tais proteínas (para revisão V. Wolpert, 1998).

### **1. 3. 1. Segmentação**

A unidade morfogenética básica de embriões de insetos é um domínio transversal ou segmento (Lawrence, 1992). A identidade de cada segmento é determinada por sua posição ao longo do eixo ântero-posterior e é controlada pela expressão de genes homeobox – codificadores de fatores de transcrição contendo homeodomínio (McGinnis e Krumlauf, 1992). Esses genes codificam reguladores transcricionais de grupos específicos de genes alvo, os quais definem a via única de desenvolvimento de cada segmento individual (Rubenstein *et al.*, 1994).

É largamente aceito que este paradigma se aplica à organização dos somitos, do rombencéfalo - porção mais caudal do encéfalo - e dos arcos branquiais de vertebrados. Tal perspectiva é fundamentada na existência de homólogos dos genes homeobox nos vertebrados e nas características segmentais morfológicas e histológicas daquelas estruturas (Graham, 1992; McGinnis e Krumlauf, 1992).

### 1. 3. 2. Rombômeros

Ainda não se compreende muito claramente como a regionalização de um neuroepitélio aparentemente homogêneo é estabelecida e mantida durante o desenvolvimento do cérebro nos vertebrados. No entanto, o rombencéfalo se sustenta como um sistema-modelo nesta questão (Wizenmann e Lumsden, 1997).

A segmentação morfológica do rombencéfalo em nível rostrocaudal é aparente durante a embriogênese, quando ele se encontra subdividido em sete ou oito discretas unidades segmentais ou metaméricas - rombômeros - por constrictões na parede do tubo neural (Birgbauer e Fraser, 1994). Embora a existência dos rombômeros seja apenas transiente, eles ditam as bases que pressagiam a emergência da diversidade local no neuroepitélio do rombencéfalo (Lumsden, 1990).

Os rombômeros são regiões de restrição de linhagem celular. Por análise clonal via marcação intracelular, demonstrou-se que as células que constituem os rombômeros não transpõem as fronteiras entre eles. Quando uma célula é marcada durante ou após o aparecimento destas, seu clone resultante se espalha livremente dentro do rombômero de origem, mas não cruza as fronteiras interromboméricas (Fraser *et al.*, 1990). Outros trabalhos vieram reforçar a existência desse fenômeno (Lumsden, 1990; Lumsden e Krumlauf, 1996; Inoue *et al.*, 1997; Wizenmann e Lumsden, 1997).

Os genes homeóticos da família *Hox* parecem determinar o destino de cada unidade metamérica do rombencéfalo. Nestes segmentos, os precursores compartilham a expressão de uma combinação específica de genes *Hox*, os quais lhes conferem uma identidade unitária (Lumsden e Krumlauf, 1996).

No estágio embrionário em que as fronteiras interromboméricas tornam-se visíveis, a migração nuclear intercinética característica do neuroepitélio é reduzida, especificamente nas fronteiras. Os corpos celulares tendem a ficar retidos nas proximidades da superfície ventricular, criando uma região de baixa densidade celular acima deles (Lumsden e Keynes, 1989; Guthrie *et al.*, 1991).

Uma possível hipótese seria a participação das fronteiras como obstáculo físico, separando as células de territórios adjacentes. Contudo, não há evidências que sustentem esta hipótese. Parece mais provável que rombômeros adjacentes primeiramente adquiram identidades distintas para, através de suas miscibilidades diferenciais, conduzirem à geração das características de fronteira nas regiões de interface (Guthrie *et al.*, 1993).

Guthrie e cols (1993) demonstraram, através da técnica de transplante, que combinações de dois rombômeros pares ou dois ímpares não proporcionam a geração de barreira interrombomérica. Assim, por exemplo, a aposição entre os rombômeros 3 e 5, ou 3 e 3, levou à mistura entre suas células através da interface segmental. Vale ressaltar que a mistura celular foi mais extensiva em combinações de rombômeros idênticos (3 e 3) do que entre alternados (3 e 5). Todavia, a combinação entre rombômeros pares e ímpares (3 e 4) resultou na impossibilidade de transposição da fronteira interrombomérica. Este cenário sugere a participação da adesão seletiva na precoce segmentação do rombencéfalo.

De fato, quando células provenientes de rombômeros pares e ímpares são dissociadas e mantidas heterogeneamente (células de rombômeros pares e ímpares) em cultura de curto prazo, elas não tendem a agregar-se. Esta segregação também ocorre em culturas homogêneas (apenas células de rombômeros pares), mas numa taxa muito menor. Quando as células em cultura foram submetidas a um

tratamento que neutralizava as moléculas de adesão dependentes de cálcio, a segregação regional foi abolida. Estes achados sugerem que a afinidade celular específica restringe a mistura celular entre rombômeros adjacentes. Ela poderia, portanto, manter a compartimentalização decorrente de informação posicional anteroposterior durante o desenvolvimento do rombencéfalo (Wizenmann e Lumsden, 1997).

A análise do acoplamento elétrico intercelular e da transferência de corantes em pintos mostra que injeções iontoforéticas de biocitina ou Lucifer Yellow (LY) (corantes permeantes de junções comunicantes) em células dentro dos rombômeros foram seguidas de difusão transjuncional dos corantes para as células vizinhas. Contudo, quando as células injetadas localizavam-se nas fronteiras romboméricas não ocorria o espalhamento do corante. As áreas interromboméricas seriam locais de reduzida permeabilidade juncional durante o início da morfogênese (Martinez *et al.*, 1992).

Eventos de sinalização celular local também poderiam estar envolvidos no estabelecimento de segmentos romboméricos. Rombômeros ímpares expressam receptores tirosina cinases EPHA4, EPHB2 e EPHB3, enquanto que os rombômeros pares expressam seus ligantes, as efrinas B1, B2 e B3 (Irving *et al.*, 1996). Os receptores Eph e seus ligantes, as efrinas, medeiam interações de contato célula-célula, tendo como resultante um efeito de repulsão que guia células migratórias ou cones de crescimento neuronal aos seus destinos corretos (Mellitzer *et al.*, 1999). Os receptores Eph e as efrinas são expressos de forma complementar em muitos tecidos durante a embriogênese. Nas regiões de interface entre receptor e ligante, ou seja, na região de fronteira, eles interagem. Disso resulta uma transdução de sinal via fosforilação que pode regular respostas celulares (Brückner e Klein, 1998).

Sugere-se então que as interações efrinas-receptores tirosina cinase nas fronteiras romboméricas poderiam controlar a repulsão que restringe a mistura de células de rombômeros pares e ímpares. Isto foi substanciado pelo achado de que a ativação dos receptores EPH ou das efrinas leva as células romboméricas a segregarem (Xu *et al.*, 1999). Em experimentos envolvendo cultura de *animal caps* de embriões de *zebra fish*, injeção de permeantes juncionais fluorescentes e expressão ectópica de receptores Eph ou efrinas, a ativação bidirecional (há transdução de sinal nas duas células do par) proporciona um impedimento à associação entre células de populações adjacentes (Mellitzer *et al.*, 1999).

Há achados sugestivos de que a sinalização do sistema receptor EPH/efrinas influenciaria os níveis de acoplamento juncional. A ativação do sistema receptor EPH/efrinas, ainda que unidirecional, parece ser suficiente para restringir a comunicação através de junções comunicantes (Mellitzer *et al.*, 1999).

### **1. 3. 3. Prosômeros**

No prosencéfalo em desenvolvimento, de maneira similar à segmentação do rombencéfalo, unidades metaméricas contribuiriam para o estabelecimento de domínios funcionalmente distintos. O modelo prosomérico propunha, através da definição das divisões primárias dorso-ventrais, que o prosencéfalo estaria organizado em domínios longitudinais, os quais seriam paralelos ao eixo longitudinal do tubo neural (Fig. 5). Tais subdivisões seriam análogas às placas alar, basal, do teto e do assoalho da medula espinhal; todos os prosômeros seriam fracionados por elas. Além disso, o prosencéfalo seria subdividido em 6 domínios transversos, ditos prosômeros (Fig. 5), tomando por base a expressão ântero-posterior de distintos

grupos de moléculas regulatórias, que aparecem em janelas temporais específicas no desenvolvimento. O modelo foi substanciado pela análise da expressão de 30 genes de embriões de camundongo e de pinto, em diferentes estágios de desenvolvimento do tubo neural (Puelles e Rubenstein, 1993). O modelo prosomérico veio trazer significado morfológico aos numerosos padrões de expressão gênica vigentes no prosencéfalo, de maneira evolutivamente conservada. Cada subdivisão prosomérica transversa coincidiria com fronteiras de expressão de vários genes, muitos dos quais pertencentes à família *homeobox*. Dentre os genes analisados estão: *pax6*, *emx1*, *tbr1*, *otx2*, *ngn1/2*, *gsh1*, *dlx1/dlx2*, *mash1*, *vax1*, *nkx2.1*, *lhx6* e *shh*. Além disso, vários genes seriam expressos em regiões específicas de fronteira (Puelles e Rubenstein, 1993; Rubenstein *et al.*, 1994; Puelles e Rubenstein, 2003).

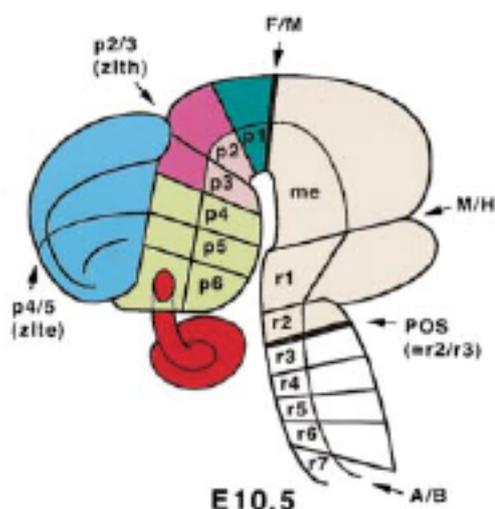


Figura 5. Possível distribuição de prosômeros e rombômeros no SNC de camundongos. Em verde escuro, o pré-TECTUM; em rosa escuro, componentes talâmicos dorsais; em verde claro, hipotálamo; em rosa claro, componentes talâmicos ventrais; em vermelho, nervo óptico e retina; em azul, telencéfalo. Note que a fronteira córtico-estriatal estaria localizada entre os prosômeros 4 e 5 (zlte). A/B, fronteira alar/basal; F/M, fronteira prosencéfalo/mesencéfalo; me, mesencéfalo; M/H, fronteira mesencéfalo/rombencéfalo; p, prosômeros; r, rombômeros; zlte, zona limitante intertelencefálica; zltH, zona limitante intertalâmica. Adaptado de Inoue *et al.* (2000).

Os prosômeros foram agrupados em duas grandes subdivisões transversas: o diencéfalo caudal (que inclui prosômeros de P1 a P3) e o prosencéfalo secundário – diencéfalo rostral e telencéfalo - (P4 a P6). A região ventral do prosencéfalo secundário seria o hipotálamo; as vesículas telencefálicas constituiriam seu aspecto dorsal (Puelles e Rubenstein, 1993; Rubenstein *et al.*,

1994). A borda entre o futuro córtex e o corpo estriado, zona limitante intertelencefálica ou borda córtico-estriatal, representaria a fronteira entre P4 e P5, que já existiria em E10,5 (Fig. 5; Inoue *et al.*, 2000).

Embora as zonas longitudinais estabelecidas pelo modelo prosomérico tenham sido largamente aceitas, algumas de suas premissas permaneceram controversas. Assim, questões como o número de prosômeros e sua natureza como segmentos, principalmente no prosencéfalo secundário traziam inquietude aos estudiosos da área. Isto porque esta região sofre deformação durante a evaginação telencefálica. Desta forma, anos depois, o modelo prosomérico foi modificado, com vistas a sanar tais contestações. Postula-se atualmente a existência de apenas 3 prosômeros, contidos no diencéfalo caudal (Puelles e Rubenstein, 2003). As fronteiras intratelencefálicas, que são curvilíneas (Puelles *et al.*, 2000), parecem não estar relacionadas às dimensões ântero-posterior e dorso-ventral do tubo neural (Puelles e Rubenstein, 2003). Assim, as subdivisões telencefálicas não poderiam ser consideradas segmentos análogos aos rombômeros, embora sejam claros domínios regionais que, à semelhança dos rombômeros, especificam tipos celulares e conexões específicas e distintas.

#### **1. 4. REGIONALIZAÇÃO NOS DOMÍNIOS TELECEFÁLICOS**

Dados provenientes de análise de linhagem celular utilizando retrovírus revelam que, mesmo antes do início da neurogênese, há uma especificação dos clones neurais em corticais ou estriatais (McCarthy *et al.*, 2001). Estudos utilizando o corante lipofílico Dil e a imunodeteção de  $\beta$ -tubulina III revelaram que as células da VZ movem-se extensamente no interior desta, no plano paralelo à superfície

ventricular. Contudo, essa dispersão tangencial é gradualmente restrita na borda entre as VZs cortical e estriatal, conforme os progenitores se aproximam da **fronteira córtico-estriatal** (FCE) (Fishell *et al.*, 1993). Além disso, células do córtex em desenvolvimento e células estriatais tendem a segregar-se em ensaios de reagregação celular, durante estágios iniciais do desenvolvimento (E14, no rato; E7/8, no pinto). Mas essa segregação parece findar em etapas mais avançadas (E18, no rato), quando tem início a gliogênese (Götz *et al.*, 1996).

Duas hipóteses gerais têm sido aventadas para a definição da borda córtico-estriatal: 1. A presença de uma barreira estrutural na região de fronteira; 2. A expressão diferencial de moléculas de matriz extracelular ou de adesão celular nos dois compartimentos telencefálicos.

#### **1. 4. 1. Aspectos Histológicos e Celulares da Fronteira Córtico-Estriatal**

A barreira estrutural seria formada por feixes de glia radial formando uma paliçada, a qual surgiria para guiar tangencialmente as células recém-geradas destinadas ao córtex ventrolateral através da zona intermediária e placa cortical (Smart e Sturrock, 1979; Misson *et al.*, 1991; Chapotoun *et al.*, 1999; fig. 6a). Tal paliçada se estabeleceria entre E15/17, quando fibras de glia radial coalesceriam na região da FCE, estendo-se desta para o córtex ventrolateral (Misson *et al.*, 1991). A posição específica dessa paliçada sugere seu papel na promoção da borda entre *pallium* e *subpallium*, embora tal paliçada se distinga daquelas presentes em regiões vizinhas apenas por sua maior densidade.

Uma densa agregação de células positivas para TuJ1 (anticorpo que reconhece um epítopo na  $\beta$ -tubulina III, presente em neurônio pós-mitóticos),

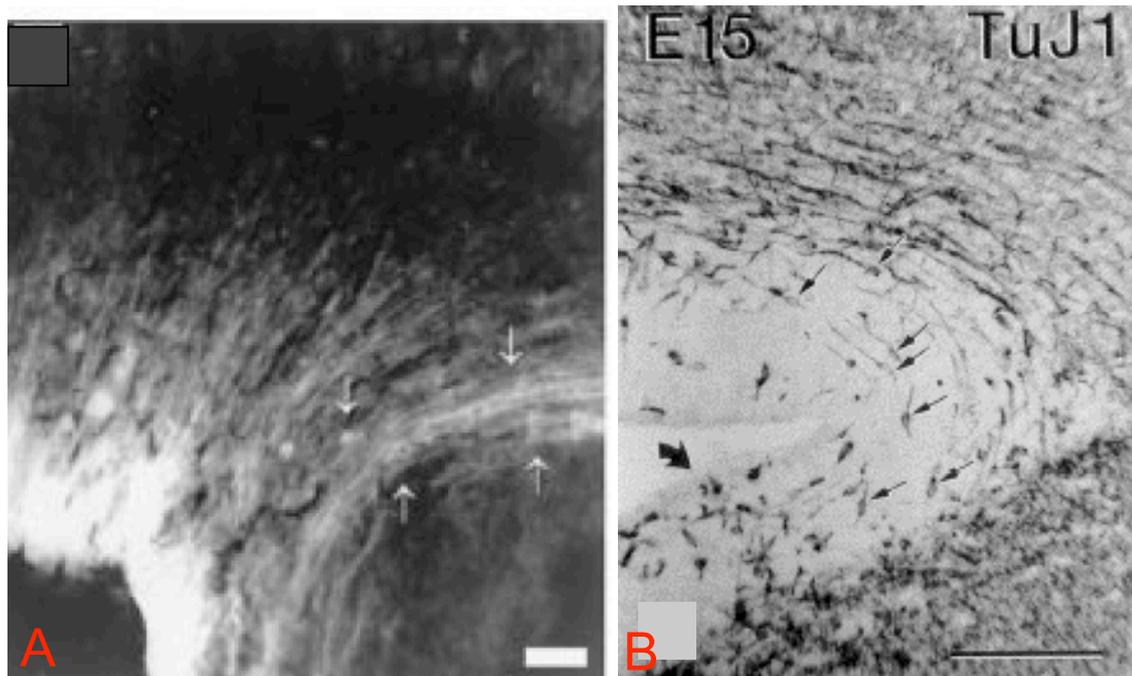


Figura 6. Elementos histoarquitetônicos aventados como possíveis colaboradores no estabelecimento e/ou manutenção da borda córtico-estriatal. A paliçada de fibras de glia radial (A; compreendida entre as setas) e as células TuJ1-positivas (B; seta larga) apresentam posicionamento sugestivo, na região da FCE. A é uma adaptação de Neyt *et al.*, 1997; B, de Menezes e Luskin, 1994.

posicionadas ventro-medialmente ao ângulo *caudatopallium* – flexura oriunda da elevação da eminência ganglionar contra a parede do *pallium* (Smart e Sturrock, 1979) - demarcou, entre E14 e E17 (camundongo), a borda entre as zonas ventriculares do córtex e do corpo estriado (Menezes e Luskin, 1994; Neyt *et al.*, 1997; fig. 6b). Essa disposição de neurônios pós-mitóticos na FCE reflete claramente uma compartimentalização do telencéfalo.

Apesar destas claras evidências de separação de ordem física entre as células das camadas germinativas de córtex e corpo estriado, não se observa um claro marco morfológico nessa fronteira compartimental.

#### 1. 4. 2. Regionalização Gênica da Zona Ventricular

A expressão diferencial de moléculas de matriz extracelular e de moléculas de adesão nos compartimentos telencefálicos está correlacionada com diferentes perfis de expressão gênica. A definição da borda córtico-estriatal far-se-ia principalmente pela expressão gênica diferencial entre os compartimentos telencefálicos, a qual conferiria diferentes identidades moleculares a estas regiões, i.e., expressão de diferentes fatores de transcrição (em sua maioria codificados por genes homeobox), moléculas sinalizadoras e moléculas de adesão.

Existe uma cooperação, ou complementariedade, entre os agentes moleculares que operam a padronização do telencéfalo. Assim, por exemplo, os genes *pax6* e *gsh2* cooperam, embora através de ações antagônicas, para o estabelecimento da FCE (Toresson *et al.*, 2000; Stoykova *et al.*, 2000).

O fator de transcrição Pax6 é altamente conservado entre as espécies (Gehring e Ikeo, 1999). A ausência da proteína Pax6 funcional, causada por uma mutação gênica pontual, gera anormalidades no olho, prosencéfalo, cerebelo e medula espinhal (Stoykova *et al.*, 1996). Dentre as anormalidades no prosencéfalo estão: taxas proliferativas aumentadas (Warren *et al.*, 1999), alterações histoarquitetônicas e na migração celular (Caric *et al.*, 1997; Chapouton *et al.*, 1999), adesão celular alterada (Stoykova *et al.*, 1997) e prejuízos à diferenciação das células de glia radial corticais (Götz *et al.*, 1998). Entretanto, ainda não se sabe quais destes defeitos são consequência direta da ausência de Pax6 e quais surgem secundariamente.

Durante o desenvolvimento telencefálico, o *pax6* é expresso a partir de E12,5 (camundongo) no neuroepitélio proliferativo do *pallium*, num gradiente lateromedial,

decrecente, elevado na região fronteira com a LGE. Na VZ da LGE a expressão de *Pax6* é negligenciável (Puelles *et al.*, 2000; Stoykova *et al.*, 2000).

O *gsh2* é o homólogo mamífero do gene *ind* (abreviatura do inglês *intermediate neuroblast defective*) da *Drosophila*, que codifica uma proteína essencial à definição dorso-ventral das células que constituem o sistema nervoso. Sua expressão segue-se à de *shh* (Corbin *et al.*, 2000). Em E12,5 (camundongo) é expresso no prosencéfalo ventral, incluindo diencéfalo, MGE e LGE. Sua expressão é mais forte na região da FCE (Toresson *et al.*, 2000). Camundongos mutantes para *gsh2* apresentam redução na LGE, acompanhada de perda de expressão de *dlx2* nesta. Os genes *dlx* são marcadores estriatais, em geral com expressão complementar à de *pax6* (Stoykova *et al.*, 2000).

Estudos de perda de função demonstram que os genes *pax6* e *gsh2* disputam territórios na VZ telencéflica. Assim, se um deles for suprimido, o outro avança, levando consigo os genes que estiverem a jusante (Fig. 7). Por exemplo, em E12,5, o camundongo mutante *small eye (sey/sey)*, que tem a proteína Pax6 não-funcional, apresenta o domínio de expressão de *gsh2* e os genes por ele regulados (*dlx*, *vax1* e *mash1*, por exemplo) expressos ectopicamente no território presumivelmente cortical, cruzando a barreira córtico-estriatal; enquanto que as neurogeninas 1 e 2, *emx1* e *tbr1*, marcadores tipicamente dorsais, sofrem um recuo no seu limite de expressão (Fig.7; Toresson *et al.*, 2000; Stoykova *et al.*, 2000). Evidencia-se, desta forma, uma ventralização do telencéfalo, acarretando um deslocamento da borda limítrofe entre os primórdios de córtex e núcleos da base. Isto configura um desvio na identidade dorso-ventral dos progenitores da VZ.

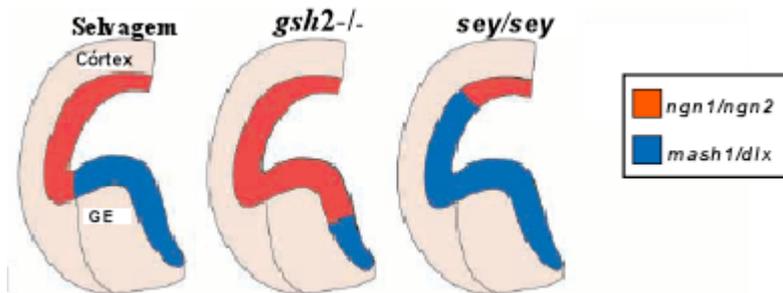


Figura 7. Modelo resumindo os resultados obtidos em mutantes *gsh 2* <sup>-/-</sup> e *sey/sey*. Quando a função do *gsh 2* é perdida, a fronteira entre os genes neurogenina 1 e 2 (vermelho) e *mash 1* e *dlx* (azul) desloca-se ventralmente. O inverso acontece nos mutantes *sey/sey*, já que a fronteira se desloca dorsalmente. Adaptado de Toresson *et al.* (2000).

Complementando estes dados, destacam-se os ensaios envolvendo os mutantes *gsh2*, nos quais os marcadores ventrais têm sua expressão diminuída, o *pax6* é regulado positivamente na LGE e na MGE. As neurogeninas são encontradas ectopicamente na LGE. Sugere-se, então, uma dorsalização do cérebro em desenvolvimento, em bases moleculares (Toresson *et al.*, 2000).

Estudos sugerem que há uma ligação entre *pax6* e moléculas de adesão celular. Em ensaios de reagregação celular, as células de córtex e corpo estriado de mutantes *sey/sey*, entre E12,5 e E15,5, não segregaram entre si, como nos animais selvagens (Stoykova *et al.*, 1997). No mutante *sey/sey*, a paliçada de glia radial não se forma entre o futuro córtex e a LGE, o que pode estar correlacionado com o papel do *pax6* sobre a diferenciação da glia radial (Götz *et al.*, 1998).

A R-caderina (*Rcad*, do inglês *retinal-cadherin*) - molécula de adesão célula-célula dependente de cálcio e de interação homofílica - colocaliza com o *pax6* em muitas regiões, dentre as quais a VZ cortical, inclusive na região da FCE, onde o sinal é mais forte (Fig. 8; Stoykova *et al.*, 1997). O camundongo *sey/sey* apresenta uma diminuição na expressão de *R-cad* nas regiões de colocalização com o *pax6*. Desta forma, a expressão de *R-cad* parece seguir-se à expressão de *pax6* (Fig. 8; Stoykova *et al.*, 1997). Estes resultados são consistentes com dados de que a

adesão seletiva entre células de córtex em desenvolvimento e corpo estriado é configurada pela ação de moléculas de adesão dependentes de cálcio (Matsunami e Takeichi, 1995; Götz *et al.*, 1996).

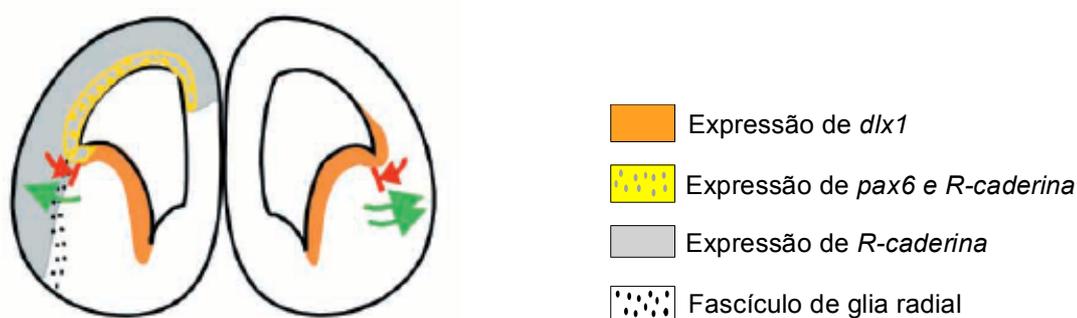


Figura 8. Esquema do telencéfalo de camundongos selvagens ou mutantes *sey/sei*, resumindo o papel do *pax6* na restrição da migração entre córtex e corpo estriado. As setas indicam a migração celular através da FCE, a partir das eminências ganglionares, em verde, e do córtex, em vermelho. Territórios de expressão gênica do *pax6*, *dlx1* e da *R-caderina* são representados em cores indicadas na figura. No mutante *sey/sei*, a expressão de *dlx1* expande-se da LGE para o córtex, o que se correlaciona com a migração celular aumentada no mesmo sentido. A migração das células corticais ainda está restrita no mutante *sey/sei*, a despeito da perda das estruturas de fronteira e da expressão de *R-caderina*. Adaptado de Chapouton *et al.* (1999).

Nos diferentes domínios neuroméricos, há a expressão de diferentes caderinas (Matsunami e Takeichi, 1995; Redies e Takeichi, 1996), o que reforça as evidências de participação de variadas moléculas de adesão no estabelecimento da FCE. A caderina-6 (*cad-6*) é expressa de modo complementar à *R-cad* no telencéfalo em desenvolvimento. A primeira é expressa na GE, enquanto que a segunda, no córtex, por volta de E12,5, no camundongo (Matsunami e Takeichi, 1995; Inoue *et al.*, 1997; 2001). As selectinas, moléculas de adesão dependentes de cálcio, podem também estar associadas com a regionalização do telencéfalo. A imunomarcagem para CD15, um ligante de selectina, revelou em E15 (rato) uma forte marcação por todo o córtex e praticamente ausência de marcação no território estriatal. Em E17, a marcação no córtex restringiu-se à zona ventricular; e no corpo estriado, a zona ventricular tornou-se marcada nesta idade (Götz *et al.*, 1996).

Várias outras moléculas de adesão são candidatas à função de mediadoras da regionalização do telencéfalo. A redundância na ação destas moléculas explicaria a manutenção da FCE, confirmada pela expressão e distribuição normal de *pax6* e *dlx2*, no telencéfalo de embriões E11 (camundongo) mutantes para *cad-6* (Inoue *et al.*, 1997). Poderia haver uma sobreposição na ação das moléculas de adesão envolvidas neste evento. Candidatos possíveis seriam a R-caderina, cuja expressão foi inalterada nesse mutante, e a N-caderina, expressa na VZ de todo o cérebro.

Moléculas de matriz extracelular que são envolvidas nas interações célula-substrato durante a morfogênese do sistema nervoso são os principais componentes do ambiente onde os neurônios recém-gerados migram. As interações entre os neurônios e os elementos do substrato são traduzidas em característica distribuição celular no cérebro imaturo (Jhaveri *et al.*, 1991).

A molécula de matriz extracelular tenascina-C está abundantemente presente nas fronteiras entre os barris do córtex somatossensorial de roedores (Jhaveri *et al.*, 1991; Steindler *et al.*, 1995), numa distribuição que sugere seu papel nos eventos de compartimentalização. Esta molécula parece estar associada ao estabelecimento da FCE, já que é expressa em altos níveis nesta região (Götz *et al.*, 1997; Stoykova *et al.*, 1997). No camundongo *sey/sey*, tal expressão é abolida (Stoykova *et al.*, 1997).

## **1. 5. PADRONIZAÇÃO DO TELENCEFALO E MIGRAÇÃO CELULAR**

A padronização regional e os comportamentos migratórios estão intimamente ligados durante o desenvolvimento do telencéfalo (Wichterle *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2000). A padronização dorsoventral do telencéfalo, catalisada pela expressão

diferencial de genes homeobox específicos, origina progenitores com perfis moleculares específicos nos diferentes territórios da VZ.

Neurônios que migram pelo modo radial ou pelo tangencial rumo ao córtex em desenvolvimento surgem a partir de progenitores situados em regiões diferentes no telencéfalo. A migração radial é adotada por neurônios oriundos da VZ cortical; a migração tangencial, por neurônios gerados na VZ estriatal (Parnavelas *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1998).

As eminências ganglionares se destacam como a fonte de diferentes classes de interneurônios destinadas não apenas aos núcleos da base, mas também ao córtex e ao bulbo olfatório. Há evidências da existência de várias vias de migração tangencial no telencéfalo (Marin e Rubenstein, 2001). Tais vias são adotadas em períodos distintos e partem de diferentes zonas progenitoras dentro do telencéfalo ventral.

A MGE e a área entopeduncular anterior parecem ser a origem primária das células migrando tangencialmente para o córtex durante os estágios iniciais do desenvolvimento (a partir de E11,5 nos camundongos) (Lavdas *et al.*, 1999; Marin e Rubenstein, 2001; Anderson *et al.*, 2001). Nesta fase, as células cursam superficialmente e invadem a zona marginal e a subplaca. A LGE ainda não contribui, neste estágio, com interneurônios para o córtex, o que é consistente com o fato da MGE amadurecer mais cedo que a LGE (Smart, 1985).

Entre E12,5 e E14,5 (camundongo), a MGE parece ser a principal fonte de interneurônios corticais (Lavdas *et al.*, 1999; Marin e Rubenstein, 2001; Anderson *et al.*, 2001; Wichterle *et al.*, 2001). Nesta idade, estes interneurônios são destinados à SVZ, à porção inferior da zona intermediária e à subplaca, de onde eles se deslocam prontamente para a placa cortical. Já em estágios mais avançados do

desenvolvimento telencefálico (E14,5 – E16,5, no camundongo), as células que migram tangencialmente para o córtex são oriundas das eminências ganglionares medial e lateral, tendendo a migrar através da zona proliferativa cortical (Lavdas *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001; Marin e Rubenstein, 2001).

Ainda neste estágio embrionário, células derivadas da porção anterior da SVZ da LGE migram profusamente para o bulbo olfatório e vão gerar seus interneurônios granulares e periglomerulares (Pencea *et al.*, 2001; Stenman *et al.*, 2003). O deslocamento dessas células faz-se num movimento migratório massivo, que se mantém até mesmo na idade adulta (Lois e Buylla, 1994 e Lois *et al.*, 1996) – a já mencionada corrente migratória rostral (Luskin, 1993; Alvarez-Buylla e Lois, 1995). A contribuição da LGE é consistente com os dados de que o transplante de células derivadas da LGE, mas não da MGE, na SVZ adulta, gera neurônios que migram rostralmente para o bulbo olfatório (Wichterle *et al.*, 1999).

Perturbações na expressão de diferentes genes com papel regionalizante no telencéfalo repercutem sobre a migração tangencial. Nos camundongos *sey/sey*, por exemplo, em virtude da ventralização da LGE e do córtex, decorrente da expansão dorsal dos marcadores gênicos da MGE e da LGE, respectivamente, há um aumento no número de neurônios que migram tangencialmente para o córtex (Fig. 8; Chapouton *et al.*, 1999).

A FCE agiria como um filtro semipermeável que permitiria a uma proporção de células da GE invadir o córtex, mas não vice-versa. O *pax6* parece atuar restringindo a migração celular entre o córtex em desenvolvimento e o corpo estriado (Fig. 8; Chapouton *et al.*, 1999). Achados provenientes de videomicroscopia de tempo intervalado revelaram que as células pós-mitóticas corticais diminuem sua velocidade gradualmente e param de migrar conforme se aproximam da fronteira.

Isto sugere a ação de uma pista inibitória de curta distância (Neyt *et al.*, 1997). Todavia, achados recentes apontam, pela primeira vez na literatura, a migração no sentido córtico-estriatal (Willaime-Morawek *et al.*, 2006). Células corticais proliferativas migrariam, a partir do período neurogenético avançado, rumo às camadas germinativas estriatais.

## **1. 6. O ACOPLAMENTO JUNCIONAL**

O acoplamento juncional advém da direta comunicação entre os citoplasmas de duas células adjacentes, em regiões de adesão celular. Estruturalmente, as junções comunicantes são formadas pelas conexinas, suas proteínas monoméricas (Fig.9). As conexinas, por sua vez, arranjam-se hexagonalmente e constituem os hemicanais (conéxons). Do pareamento de dois hemicanais compatíveis contidos em membranas plasmáticas de células apostas – através dos domínios extracelulares das conexinas – formam-se canais intercelulares (revisado em Evans e Martin, 2002). Frequentemente agrupam-se em regiões da membrana chamadas de placas juncionais, que podem conter milhares de canais juncionais (Söhl *et al.*, 2005). Tais placas são estruturas dinâmicas e muito móveis (Evans e Martin, 2002). As conexinas se distribuem entre três famílias:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Tal classificação se baseia em similaridades de seqüências de cDNAs das conexinas (Spray e Dermietzel, 1996). Acredita-se que vinte conexinas são expressas nos roedores. Destas, as conexinas 26, 32, 36, 43 e 45 são expressas no cérebro em desenvolvimento, com diferentes perfis de expressão (Montoro e Yuste, 2004).

A estrutura das conexinas foi revelada por ensaios de difração de raio-X em placas juncionais isoladas. As conexinas contêm quatro domínios transmembranares

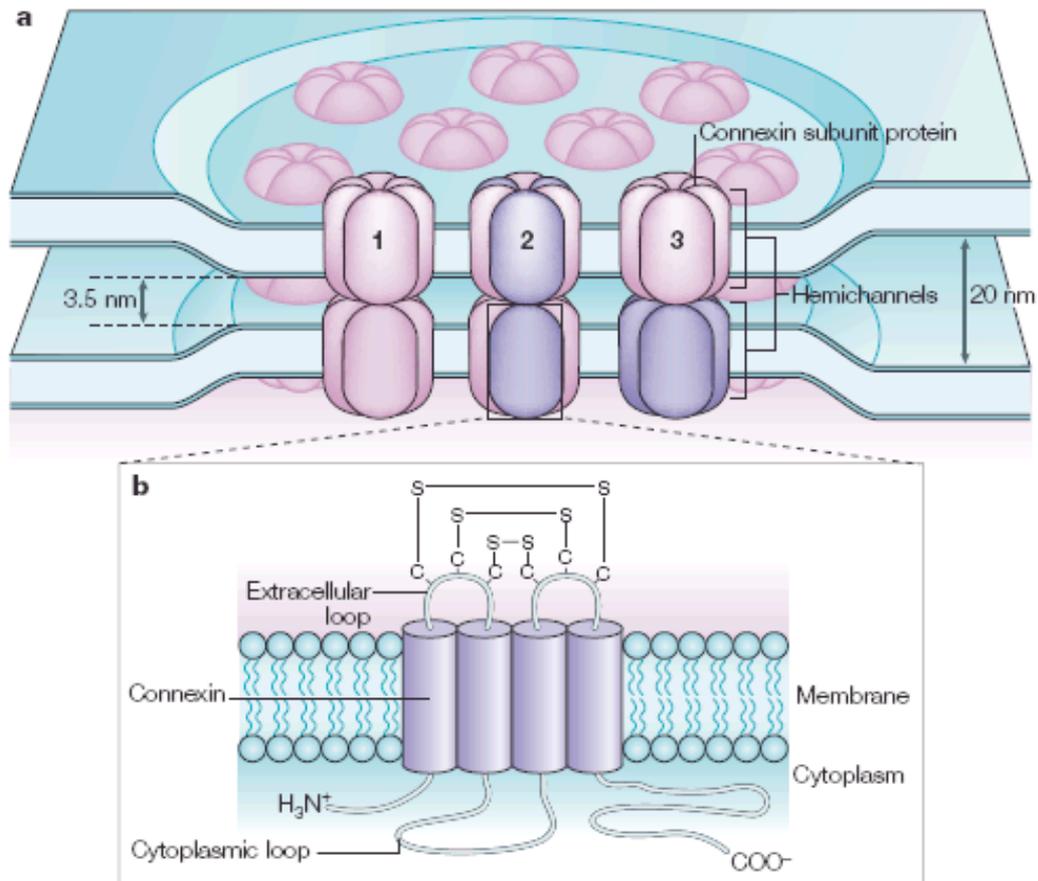


Figura 9. Organização molecular e topologia esquemática de uma placa juncional. a, Hemicanais em membranas celulares apostas de células adjacentes podem parrear e formar canais juncionais. Três diferentes tipos de junções comunicantes foram relatadas, dependendo de sua composição molecular – homomérica/homotípica (1), heteromérica (2) e heterotípica (3). Cada hemicanal representa uma associação de 6 subunidades de conexina. b, As conexinas apresentam quatro domínios transmembranares, duas alças externas, uma alça interna e as caudas citoplasmáticas carbóxi- e amino-terminal. As alças externas, com três resíduos de cisteína, são conservadas e cruciais para o pareamento das conexinas. As conexinas variam principalmente na alça interna e na região carbóxi-terminal. S-S representa pontes dissulfeto nos domínios extracelulares das conexinas. Adaptado de Söhl *et al.* (2005).

em  $\alpha$  hélice, designados M1-M4, dos quais o M3 é o mais anfipático e provavelmente contorna o poro do canal; duas alças extracelulares, as quais conectam os domínios M1-M2 e M3-M4 (Fig.9). Os domínios transmembranares e as alças extracelulares são muito conservadas na família das conexinas, o que viabiliza que hemicanais compostos de diferentes conexinas possam parrear,

constituindo um canal juncional. São três domínios citoplasmáticos: uma alça interna, que conecta M2-M3, e as caudas N-terminal e C-terminal.

Os hemicanais se conectam no espaço extracelular, mantendo a distância de 2-4 nm entre si, através de ligações não-covalentes, presumivelmente pontes de hidrogênio entre suas alças externas. Estas contêm três resíduos de cisteína altamente conservados, os quais contribuem para a formação de pontes dissulfeto provavelmente envolvidas na estrutura terciária intra-conexina.

Pelas junções comunicantes passam, por difusão passiva, íons e moléculas hidrossolúveis com peso molecular máximo na ordem de 1,2 KDa (Söhl *et al.*, 2005). Incluem-se neste critério moléculas como: AMPc, inositol trifosfato, NAD, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, e vitaminas. Desta forma, as células se tornam acopladas metabolicamente. Por prover uma rota para o intercâmbio de mensageiros secundários, as junções comunicantes podem ser essenciais para respostas coordenadas em compartimentos celulares.

As regiões de maior especificidade são a alça interna e a cauda C-terminal (Dermietzel, 1998; Willecke *et al.*, 2002). Inclusive, conexinas pertencentes às famílias  $\alpha$  e  $\beta$  exibem diferenças na extensão da alça interna.

Usualmente uma célula expressa mais que uma isoforma de conexina. No sistema nervoso, freqüentemente, os diferentes tipos celulares expressam conexinas comuns, além das que lhe são próprias. Uma gama de possibilidades combinatórias advém dessa multiplicidade. Os hemicanais podem, então, ser homoméricos (apenas um subtipo de conexina) ou heteroméricos; as junções comunicantes podem ser homotípicas (hemicanais idênticos) ou heterotípicas. Contudo, várias restrições limitam essas possibilidades combinatórias: algumas conexinas não

pareiam com hemicanais compostos por outras conexinas; a maioria, entretanto, são mais promíscuas, estabelecendo junções com muitas conexinas diferentes.

O chaveamento dos canais juncionais (transição entre estados condutor-aberto- e não condutor-fechado) é influenciado por vários fatores: altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e diferença de potencial entre as células acopladas levam ao fechamento parcial ou total dos canais juncionais; alterações no pH extracelular, liberação de neurotransmissores, fatores de crescimento e citocinas também repercutem sobre o funcionamento das junções comunicantes (Dermietzel, 1998). A fosforilação também tem sido implicada na regulação do chaveamento juncional, mas não pode ser considerado um mecanismo regulatório geral para junções comunicantes porque as conexinas de menor massa molecular aparentemente não seriam fosforiladas (Evans e Martin, 2002).

Os canais juncionais formados por diferentes conexinas apresentam diferentes propriedades fisiológicas, dentre elas a permeabilidade, e são diferencialmente chaveados. Aparentemente, eles são diferencialmente sensíveis à voltagem transjuncional, ao pH intracelular e aos efeitos dos agentes de fosforilação. As conexinas podem ser afetadas diferentemente por mecanismos de controle transcricionais e pós-transcricionais, como por exemplo, hormônios e fatores de crescimento (Dermietzel, 1998).

O sistema nervoso pode ser visto como um conjunto de compartimentos comunicantes, onde há comunicação intercelular intra e inter-compartimental. Tal comunicação pode ser classificada como homo (entre um mesmo tipo celular) - ou heterocelular (entre tipos celulares diferentes). Desta forma, neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células das leptomeninges, células endimárias e células da microvasculatura exibem discretos padrões de expressão de conexinas e a maioria

se comunica entre si e com células de outros compartimentos específicos através de junções comunicantes (Spray e Dermietzel, 1996).

### **1. 6. 1. O Acoplamento Juncional durante o Desenvolvimento**

O acoplamento juncional tem sido sugerido como importante via de sinalização intercelular em várias etapas do desenvolvimento do SNC. Num estágio mais inicial, afeta a proliferação, a migração e a especificação celular (Bittman *et al.*, 1997; Nadarajah *et al.*, 1997; Bittman e LoTurco, 1999); mais tardiamente, a diferenciação celular e a formação de circuitaria neural (Peinado *et al.*, 1993; Yuste *et al.*, 1995). Pode ser correlacionado, como dito anteriormente, ao estabelecimento de bordas e especificações regionais (Martinez *et al.*, 1992; Mellitzer *et al.*, 1999).

O acoplamento juncional executaria um importante papel durante o desenvolvimento cortical inicial, quando as sinapses químicas ainda são inexistentes ou esparsas. Ele capacitaria os neurônios para decisões relativas à proliferação, ao início de migração e à posição final na placa cortical. Após a resolução dessas questões, as sinapses químicas poderiam ser mais adequadas para processar as informações no cérebro, estabelecendo a circuitaria apropriada (Montoro e Yuste, 2004), em virtude da variedade de interações ligante-receptor. Contudo, a comunicação juncional, dados a diversidade molecular das proteínas constituintes dos canais juncionais e seus padrões de expressão regionalmente específicos, não deve ser classificada como um modo de transmissão de sinal uniforme, inflexível e restrito à propagação rápida de sinais em organismos filogeneticamente inferiores (Dermietzel, 1996).

Assume-se que a extensão do acoplamento juncional dentro dos compartimentos e entre eles em grande parte possa explicar-se pelos tipos de conexinas expressos por cada compartimento (Dermietzel, 1998). Desta forma, de acordo com o padrão de expressão de diferentes isoformas de conexina no cérebro seria possível estabelecer comunicação juncional entre diversas populações celulares ou segregar populações celulares em compartimentos isolados. É possível que a expressão de grupos específicos de conexinas seja essencial para a definição de compartimentos celulares e fronteiras de comunicação durante o desenvolvimento cerebral (Dermietzel, 1996).

O agrupamento lateral dos numerosos canais juncionais que vão integrar uma placa juncional na membrana plasmática é um processo dinâmico e estudos sugerem a necessidade de proteínas de matriz extracelular e de adesão celular para o acoplamento juncional. Dentre essas proteínas estão as caderinas, integrina  $\alpha 3 \beta 1$  e laminina 5 (Evans e Martin, 2002).

Sugere-se que receptores de membrana celular, juntamente com seus ligantes, e complexos de adesão célula-célula condicionariam inserções e associações de junções comunicantes na membrana e contribuiriam para o estabelecimento dos níveis de permeabilidade funcional (Fróes e Menezes, 2002; Mellitzer *et al.*, 1999).

### **1. 6. 2. Acoplamento Juncional e a Zona Ventricular**

Reconhecidamente, as células da VZ respondem a fatores difusíveis extracelulares. Mas há dados sugestivos de que interajam também diretamente entre si, através de acoplamento intercelular, embora não seja completamente conhecido o papel desta comunicação para tais células (Bittman *et al.*, 1997). O que

parece claro é a necessidade, neste contexto celular, de uma forte coordenação entre grupos de célula, através da ação de mensageiros que cruzassem de um citosol a outro, diretamente, e que regulassem, ao menos em parte, a proliferação e migração celulares (Montoro e Yuste, 2004).

Estudos utilizando injeções de LY, um corante permeante de junções comunicantes, demonstraram o AJ entre células neuroepiteliais na VZ (Fig. 10). Cerca de 60 células estiveram acopladas em E15, caindo para cerca de 6 células em E19. Isto sugere que antes da mitose final ou durante ela os neurônios

desacoplam de seus agrupamentos para iniciar a migração rumo à placa cortical (LoTurco e Kriegstein, 1991).

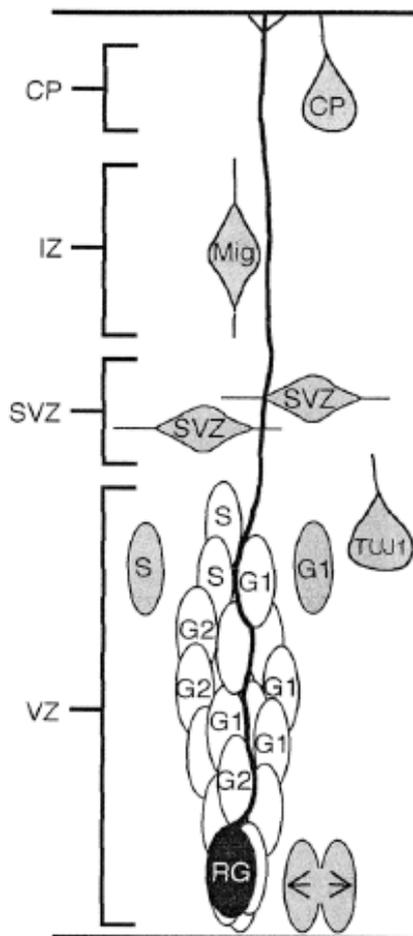


Figura 10. Diagrama ilustrativo da composição dos agrupamentos de células acopladas na zona ventricular (VZ). Eles são organizados em torno das fibras de glia radial (RG) e contêm células em G1, S e G2. As células em cinza não integram estes agrupamentos: são células na fase M (setas), neurônios pós-mitóticos (TuJ1), neurônios migratórios (Mig), células da zona subventricular (SVZ) e algumas células nas fases S e G1 do ciclo celular. CP, placa cortical; IZ, zona intermediária. Adaptado de Bittman *et al.* (1997).

Esses agrupamentos de células acopladas na VZ apresentaram uma disposição colunar e, em sua maioria, um único processo se estendia do topo do agrupamento até a pia (Fig. 10). Ensaios combinando injeção intracelular de biocitina e imunomarcção para nestina revelaram que estes processos eram provenientes de células de glia radial. Assim, além de precursores neurais gerais, os agrupamentos de células acopladas da VZ contêm uma classe precursora específica, a glia radial (Bittman *et al.*, 1997). Estes dados são consistentes com a hipótese de unidade funcional radial, a qual propõe que grupos de neurônios relacionados ontogeneticamente migrariam da VZ a partir da mesma fibra de glia radial (Rakic, 1988). As células dentro de unidades radiais individuais estariam comunicando-se diretamente através do acoplamento juncional (LoTurco e Kriegstein, 1991). Esse achado implica o acoplamento juncional nos eventos iniciais de especificação celular e laminar no córtex (Nadarajah *et al.*, 1997). Importante ressaltar que ensaios de biocitina e imuno-histoquímica demonstraram que estes agrupamentos não conteriam neurônios migratórios ou em diferenciação (Bittman *et al.*, 1997).

Os níveis de acoplamento celular entre as células na VZ variam de acordo com as fases do ciclo celular. Conforme os precursores cruzam o ciclo celular, eles apresentam níveis de acoplamento baixos em G1 e elevados em G2, durante toda a neurogênese. No entanto, na fase S, é elevado no início da neurogênese e baixo na neurogênese avançada (Bittman *et al.*, 1997). Isso sugere que o acoplamento juncional poderia estar regulando a divisão celular, o que é reforçado pelo achado de que o bloqueio farmacológico do acoplamento juncional - através do tratamento com halotano ou octanol em culturas de explantes de córtex E16 - diminuiria o número de células entrando na fase S. Assim, uma célula desacoplada na VZ teria uma

probabilidade menor de reingressar na fase S, optando por migrar para a IZ ou permanecer na VZ como neurônio positivo para TuJ1, ou seja, pós-mitótico (Bittman *et al.*, 1997). Além disso, o número reduzido de células acopladas na VZ durante a fase S na neurogênese avançada poderia contribuir para a maior porcentagem de células saindo do ciclo celular neste estágio (Takahashi *et al.*, 1995a).

Weissman e cols (2004) no curso de seu estudo sobre flutuações de cálcio espontâneas e provocadas na zona ventricular cortical sugeriram uma via de ação de conexinas na regulação do ciclo celular, principalmente nas células de glia radial. Estas ondas de cálcio seriam deflagradas por intermédio da abertura de hemicanais não pareados, seguida da liberação de um sinal difusível – moléculas de ATP - no meio extracelular e liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares. Interessantemente, as flutuações de cálcio espontâneas aparentemente não são conduzidas por comunicação juncional transcelular e sim por receptores purinérgicos. O nível máximo dessas flutuações ocorre no pico do período neurogênico (E16, nos ratos; Altman e Bayer, 1991) e são eliciadas na fase S, período em que metade dos precursores está desacoplada (Bittman *et al.*, 1997), embora a expressão de conexinas esteja inalterada (Bittman *et al.*, 1997; Nadarajah *et al.*, 1997; Bittman *et al.*, 1999). Os precursores que ingressam na fase S liberariam um sinal extracelular buscando coordenar seu ciclo celular com o dos precursores adjacentes (Weissman *et al.*, 2004).

Ensaio com injeções retrovirais nos ventrículos laterais de camundongos E11 seguidos de análises clonais em E14 revelaram que células relacionadas a um mesmo clone formam agregados celulares na VZ, os quais, em virtude de sua localização na VZ, poderiam ter ciclos celulares sincronizados (Cai *et al.*, 1997). Embora os agrupamentos celulares formados por junções comunicantes sejam

muito maiores que os agregados clonais observados por Cai e cols (1997), o acoplamento entre as células adjacentes num agregado poderia facilitar a entrada sincronizada nas diferentes fases do ciclo celular (Bittman *et al.*, 1997).

Mais tarde, após a chegada à sua posição final na placa cortical, os neurônios novamente acoplam com seus vizinhos, durante o período de formação da microcircuitaria neuronal básica, nas 2 primeiras semanas pós-nascimento, em roedores (Yuste *et al.*, 1992). Registros ópticos de fatias cerebrais de ratos neonatos marcadas com o fura-2, um indicador fluorescente de cálcio, revelaram a presença de domínios distintos de neurônios espontaneamente coativos. Em fatias coronais tais domínios se estenderam por várias camadas corticais, assemelhando-se às colunas morfofuncionais encontradas no córtex adulto (Yuste *et al.*, 1992). Especulou-se que tais domínios poderiam ser constituídos por neurônios cujos precursores clonais apresentaram flutuações de cálcio coordenadas na VZ e estiveram acoplados (Owens e Kriegstein, 1998). A ativação teria início no centro do domínio, pela excitação espontânea de um ou poucos neurônios que, subsequente, ativariam o restante das células via junções comunicantes (Yuste *et al.*, 1995). Ensaio utilizando injeções de neurobiotina (um permeante de junções comunicantes) em neurônios contidos em fatias de neocórtex de ratos com 5-12 dias pós-natal revelaram que 66% das injeções marcaram grupos de até 80 neurônios ao redor da célula injetada. Halotano, um bloqueador de junções comunicantes, aboliu o espalhamento do corante. Injeções feitas no 16º dia pós-natal resultaram em pouco ou nenhum espalhamento do corante (Peinado *et al.*, 1993). O acoplamento local transiente no córtex em desenvolvimento proveria uma via para sinais de comunicação intercelular que possibilitariam uma coordenação

temporal de redes neuronais locais durante a formação da circuitaria neural (Peinado *et al.*, 1993).

Dentre outros fatores regulatórios, o perfil de expressão das conexinas poderia estar regulando o acoplamento juncional. Os achados de Cina e cols (2007), obtidos através das técnicas de RT-PCR, *western blot* e imuno-histoquímica indicam a expressão, em nível relativamente consistente, das conexinas 26, 36, 37, 43 e 55, no neocórtex de camundongos no período de desenvolvimento compreendido entre E14 e E18. Elas estão distribuídas diferencialmente no parênquima dos primórdios corticais, mas as 5 isoformas estão presentes na VZ.

A expressão das conexinas 26 e 43 segue um padrão temporal muito similar àquele do acoplamento encontrado na VZ. Estudos demonstraram a expressão das conexinas 26 e 43 durante a embriogênese, na VZ cortical (Fig.11; Nadarajah *et al.*, 1997). Em E12,5 (rato), a conexina 43 teve uma marcação pontual encontrada predominantemente entre as células neuroepiteliais contornando o ventrículo lateral; enquanto que a imunorreatividade para conexina 26 esteve presente em todo o córtex embrionário, mas foi mais intensa ao longo da superfície ventricular (Nadarajah *et al.*, 1997). Em E14, com o início da neurogênese, uma intensa marcação para ambas as proteínas foi detectada por toda a VZ. No pico de neurogênese (E16), quando já havia uma considerável expansão radial do córtex, ambas as proteínas foram expressas em toda a parede telencefálica, incluindo as zonas proliferativas (Nadarajah *et al.*, 1997). Com o término da neurogênese (E19), ambas as conexinas apresentaram uma diminuição em sua expressão. A

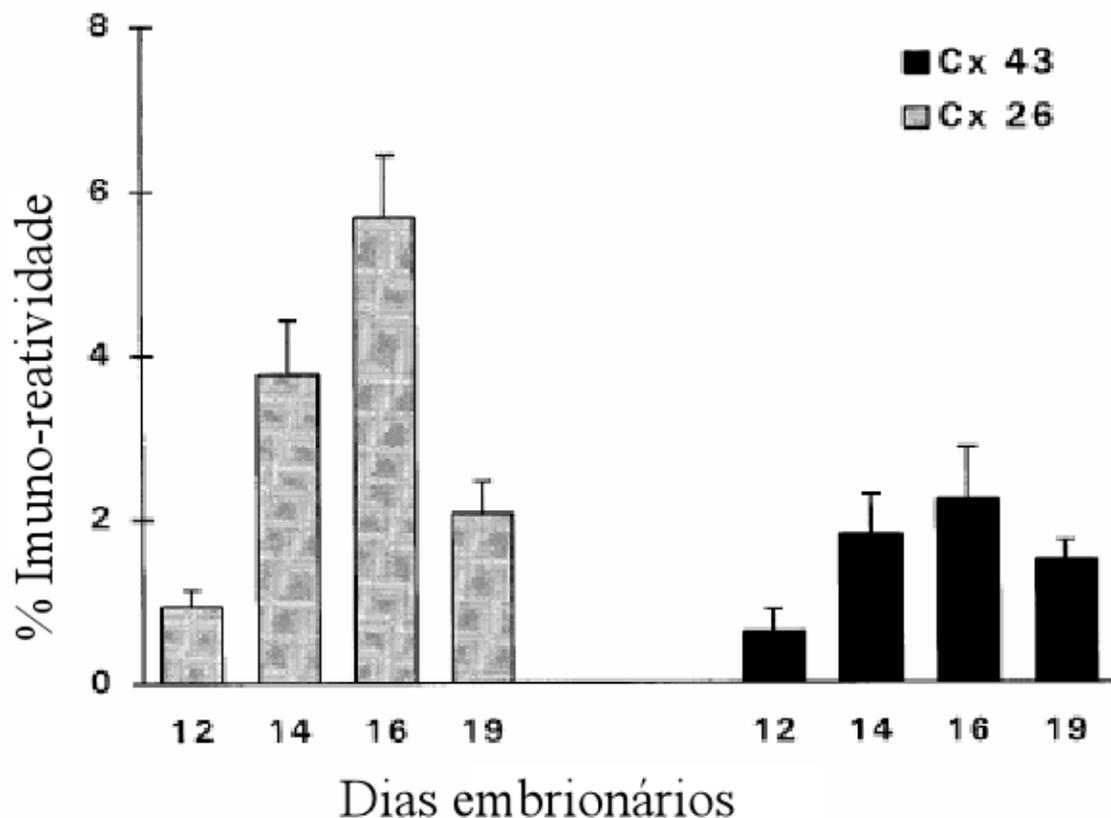


Figura 11. Expressão de conexinas na parede telencefálica dorsal de cérebros de embriões de ratos. Representação esquemática do padrão de distribuição da imunorreatividade para as conexinas 26 e 43 em vários estágios da corticogênese. Em E12, a conexina 26 foi expressa por todo o neuroepitélio, enquanto que a conexina 43 foi localizada predominantemente entre as células adjacentes ao lúmen ventricular. Entre E14 e E16, ambas as conexinas mostraram expressão aumentada em toda a parede telencefálica. Em E19, ambas as conexinas tiveram sua expressão significativamente diminuída. Adaptado de Nadarajah *et al.* (1997).

conexina 26 teve sua marcação mais concentrada nas zonas proliferativas que na placa cortical, diferentemente da conexina 43, que permaneceu difusa por todo o córtex (Nadarajah *et al.*, 1997). Ambas as conexinas apresentam seus níveis de marcação mais elevados durante os estágios de atividade neurogênica, seguindo-se significativa diminuição ao término desta. Isso é consistente com a variação dependente de tempo no nível de acoplamento juncional entre as células da VZ.

A expressão de conexinas durante o desenvolvimento do corpo estriado ainda não foi alvo de estudos. Portanto, ainda não há dados disponíveis na literatura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2. 1. OBJETIVO GERAL**

Objetivamos investigar o acoplamento celular revelado por corantes na VZ telencefálica durante o estabelecimento dos compartimentos do *pallium* e *subpallium*. Nosso estudo foi realizado no período de neurogênese cortical em embriões de ratos entre as idades de 15 e 19 dias embrionários (E15 - E19).

### **2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1.** Caracterizar a extensão de acoplamento celular *in situ* presente nas zonas ventriculares cortical e estriatal, bem como entre estas. Procuramos identificar a presença de uma barreira ao acoplamento entre estas regiões, semelhante ao já descrito para outras moléculas de expressão compartimentalizada.

**2.2.2.** Determinar o potencial de acoplamento celular entre estas regiões com ensaios *in vitro* de reagregação celular de modo a excluir aspectos histoarquitetônicos e maximizar as interações célula-célula, e talvez evidenciar um caráter celular autônomo.

**2.2.3.** Estudar a expressão das conexinas 26 e 43 nas regiões da VZ telencefálica para entender a possível contribuição de diferentes repertórios de conexinas para a geração de compartimentos embrionários morfofuncionais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

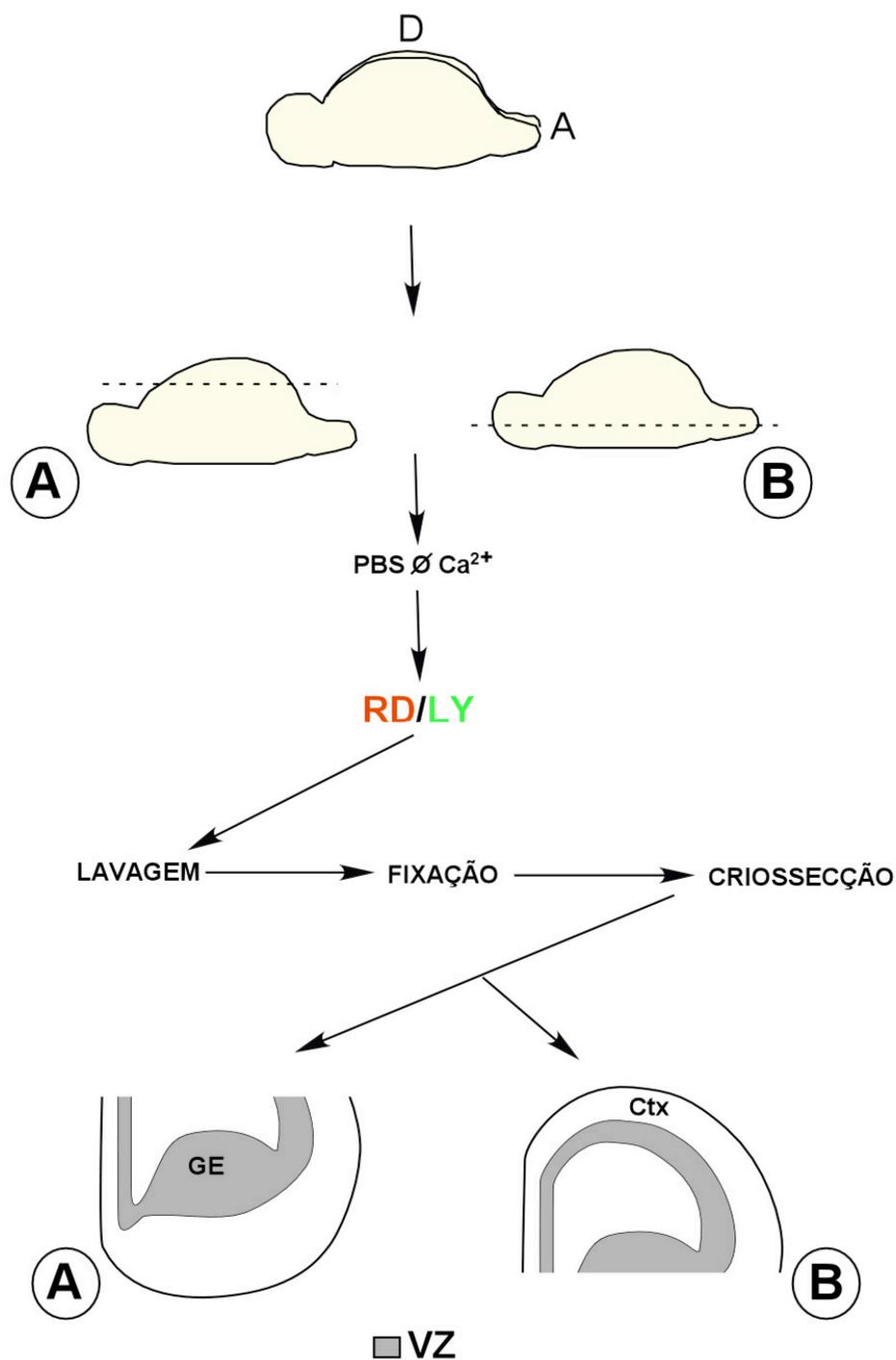
#### **3. 1. ANIMAIS**

Utilizamos embriões de ratos *Wistar*, considerando o dia do acasalamento como E0. As fêmeas prenhas foram profundamente anestesiadas por inalação de éter, seguindo então a retirada dos fetos através de laparotomia. As fêmeas são mortas por secção do diafragma imediatamente após o procedimento.

#### **3. 2. CARREGAMENTO POR TRANSECÇÃO**

Esta metodologia, adaptada da técnica de carregamento por raspagem utilizada por El Fouly e cols (1987), foi descrita por Menezes e cols (2000), num ensaio para observar o acoplamento juncional na SVZ pós-natal.

Para o estudo do acoplamento juncional na VZ, algumas adaptações foram feitas no protocolo utilizado por Menezes e cols (2000). Os cérebros de animais com idades embrionárias entre E15 e E19 - 2 ninhadas [aproximadamente 8 fetos] de cada idade foram usadas para cada experimento. Devido à variação no momento do corte de carregamento [ver a seguir], os resultados derivam de pelo menos 3 animais para cada situação e idade, com exceção de E19, em que apenas um animal pode ser documentado - foram colocados em solução salina Gey's (SSG) gelada (4°C) e seus hemisférios separados (Fig.12). Os hemisférios foram imersos em solução salina tamponada com fosfato livre de Ca<sup>2+</sup> (PBS  $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup>) e com EGTA (2µM) por 1'. A seguir realizamos uma única transecção nos cérebros a serem marcados pelos fluorocromos, em diversas orientações: horizontais, oblíquas ou

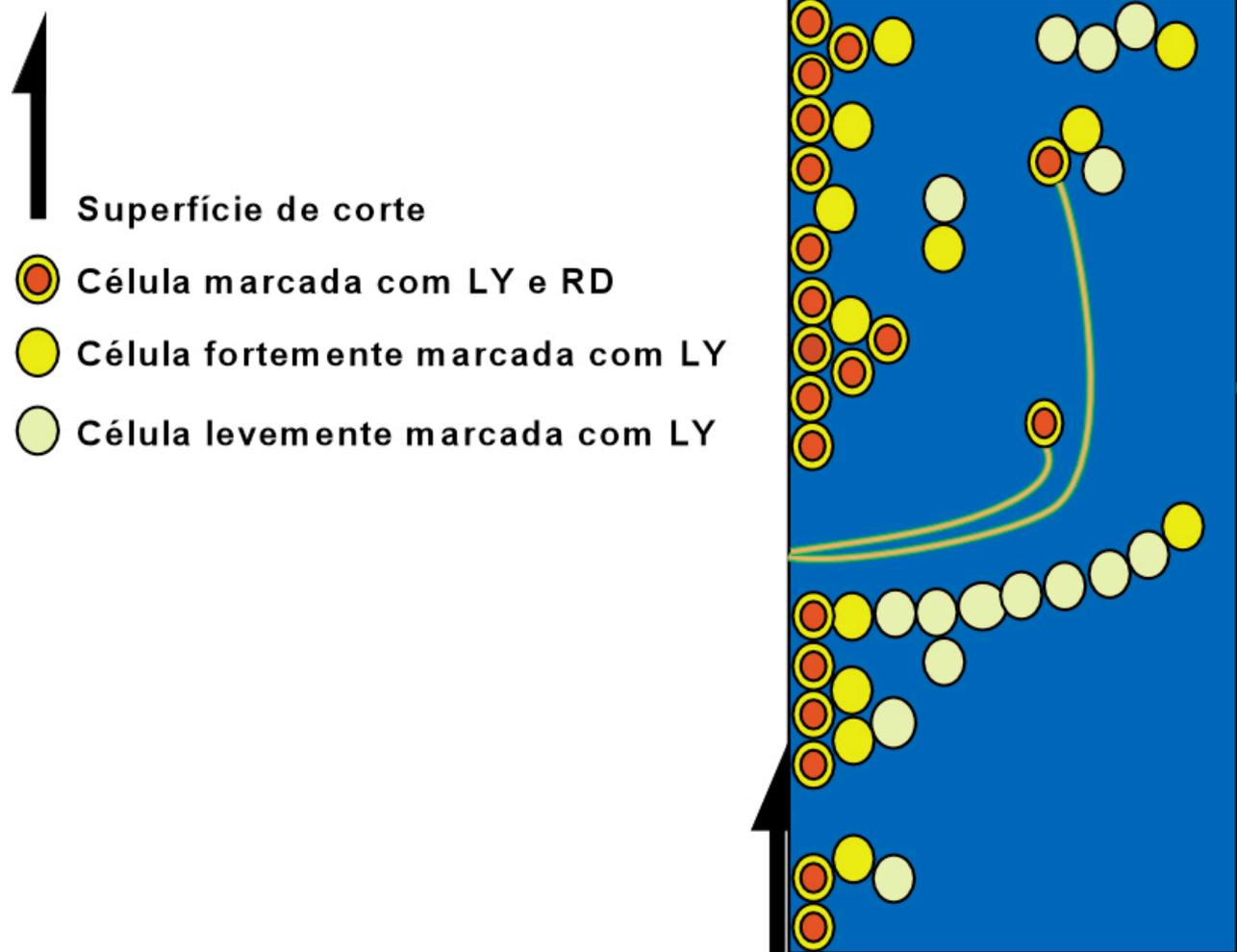


**Figura 12. Esquema ilustrativo dos principais procedimentos adotados nos ensaios de carregamento por transecção.**

A linha pontilhada indica o plano de corte de carregamento. Em A, vemos o plano de corte horizontal em nível dorsal; em B, horizontal ventral. O plano de corte parassagital não está aqui retratado. Ctx (córtex), GE (eminência ganglionar), RD (Rodamina Dextrana), LY (Lucifer Yellow), VZ (zona ventricular), D (dorsal), A (anterior).

parassagitais (conforme ilustração – etapa doravante chamada de “corte de carregamento”). As porções hemisféricas transeccionadas foram imersas em PBS  $\text{Ca}^{2+}$  por 1' e, em seguida, em uma solução de fluorocromos, consistindo de Lucifer Yellow (LY) (~443Da após ionização em solução salina) e Rodamina Dextrana (RD) (3000 Da) (Molecular Probes), respectivamente a 0,25% e 0,30% (m/v) em PBS  $\text{Ca}^{2+}$ , por 1,5' (Fig. 12). Lavamos em SSG por 8', fracionados em 3 etapas, e fixamos em paraformaldeído (PFA) 4%, por 1h. Crioprotegemos as porções hemisféricas cerebrais com um gradiente crescente de sacarose (10 e 20% - m/v). Estas foram incluídas em OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura) e cuidadosamente orientadas para criosecção ortogonal (12 a 16  $\mu\text{m}$  de espessura) em relação ao corte de carregamento para observarmos o espalhamento dos corantes na profundidade do cérebro. Os cortes foram coletados em lâminas gelatinizadas e pós-fixados em vapor de PFA, lavadas em PBS e marcadas com 4', 6'-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, Sigma), um marcador nuclear que revela a arquitetura tecidual. A visualização das imagens, bem como sua captura, foram feitas em microscópio óptico de fluorescência (Axioplan, Zeiss).

Ambos os fluorocromos utilizados são hidrofílicos (não atravessam membranas plasmáticas íntegras; desta forma as células lesadas são carregadas com eles), mas só o LY permeia junções comunicantes, em virtude do seu baixo peso molecular. A RD funciona como controle da lesão e mantém-se somente nas células inicialmente marcadas pelo corte de carregamento. Pelo espalhamento destes dois fluorocromos temos um panorama do acoplamento juncional na VZ telencefálica (Fig. 13). Verifica-se, então, a existência de 2 categorias de células marcadas:



**Figura 13. Esquema ilustrativo do padrão de marcação esperado a partir da técnica de carregamento por transecção.**

São três as categorias de marcação obtidas a partir do ensaio de “transection loading”: células marcadas com LY e RD (LY+/RD+), células forte ou levemente marcadas com LY (LY+/RD-).

Células marcadas com LY e RD (LY+/RD+), ou seja, células que foram lesadas pela secção, servindo de “porta de entrada” para os corantes. A maioria destas células localiza-se próximo a superfície do corte de carregamento, mas há algumas delas mais profundamente no tecido (Fig. 13). Assume-se que a dupla marcação de células profundamente situadas ocorra por secção dos longos prolongamentos celulares e transporte retrógrado dos fluorocromos através destes.

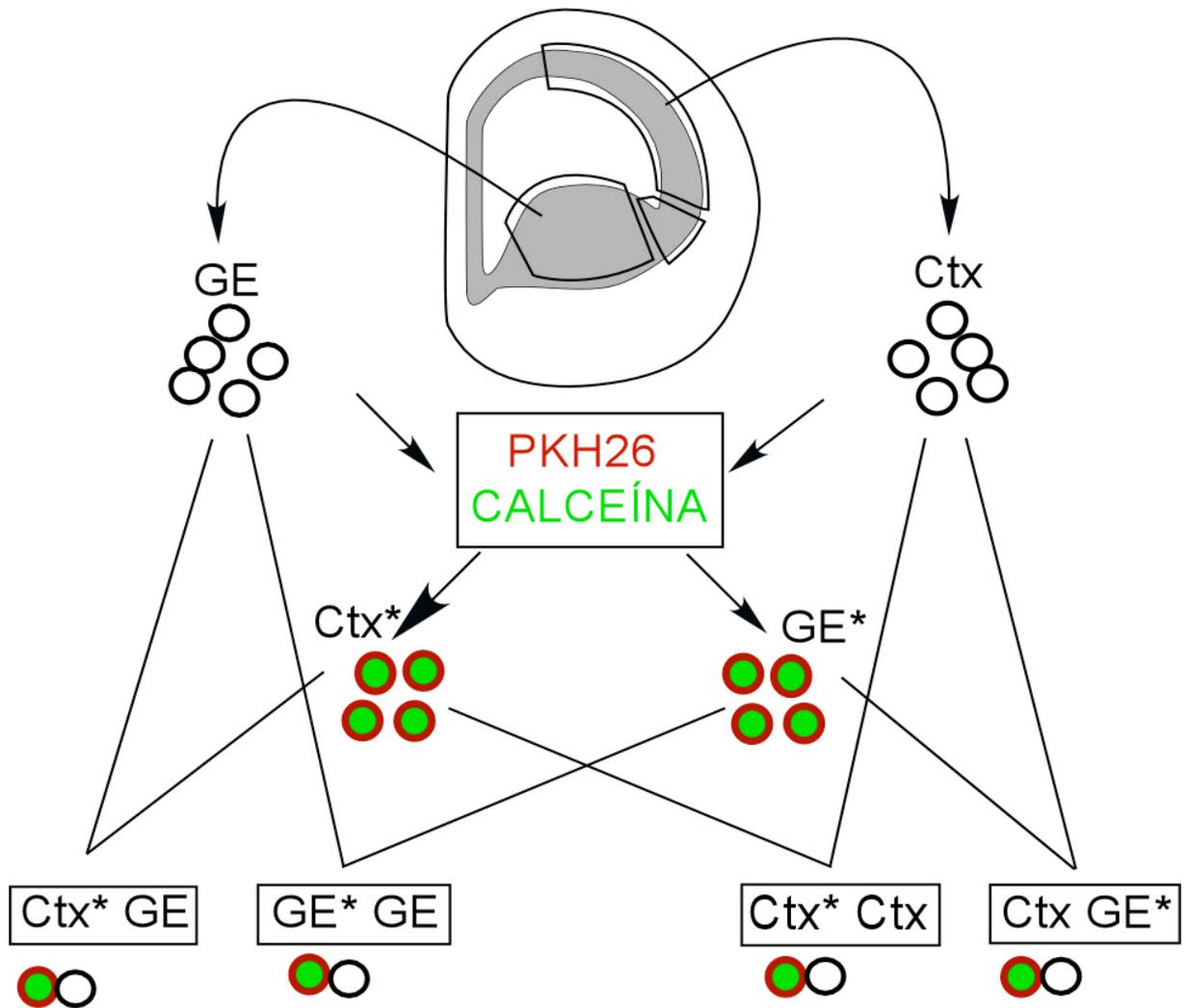
Células marcadas apenas com LY (LY+/RD-) evidenciam o acoplamento juncional (Fig.13), já que somente este permeia junções comunicantes.

### 3. 3. ENSAIO DE REAGREGAÇÃO CELULAR

Esse protocolo foi adaptado do ensaio de reagregação celular entre neurônios corticais e estriatais, proposto por Götz e cols (1996) para analisar a adesividade entre estes dois grupos celulares, bem como as moléculas de adesão envolvidas neste evento. Nossas adaptações se fizeram no sentido de observar principalmente o acoplamento juncional entre as células das VZs cortical e estriatal (Fig. 14).

Os cérebros de animais E16 (foram 3 experimentos separados, em que utilizamos 1 ninhada para cada [aproximadamente 8 fetos]) foram seccionados coronalmente em fatias de 300 $\mu$ m. Então, dissecamos a VZ de Ctx e GE em SSG gelada, isoladamente (Fig.14). Transferimos o material para tubos de 15 ml, retiramos o excesso de SSG e lavamos 3 vezes com PBS/glicose à temperatura ambiente (TA). As amostras foram deixadas por 15' a 37°C em PBS/glicose  $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup>. Dissociamos as células de ambas as amostras com pipetas pasteur polidas tratadas com soro fetal bovino (SFB) por no mínimo 2 horas. Foram feitos aproximadamente 20 ciclos de pipetagem a fim de dissociar as células das amostras. Transferimos o sobrenadante para tubos de 15 ml e centrifugamos por 5-10' a 4000 rpm. Os *pellets* foram ressuspensos em um pequeno volume de PBS/glicose  $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup>. Procedemos a contagem do número de células em câmara de Neubauer e completamos o volume com PBS/glicose  $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup> de forma a chegar à proporção de 1000 células/ $\mu$ l. Pegamos metade do volume de cada amostra, reservando a outra metade, centrifugamos por 5-10' a 4000 rpm e desprezamos o sobrenadante. Ressuspendemos os *pellets* e procedemos de modo a incubar as amostras em PKH26 (Sigma; conforme instrução do fabricante) por 2-5' à TA. Paralisamos a marcação, incubando com um volume igual de SFB, por 1', à TA. Diluímos com

# E16



**Figura 14. Esquema ilustrativo dos principais procedimentos adotados nos ensaios de reagregação celular**

As amostras de córtex e de GE são dissociadas e uma delas é carregada com os corantes PKH26 (vermelho) e calceína (verde), não-permeante e permeante de junções comunicantes, respectivamente. Seguem a mistura das duas amostras (Ctx e GE) em diferentes combinações (Ctx\*GE, GE\*GE, Ctx\*Ctx e CtxGE\* - o asterisco indica a amostra que foi marcada com o duo de corantes) e a reagregação celular.

volume igual de meio de cultura com soro (MCS). Centrifugamos por 5' a 4000 rpm, removemos o sobrenadante, acrescentamos MCS e transferimos as células para outro tubo. Repetimos o processo de lavagem, alternando centrifugação e ressuspensão por 3 vezes em pequeno volume. A última lavagem utilizou 10 ml, a fim de remover completamente o corante. Centrifugamos por 5' a 4000 rpm e ressuspendemos em uma solução de calceína AM em dextrose (1µl de Calceína AM em DMSO para 1ml de solução dextrose 0,3 M). Transferimos o material para *ependorfs* e mantivemos a 37°C, por 15'. Centrifugamos e ressuspendemos as amostras em meio sem soro (MSS) 3 vezes, por 5' a 4000 rpm. Reincubamos a 37°C por 10', para clivagem adicional da calceína. Centrifugamos e ressuspendemos os *pellets* em 100µl de solução de bisbenzimidida, por 3' à TA. Procedemos 3 lavagens em PBS/glicose alternando com ciclos de centrifugação (5' a 4000 rpm). Ressuspendemos em MSS obedecendo ao volume de 1000 células/µl. Nesta etapa, centrifugamos as metades das amostras que foram reservadas sem tratamento com os corantes, ressuspendemos em MSS, respeitando a proporção de 1000 células/µl.

Ao fim dessa etapa, tínhamos em mãos 4 amostras (Fig. 14) – células do Ctx marcadas com PKH26, calceína e bisbenzimidida (Ctx\*), células do córtex não-marcadas (Ctx), células da GE marcadas com PKH26, calceína e bisbenzimidida (GE\*) e, finalmente, células da GE não-marcadas (GE). Realizamos, então, diferentes combinações de células usando as 4 amostras. São elas: Ctx\*/Ctx; Ctx\*/GE; GE\*/GE; GE\*/Ctx (Fig. 14).

Após a mistura, ressuspendemos levemente e incubamos por 30-60' a 37°C, com agitação manual periódica dos *ependorfs* a cada 10', a fim de promover a reagregação celular. Ao final deste período, centrifugamos por 1-2' e colocamos pequena quantidade de MSS. Fixamos os agregados em formalina 37% (40µl de

formalina para 200µl de MSS) à TA, por 2 horas. Centrifugamos e ressuspendemos em aproximadamente 50µl de PBS.

A visualização e a análise dos dados foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência (Axioplan, Zeiss).

Algumas considerações a respeito dos corantes devem ser mencionadas:

- PKH26 (Sigma), um rastreador lipofílico, funcionaria como um indicador das células que contêm calceína antes do início da reagregação. As células que, ao término do ensaio, contivessem apenas calceína seriam interpretadas como células que receberam esta molécula por acoplamento juncional.

- Calceína AM (Molecular Probes), um diéster que se comporta como substrato de esterases citosólicas. Após a hidrolização, a molécula de calceína torna-se hidrofílica, sendo incapaz de atravessar a membrana plasmática livremente, fazendo-o apenas via junções comunicantes (El Fouly *et al.*, 1987).

### **3. 4. IMUNO- HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CONEXINAS**

Os cérebros de embriões de ratos E16 (n=2) foram dissecados e fixados em HistoChoice (Amresco) diluído na concentração de 1:19 (v/v) em água destilada, a 37°C, por 1 hora. A seguir, os cérebros foram crioprotégidos em solução com gradiente crescente de sucrose a 10% e 20% (m/v) em HistoChoice, com intervalo de 1 dia entre os procedimentos.

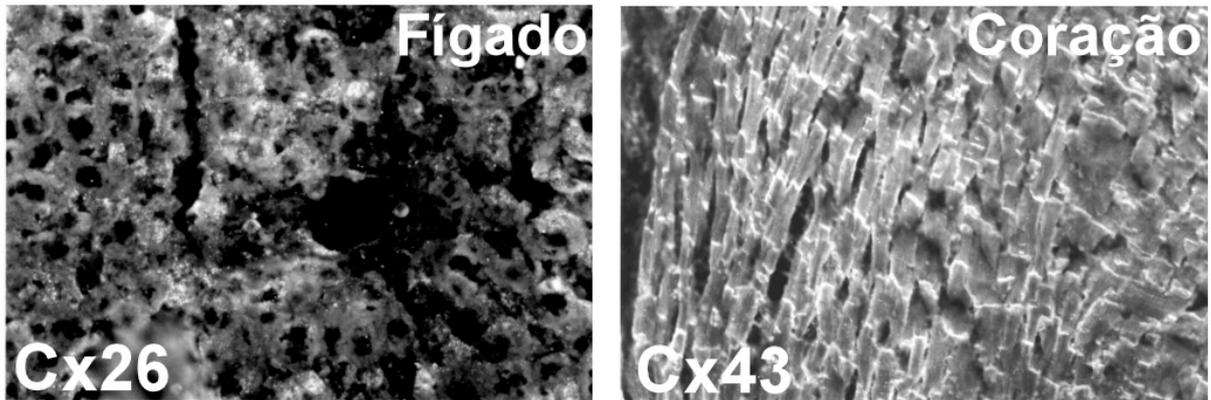
Os cérebros foram incluídos em OCT e crio-seccionados coronalmente em cortes de 12 a 16 µm de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas gelatinizadas e pós-fixados em vapor de PFA por 15', lavados 3x com PBS.

Para detecção de conexina 26, seguiu-se a incubação, por 1 hora, à TA, em solução bloqueadora (Triton x-100 0,1% [v/v] e soro normal de coelho 10% [v/v] em PBS) e incubação em anticorpo primário diluído na solução bloqueadora por 24 horas a 4°C, em câmara úmida. O anticorpo primário utilizado foi o policlonal anti-conexina 26 (1:100; Santa Cruz), gerado na cabra. Lavamos os cortes 3x com PBS e incubamos em anticorpo secundário biotilado anti-IgG de cabra gerado em coelho (1:100; Vector), diluído na solução bloqueadora por 2 h, à TA, em câmara úmida. Lavamos 3x com PBS e incubamos em estreptavidina conjugada a Cy3 (Sigma) diluída em PBS (1:100), por 40', em TA.

Para a detecção de conexina 43, o protocolo seguido foi o mesmo mencionado acima, porém a solução bloqueadora continha soro normal de cabra e o anticorpo primário utilizado foi o monoclonal anti-conexina 43 (1:50; Zymed) obtido no camundongo; o secundário foi o anticorpo conjugado com Cy3 obtido na cabra contra IgG de camundongo (1:800; Jackson).

Após isso, lavamos os cortes 3x com PBS e marcamos com DAPI por 1'. Lavamos novamente 3x com PBS. A visualização das imagens, bem como sua captura, foram feitas em microscópio óptico de fluorescência (Axioplan, Zeiss).

Provemos controles positivos e negativos dos anticorpos primários contra as conexinas 26 e 43. Os controles positivos, nos quais houve robusta detecção do epítipo (Fig.15), foram obtidos, respectivamente, em cortes de fígado e coração, áreas de expressão comprovada das referidas conexinas (Evans e Martin, 2002). Nos controles negativos (informação não mostrada), não houve qualquer reatividade.



**Figura 15. Controles positivos referentes aos anticorpos utilizados para detecção das conexas 26 e 43**

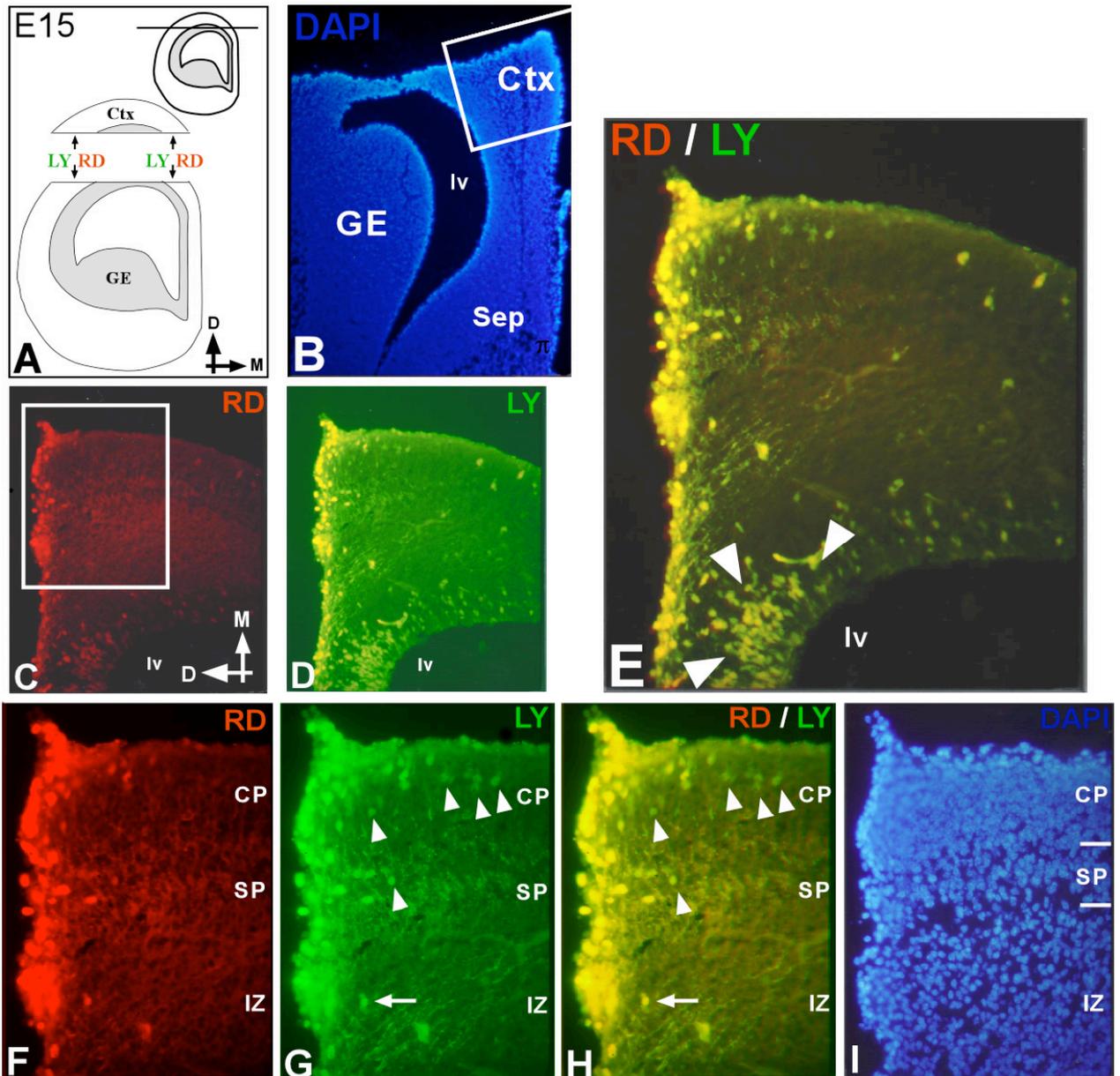
Fotomicrografias de fluorescência obtidas a partir de crio-seções ( $6\ \mu\text{m}$ ) de fígado e coração de ratas adultas submetidas à imunomarcagem para as conexas 26 e 43, respectivamente. Esses tecidos (fígado e coração) são áreas que, comprovadamente, expressam tais conexas. Assim, esta marcação funciona como controle positivo, atestando a função dos anticorpos primários utilizados.

## 4. RESULTADOS

### 4. 1. CARREGAMENTO POR TRANSECÇÃO

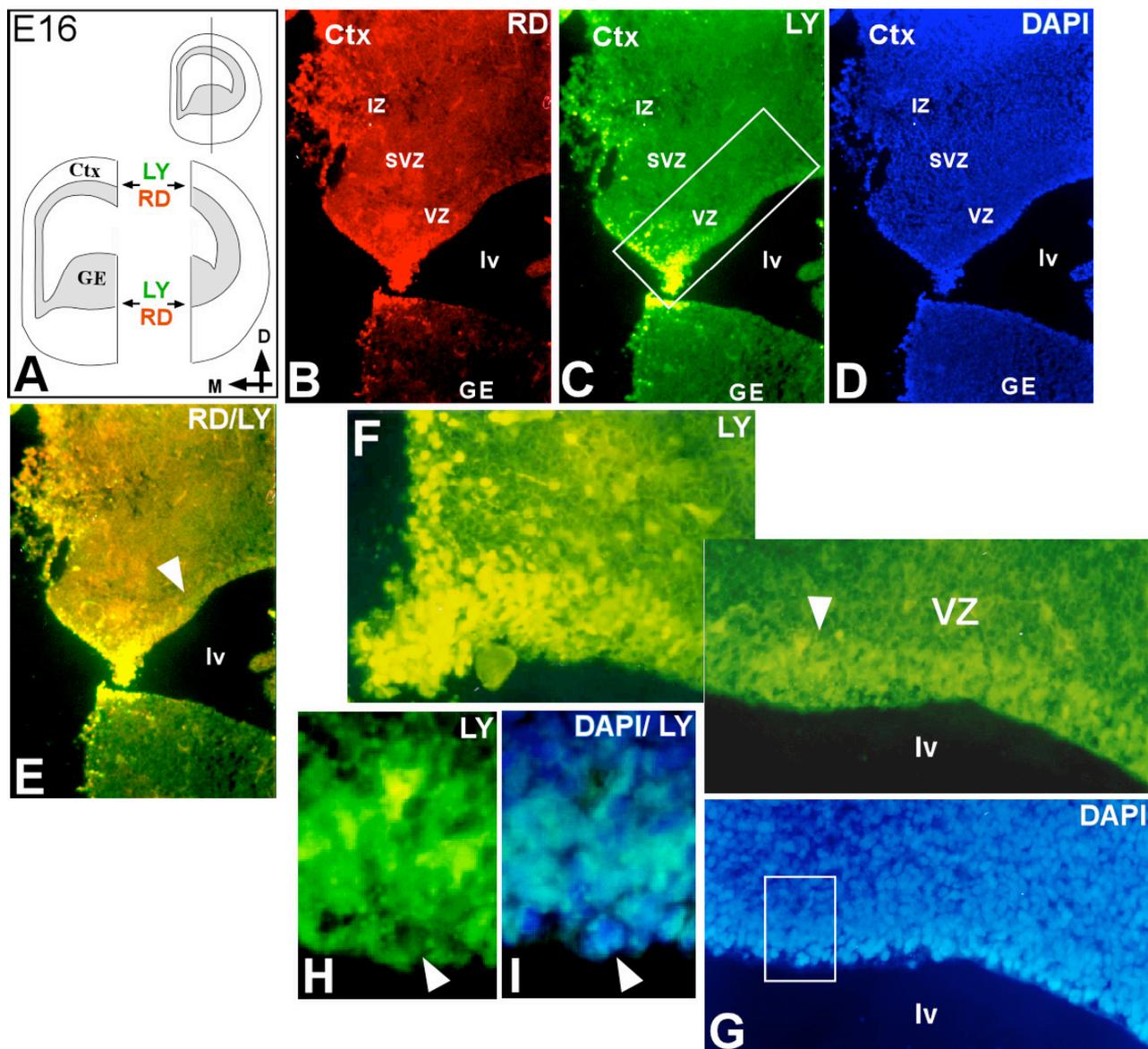
Com vistas a analisar o padrão de AJ no telencefalo embrionário, em especial na região da FCE, realizamos os ensaios de carregamento por transecção, que usados anteriormente em idades pós-natal para detecção de transferência intercelular de corantes, demonstraram com sucesso o acoplamento celular mediado por junções comunicantes *in situ* (Menezes *et al.*, 2000). De forma semelhante ao encontrado em idades pós-natal, foi possível detectar na profundidade das fatias embrionárias células marcadas diretamente pelo corte de carregamento. Estas células se apresentavam marcadas por ambos os corantes utilizados, LY e RD, respectivamente permeante e não-permeante de junções comunicantes, ou somente para LY (células acopladas) (Fig. 16, E e H).

Com esta técnica, observamos que a distribuição do acoplamento no córtex embrionário durante o período neurogênico, nas camadas celulares da parede telencefálica, refletiu a distribuição do acoplamento juncional previamente descrito por outras técnicas para esta região: intenso acoplamento celular nas zonas germinativas (Fig 16, E, área compreendida entre as cabeças de seta), subplaca e placa cortical (Fig. 16, F-H, cabeças de seta) e pouca ou nenhuma célula acoplada na zona intermediária (Fig. 16, F-H, seta; LoTurco e kriegstein, 1991; Bittman *et al.* 1997; Bittman *et al.*, 1999). Na placa cortical, as células acopladas (LY+/RD-) aparentavam morfologia mais madura e situavam-se principalmente nas porções mais profundas desta camada, indicando um grau de maturação mais avançado e pós-migratório (Fig. 16, F-H, cabeças de seta, e resultados não mostrados).



**Figura 16. Presença de AJ na placa cortical e nas camadas germinativas durante o período neurogênico**

Fotomicrografias de fluorescência de criossecções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros de embriões E15 após “transection loading”. Em A, um esquema ilustrativo do plano de corte adotado durante o carregamento por transecção. B, C e D mostram a marcação com DAPI (azul), Rodamina Dextrana (RD; vermelho) e Lucifer Yellow (LY; verde), respectivamente. Em E, imagem de dupla marcação com RD e LY, de C e D. Células duplamente marcadas (amarelo) tiveram seus corpos celulares ou seus prolongamentos lesados na superfície de corte durante os procedimentos da técnica de carregamento por transecção. As células verdes apenas têm marcação originária do espalhamento do LY através de acoplamento juncional. Estão presentes nas camadas germinativas (na região compreendida entre as cabeças de seta), bem como no manto do telencéfalo dorsal. F-I, são imagens em maior aumento do retângulo delimitado em C, na região do telencéfalo dorsal e mostram marcações com RD, LY, , dupla marcação RD/LY e DAPI, respectivamente. As cabeças de seta em G e H apontam células acopladas na placa cortical, enquanto que a seta aponta uma célula não-acoplada na IZ. Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), Sep (primórdios do septo), Iv (ventrículo lateral), D (dorsal), M (medial) placa cortical (CP), subplaca (SP) e zona intermediária (IZ).



**Figura 17. Presença de acoplamento juncional em faixa paralela à superfície ventricular no telencéfalo dorsal**

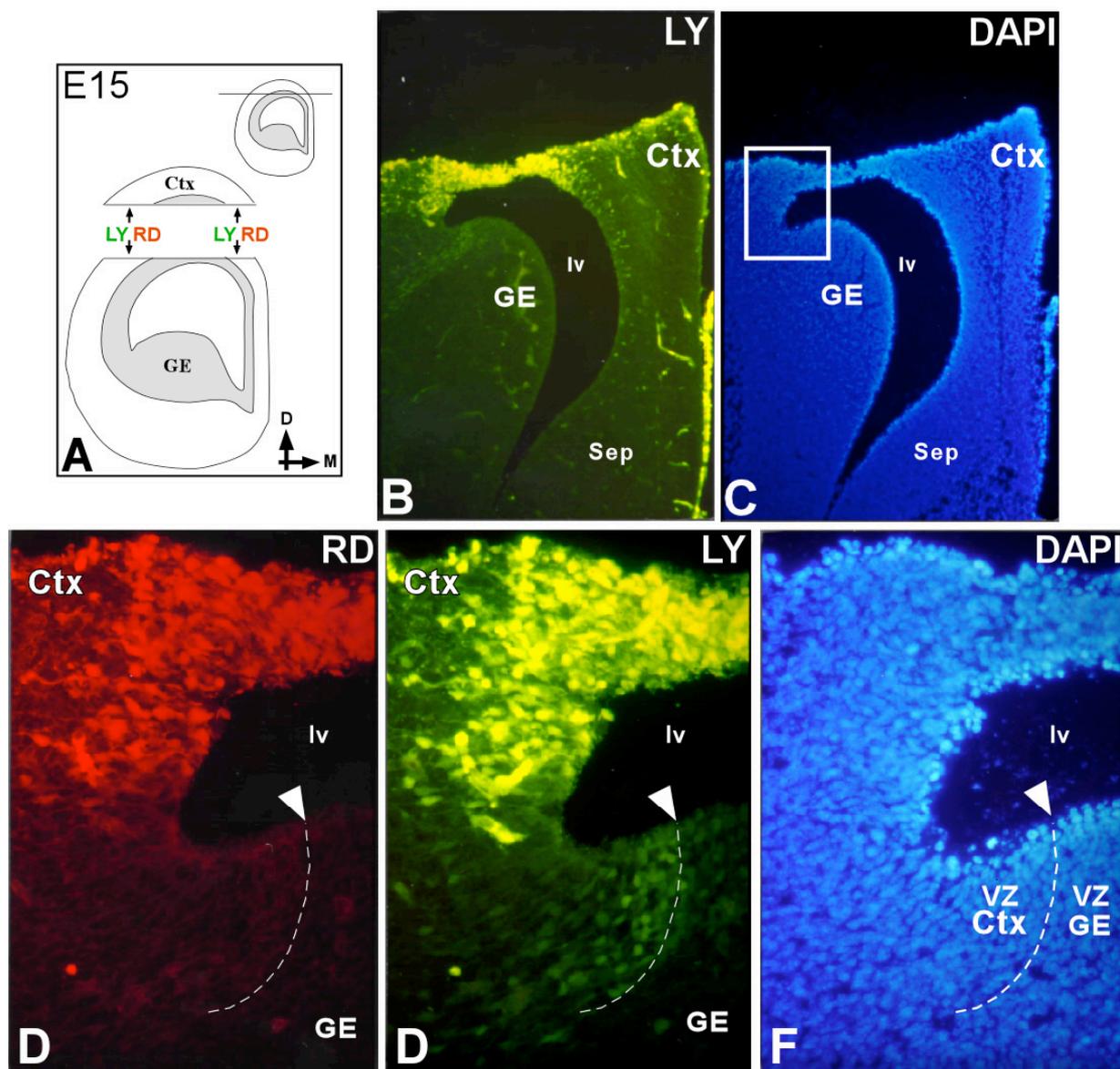
Fotomicrografia de fluorescência de criossecções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros de embriões E16 submetidos ao "transection loading". Em A, esquema ilustrativo do plano de corte adotado durante o carregamento por transecção. B-E, mostram a marcação com RD (vermelho), LY (verde), DAPI (azul) e dupla (RD + LY) respectivamente. A presença, na VZ cortical, de células LY+/RD-, sugere extenso acoplamento juncional (C e E). F e G são imagens em maior aumento da região delimitada em C, incluindo as camadas germinativas do telencéfalo dorsal. As células LY+/RD- evidenciam uma faixa de acoplamento juncional por toda esta extensão da VZ (F). G, contracoloração com DAPI. H e I, são imagens ampliadas das regiões delimitadas por retângulos na figura G. Em H, marcação com LY; em I, dupla marcação com DAPI e LY. Como visto em H e I, as figuras mitóticas nunca se encontravam marcadas (cabeça de seta). Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), IZ (zona intermediária), SVZ (zona subventricular), VZ (zona ventricular), lv (ventrículo lateral), D (dorsal), M (medial).

Além disto, algumas células apresentavam-se acopladas também na subplaca (Fig. 16, F-H, cabeça de seta), local onde situam-se os neurônios primeiramente gerados da parede telencefálica, conseqüentemente mais maduros.

Nas camadas germinativas do *pallium* e do *subpallium*, mais marcadamente na zona ventricular, o acoplamento detectado por corantes mostrou-se mais robusto (Figs. 16-19). As células acopladas (LY+/RD-) nas VZs de *pallium* e *subpallium* apresentaram-se majoritariamente em faixas paralelas à superfície ventricular (ortogonais à superfície do corte de carregamento), indicando um certo grau de difusão tangencial intercelular do corante (Figs. 16-19). Caracteristicamente, estas células apresentaram morfologia alongada e radial, com os núcleos em posições variadas dentro da camada refletindo a disposição pseudoestratificada do neuroepitélio nestas idades (Fig. 16, E, área compreendida entre as cabeças de seta, e resultado não mostrado).

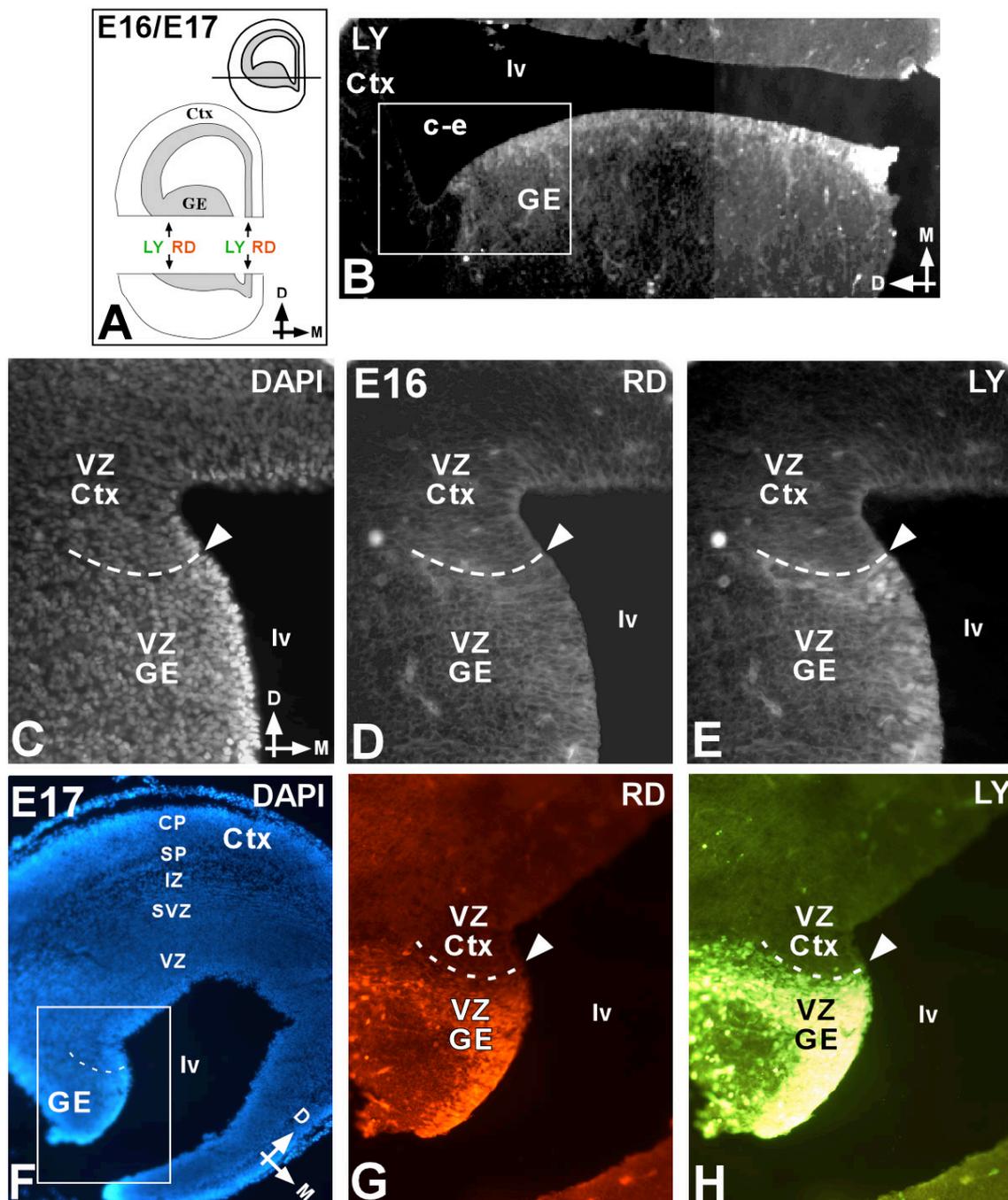
Apesar da marcação bastante completa do perfil celular obtido com o LY, apenas pela análise das características morfológicas das células marcadas não foi possível diferenciar células de glia radial e células neuroepiteliais, ambas células progenitoras presentes nestas camadas, mas com potenciais generativos distintos (Anthony *et al.*, 2004). Em contrapartida, não encontramos sinais de células acopladas com disposição não-radial na VZ do telencefalo dorsal, o que indica que neuroblastos migrando tangencialmente na VZ não se encontram acoplados de forma significativa. Conforme esperado, não houve acoplamento entre as figuras mitóticas e as células circunjacentes (Fig. 17, H e I, cabeça de seta; Bittman *et al.*, 1997).

Embora a presença de AJ nas VZs do Ctx e da GE tenha sido marcante, as células das camadas proliferativas destas duas grandes subdivisões não acoplaram



**Figura 18. Restrição ao acoplamento juncional entre as subdivisões telencefálicas no sentido dorso-ventral**

Fotomicrografias de fluorescência de crioseções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros E15 submetidos ao "transection loading". A, esquema ilustrativo do plano de corte adotado durante o carregamento por transecção. B e C, mostram a marcação com LY (verde) e DAPI (azul), respectivamente. D-F, são imagens em maior aumento da região delimitada em C, e mostram marcações com RD (vermelho), LY (verde) e DAPI, respectivamente. A cabeça de seta em D-F aponta a posição de um grupo de células acopladas na região presumida da borda córtico-estriatal. O espalhamento do LY, que teve início nas camadas germinativas do telencéfalo dorsal, pára abruptamente na borda limitrofe com o telencéfalo ventral, sugerindo a existência de uma restrição ao acoplamento juncional entre as camadas germinativas das subdivisões telencefálicas no sentido dorso-ventral. Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), Sep (primórdios do septo), lv (ventrículo lateral), D (dorsal), M (medial).



### Figura 19. Restrição bidirecional ao acoplamento juncional

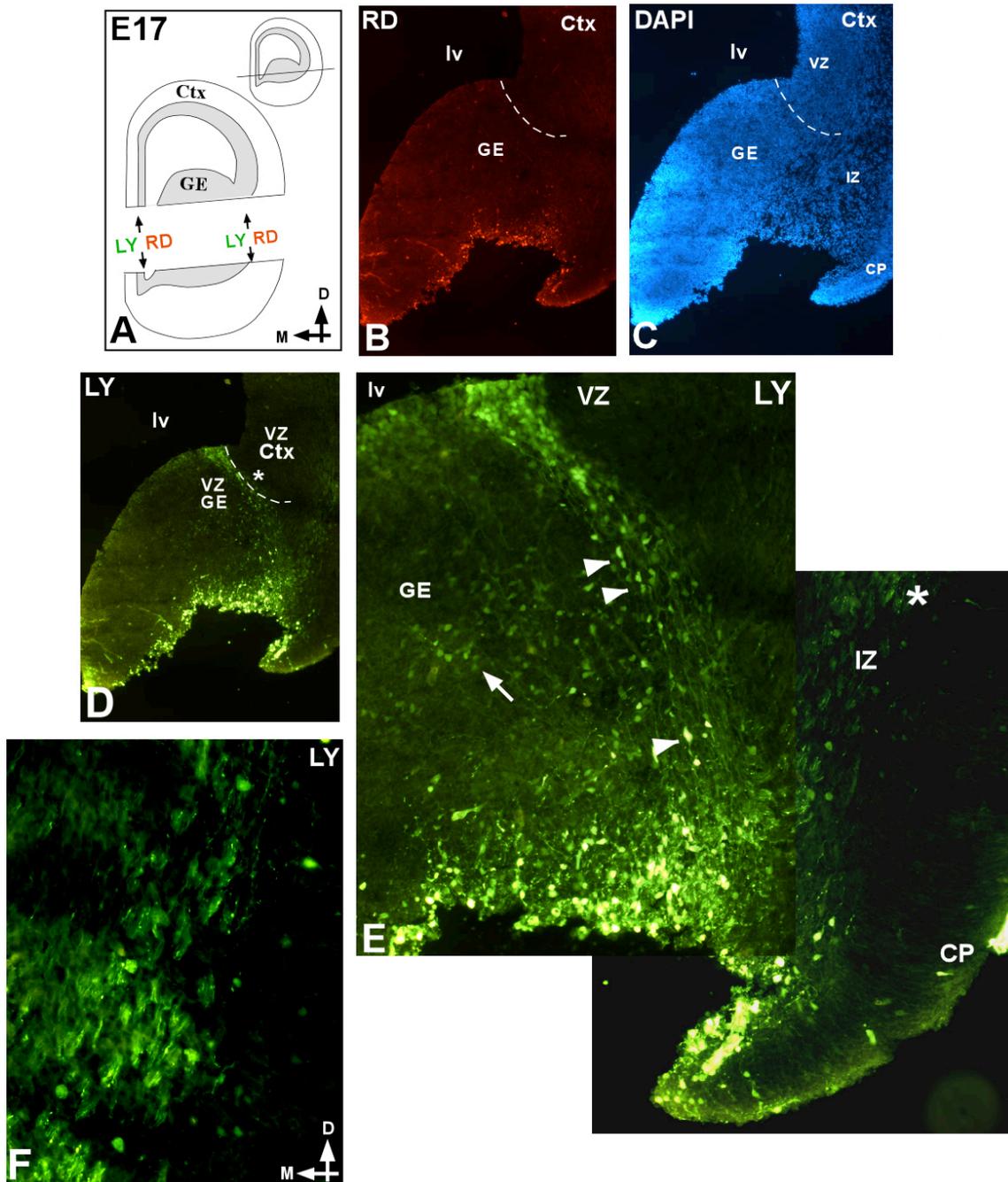
Fotomicrografias de fluorescência de criossecções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros E16 submetidos ao "transection loading". A, esquema ilustrativo do plano de corte adotado durante o carregamento por transecção. Em B, imagem em menor aumento contendo a região ampliada em C-E (delimitada pelo retângulo), mostrando a marcação com LY. C e F mostram a contracoloração com DAPI (azul); D e G, RD (vermelho); E e H, LY (verde). As células acopladas na VZ formam uma extensa faixa, conforme mostrado em D e E, G e H. Esta banda de acoplamento cessa na presumida região da borda córtico-estriatal (cabeças de seta em D e E, G e H). Desta forma, a restrição ao acoplamento juncional na VZ telencefálica parece ocorrer também no sentido ventro-dorsal. Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), CP (placa cortical), SP (subplaca), IZ (zona intermediária), SVZ (zona subventricular), VZ (zona ventricular), lv (ventrículo lateral), D (dorsal), M (medial).

interregionalmente (Figs. 18 e 19). O AJ se revela restrito a um dos dois grandes domínios telencefálicos, aquele atingido diretamente pela transecção (Figs. 18-20). Nestas figuras, é possível ver que a extensa difusão intercelular de corante cessa de forma abrupta na presumida barreira córtico-estriatal (seta, linha pontilhada), que parece funcionar como uma borda restritiva ao acoplamento celular e, conseqüentemente, à difusão do corante.

Vale ressaltar ainda a bidirecionalidade na restrição ao AJ na VZ telencefálica. Em outras palavras, tal restrição se dá do Ctx para a GE (Fig. 18) e *vice-versa* (Figs. 19 e 20). Não importando então onde se situa o corte de carregamento, a difusão intercelular de corante cessa abruptamente na interface entre as zonas ventriculares, reconhecida facilmente pela orientação das células cujos núcleos são revelados por contra-colaração com DAPI (Figs. 16, 18, 19 e 20).

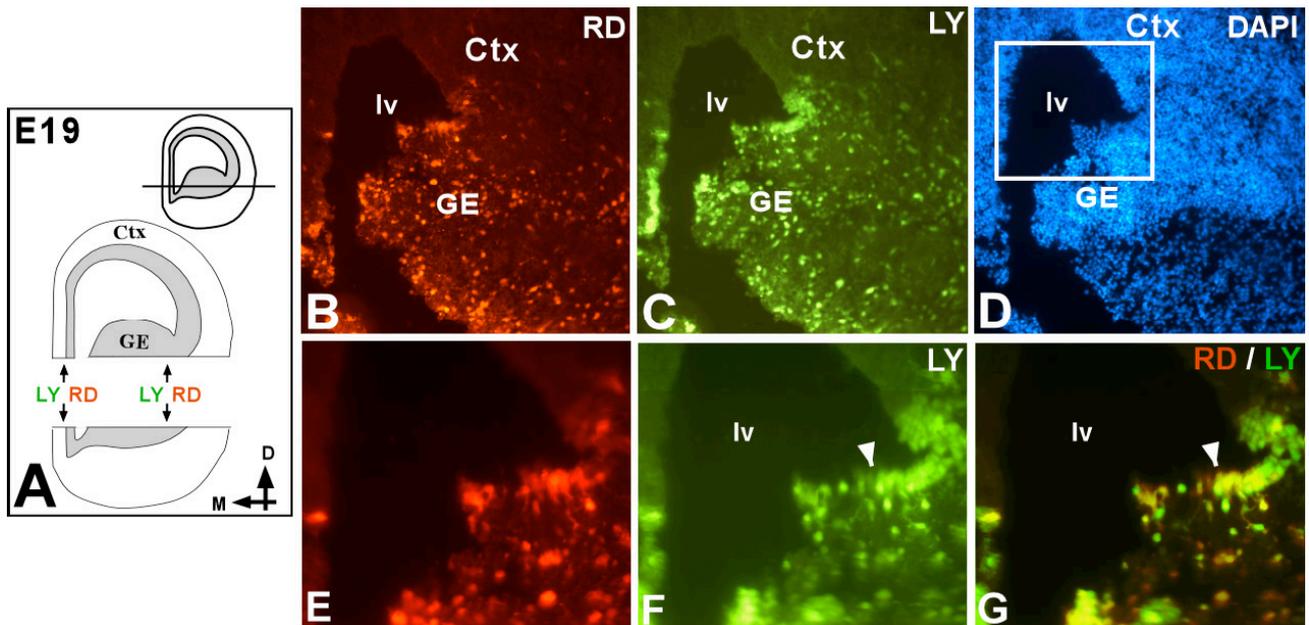
Em alguns casos, quando as células de glia radial da região do ângulo se apresentaram carregadas, pudemos ver, em proximidade a estas, outras células acopladas aparentemente organizadas em cadeia, apresentando morfologia migratória (Fig. 20, E, cabeças de seta). Tais células partem da região de borda entre VZ de Ctx e de GE, dirigindo-se ao córtex ventrolateral. Contudo, não pudemos classificá-las quanto ao seu tipo celular. Diferente do encontrado para a VZ cortical, na SVZ da GE encontramos células acopladas em disposição não-radial (Fig. 20, E, seta).

De forma inesperada, em um corte de carregamento atravessando o telencéfalo basal (Fig. 20) verificamos a presença de acoplamento celular na IZ, em sua região suprajacente ao estriado. Sendo a IZ, reconhecidamente, uma rota usual de migração tangencial (Denaxa *et al.*, 2001), é possível que as células acopladas nesta região estejam migrando da GE rumo ao Ctx (migração tangencial), já que



**Figura 20. Acoplamento juncional em populações específicas no telencéfalo**

Fotomicrografias de fluorescência de criosecções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros E17 submetidos a “transection loading”. Em A, esquema ilustrativo do plano de corte adotado durante o carregamento por transecção. B, C e D, mostram a marcação com RD (vermelho), DAPI (azul) e LY (verde), respectivamente. Em E, maior aumento da região correspondente ao asterisco em D. O acoplamento se apresenta em uma faixa na VZ da GE, e numa corrente rumo ao córtex ventrolateral em formação, a partir da borda córtico-estriatal. Várias células acopladas nesta corrente apresentam morfologia migratória (cabeças de seta em E). Vemos ainda a presença de células acopladas no interior da SVZ da GE (seta). O asterisco indica parte da região onde se detecta o acoplamento juncional na IZ. Em F, a continuidade do acoplamento presente na região do asterisco em E, na IZ. Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), CP (placa cortical), IZ (zona intermediária), Iv (ventrículo lateral), D (dorsal), M (medial).



**Figura 21. A borda córtico-estriatal deixa de restringir o acoplamento juncional ou sofre deslocamento ao final da neurogênese**

Fotomicrografias de fluorescência de criossecções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros E19 submetidos a "transection loading". A, esquema ilustrativo do plano de corte adotado durante o carregamento por transecção. B-D, mostram a marcação com RD (vermelho), LY (verde) e DAPI (azul), respectivamente. E-G, são imagens em maior aumento da área delimitada por um retângulo em D. Em E, marcação com RD; em F, marcação com LY; em G, dupla marcação com RD e LY. A cabeça de seta em F e G aponta aproximadamente a localização da borda córtico-estriatal em estágios mais precoces. No telencéfalo E19, o acoplamento juncional no sentido ventro-dorsal deteve-se numa posição consideravelmente mais dorsal em relação ao ocorrido em telencéfalos de animais mais jovens. Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), lv (ventrículo lateral), D (dorsal), M (medial).

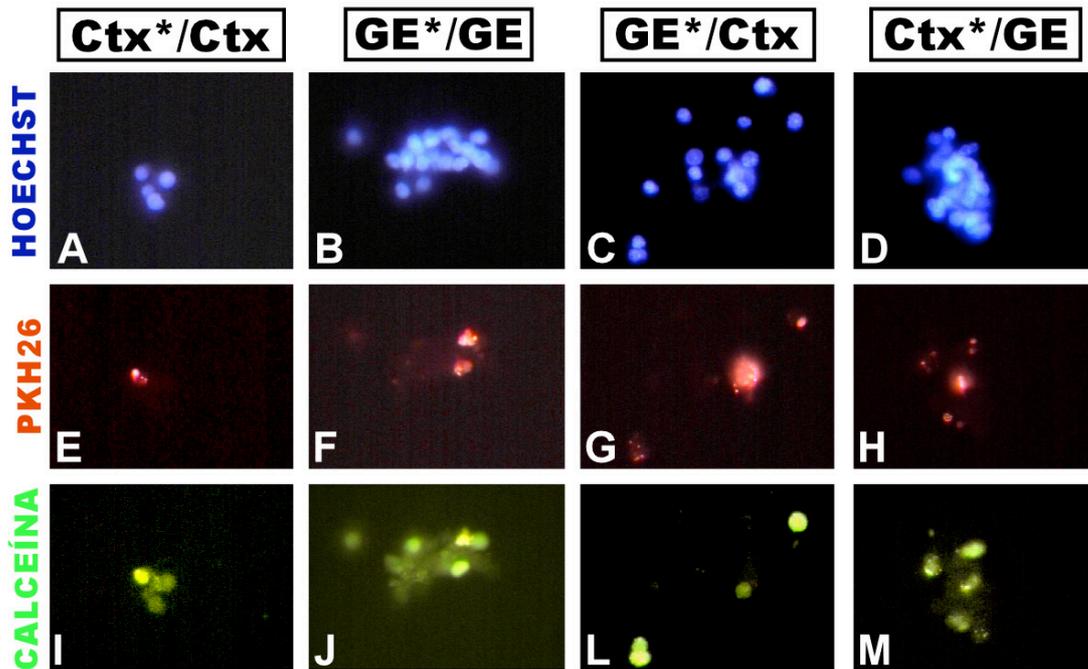
neurônios imaturos em migração radial aparentemente não se apresentam acoplados (Bittman *et al.*, 1997).

Acreditamos que o padrão de AJ na VZ telencefálica se manteve inalterado no intervalo de idades entre E15-E17 (figs. 16-20), faixa etária em que analisamos a interface entre o acoplamento juncional restrito e a FCE. Provavelmente, o mesmo comportamento juncional esteve presente durante todo o período neurogênico precoce. No entanto, na neurogênese cortical avançada, aparentemente esta barreira sofre uma atenuação e encontramos sinais de difusão do corante para além das fronteiras entre *pallium* e *subpallium* (Fig. 21).

#### **4. 2. ENSAIO DE REAGREGAÇÃO CELULAR**

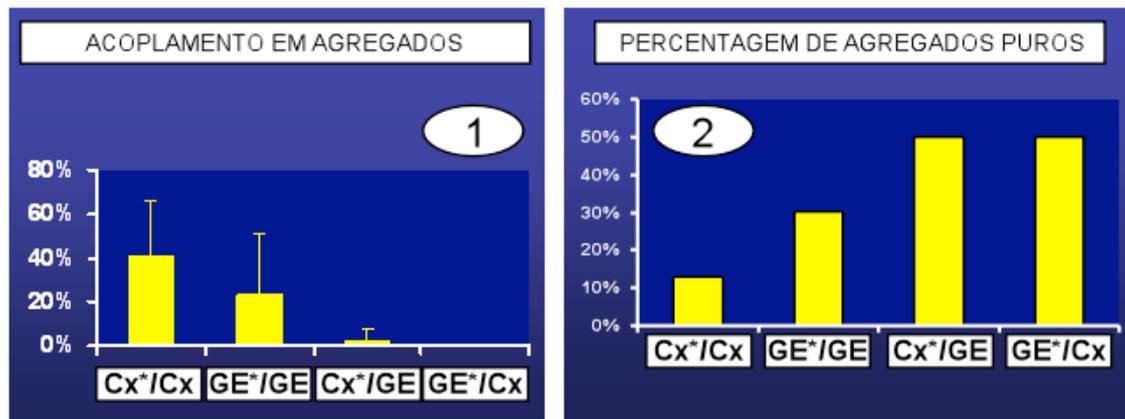
Para analisar o potencial de acoplamento celular entre as células da VZ das diferentes regiões do telencéfalo, lançamos mão de um ensaio de reagregação celular “in vitro” (adaptado de Gotz *et al.*, 1996). Neste ensaio, as células oriundas das VZs de Ctx e GE são dissociadas e separadas em dois grupos, sendo que as células de um destes grupos são carregadas com corantes específicos. Os dois grupos são então misturados para permitir a reagregação por uma hora em suspensão, a fim de analisar a capacidade de acoplamento intra e inter-regional, destas populações (V. Mat e met.). Esta técnica de reagregação celular maximiza as interações célula-célula e exclui os possíveis componentes histoarquitetônicos, possivelmente presentes no ensaio de carregamento por transecção, que pudessem estar contribuindo para a restrição ao AJ na VZ telencefálica.

Nossos resultados, produzidos a partir de cérebros de animais E16, sugerem que as células das subdivisões distintas da VZ telencefálica não acoplam



**Figura 22. Ensaio de reagregação celular**

Ensaio de reagregação celular a partir de amostras das VZs das principais subdivisões telencefálicas – *pallium* (córtex - Ctx) e *subpallium* (corpo estriado – GE) obtidas de embriões E16. O asterisco representa as regiões que tiveram suas células carregadas com os corantes antes da reagregação. Note que o acoplamento (células apenas calceína+) é maior em reagregados homotípicos.



**Figura 23. O acoplamento juncional restrito e a adesão celular seletiva parecem correlacionar-se diretamente.**

Em 1, as taxas de acoplamento juncional nos agregados com as diferentes combinações celulares. Nas combinações intrarregionais de Ctx e GE, tal taxa foi de 40% e 20%, respectivamente. Nos combinados interregionais, as taxas foram inferiores a 5%. Em 2, a percentagem de agregados puros (agregados compostos de apenas de células marcadas ou não marcadas) em cada combinado celular. No modo heterotópico, tal percentagem foi mais elevada (50%) que no homotópico (10% e 30% para Ctx e GE, respectivamente). As células provenientes das VZs de *pallium* e *subpallium* tiveram baixas taxas de adesão e consequentemente de acoplamento juncional entre estas mas não boa adesão e acoplamento internamente.

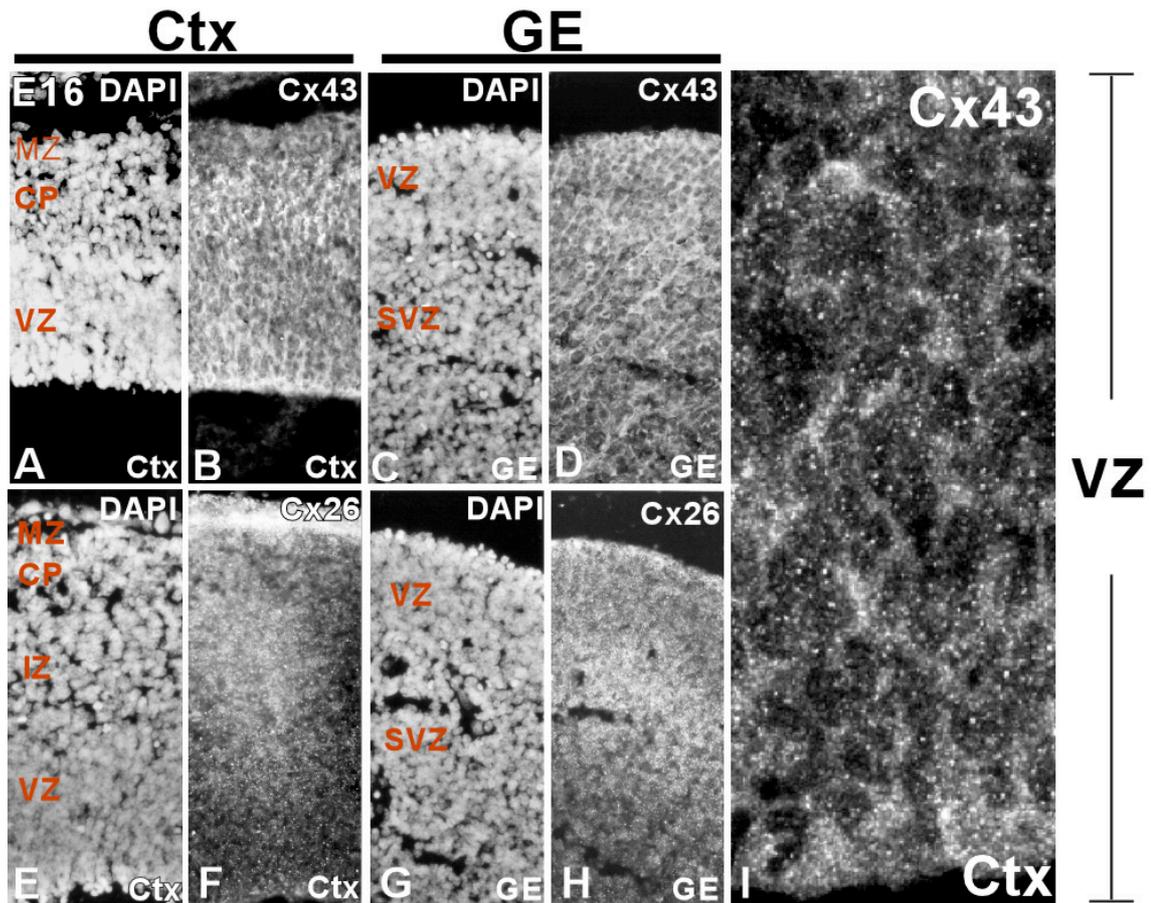
heterotopicamente, ou seja, células das VZs de Ctx e GE não acoplam entre si nos agregados. Nos agregados homotópicos a taxa de acoplamento juncional é de 40% e 25% entre as células de Ctx e GE, respectivamente (Fig.22, 1ª e 2ª colunas; Fig. 23, 1), e dramaticamente reduzida (<5%) nos agregados heterotópicos (Fig. 22, 3ª e 4ª colunas; Fig.23, 1).

A adesividade entre as células das diferentes combinações também foi analisada. A percentagem de agregados puros (compostos específica e inteiramente por células coradas ou não-coradas) foi de 10% e 30% entre as células de Ctx e GE, respectivamente, nos agregados homotópicos (Fig. 23, 2). Na agregação heterotópica houve um considerável aumento de 50%, indicando que as células oriundas do *pallium* ou *subpallium* preferiam reagregar-se com células de origens semelhantes (Fig. 23, 2). Isto sugere fortemente que o acoplamento juncional restrito parece, então, correlacionar-se diretamente com a adesão celular seletiva.

### 4. 3. IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CONEXINAS

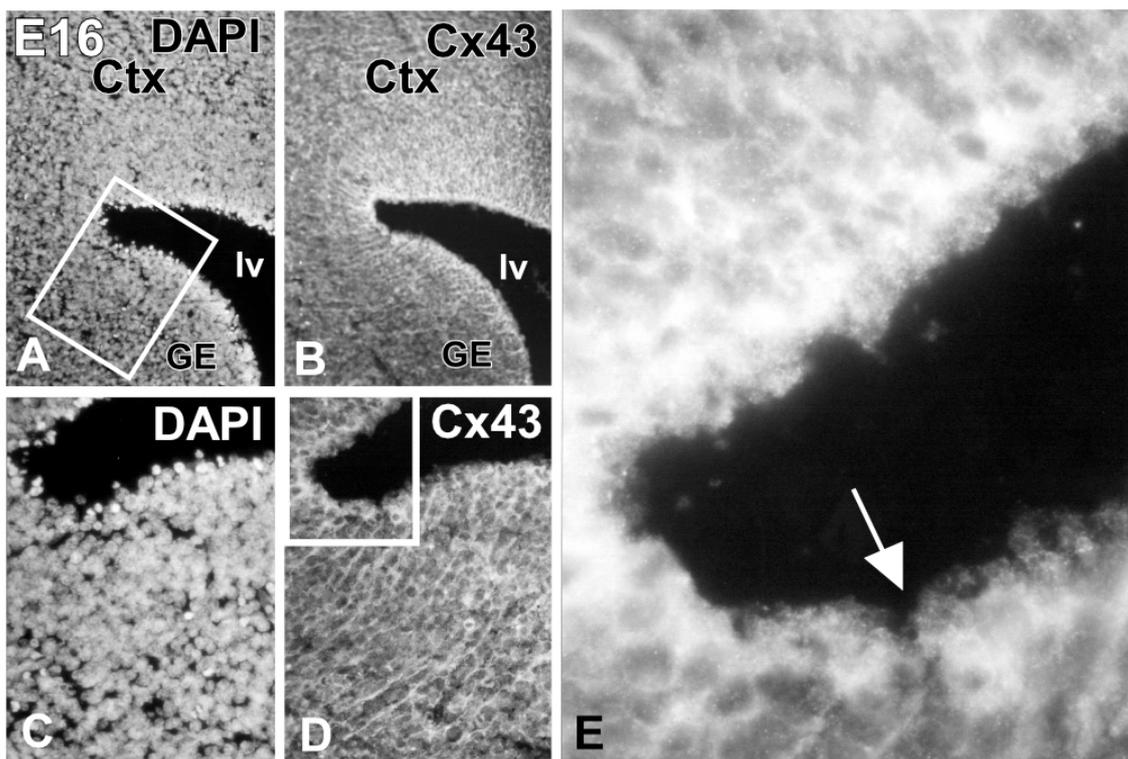
As células das VZs de córtex e GE poderiam não estabelecer AJ entre si por expressarem diferentes repertórios de conexinas. Tais conexinas poderiam não ser compatíveis para formar canais heterotípicos. Assim, seriam estabelecidos dois compartimentos telencefálicos (córtex e GE) em decorrência de padrões específicos de expressão de conexinas. Neste sentido submetemos cortes de telencéfalo de embriões E16 à imuno-histoquímica para detecção das conexinas 26 e 43, representantes das famílias  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente (Spray e Dermietzel, 1996). Ambas já foram encontradas abundantemente no telencéfalo durante a embriogênese, em especial durante o período de atividade neurogênica (Nadarajah *et al.*, 1997).

Nossos ensaios confirmaram a presença de ambas as conexinas nas zonas proliferativas telencefálicas e excluíram a expressão diferencial significativa entre os diferentes domínios telencefálicos (Fig. 24). A expressão das conexinas 26 e 43 não pareceu significativamente heterogênea, nem mesmo na região da FCE (Fig. 25, E, seta).



**Figura 24. A distribuição das conexinas 43 e 26 não parece ser significativamente heterogênea na extensão da VZ telencefálica**

Fotomicrografias de fluorescência de criosecções coronais (12-16  $\mu\text{m}$ ) de cérebros E16 submetidos à imuno-histoquímica para detecção das conexinas 43 e 26. Em A-D, detecção de conexina 43; em E-H, detecção de conexina 26. Em I, microscopia confocal mostrando a expressão de conexina 43 na VZ cortical. Note sua distribuição principalmente na membrana plasmática. A e B, C e F são imagens do telencéfalo dorsal; C e D, G e H, do telencéfalo ventral. A distribuição de ambas as conexinas parece ser relativamente homogênea em toda a VZ telencefálica. Ctx (primórdios do córtex), GE (eminência ganglionar), MZ (zona marginal), CP (placa cortical), IZ (zona intermediária), VZ (zona ventricular) e SVZ (zona subventricular).



**Figura 25. A expressão de Cx 43 é uniforme também na região da FCE.** Fotomicrografia de fluorescência da região da FCE mostrando a contracoloração com DAPI (A) e a expressão de Cx 43 (B) . A área delimitada pelo retângulo em A tem seu maior aumento em C (DAPI) e D (Cx 43). E corresponde ao maior aumento da região delimitada pelo retângulo em D. Note que a expressão de Cx 43 não se apresenta significativamente heterogênea através da VZ dos domínios cortical e estriatal, inclusive na região da FCE (seta).

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados apontam a existência de uma restrição ao acoplamento celular entre as zonas ventriculares dos grandes domínios telencefálicos embrionários: córtex cerebral e corpo estriado. Os ensaios de carregamento por transecção, complementados pelos ensaios de reagregação celular, indicaram um elo entre o acoplamento celular restrito e a compartimentalização dos domínios germinativos daqueles territórios telencefálicos.

Demonstramos que tal restrição ao acoplamento seria, pelo menos em parte, atribuível ao reconhecimento celular, envolvendo provavelmente complexos de adesão que determinariam a segregação funcional entre as células que compõem as VZs do *pallium* e do *subpallium*. Os aspectos histoarquitetônicos da fronteira córtico-estriatal, no entanto, não parecem ditar seu estabelecimento nem sua manutenção.

### 5. 1. CARREGAMENTO POR TRANSECÇÃO COMO FORMA DE REVELAR O ACOPLAMENTO CELULAR MEDIADO POR JUNÇÕES COMUNICANTES

A técnica de *transection loading* – carregamento por transecção – foi desenvolvida no laboratório como uma forma de detecção rápida e pouco dispendiosa de junções comunicantes funcionais *in vivo*. Este método foi inicialmente empregado no cérebro pós-natal para demonstrar pela primeira vez a existência de acoplamento celular na zona subventricular telencefálica (Menezes *et al.*, 2000). Neste estudo, demonstramos através de manipulações farmacológicas que este acoplamento celular revelado por corantes era mediado por junções comunicantes (Menezes *et al.*, 2000). Além disso, observações a partir desta técnica

em várias estruturas do SNC em desenvolvimento e no adulto mostraram um padrão semelhante ao do acoplamento juncional descrito por métodos convencionais (nestes exemplos a referência correspondente da literatura encontra-se ao final de cada item): 1. No córtex cerebral embrionário (descrito em parte nesta tese) encontramos células acopladas na zona ventricular, subplaca e placa cortical (LoTurco e Kriegstein, 1991; Bittman *et al.*, 1997); 2. No cerebelo pós-natal (Resultados não publicados, Correia, A.; tese de Mestrado, 2002) encontramos acoplamento na camada granular interna, e de células de Purkinje, mas não na camada germinativa granular externa (Pakhotin e Verkhratsky, 2005; Meller *et al.*, 2005; Rácz *et al.*, 2006); 3. Encontramos acoplamento celular na pia-máter (Menezes *et al.*, 2000; e dados não mostrados) em todas as idades estudadas (Mercier e Hatton, 2001; Dermietzel e Spray, 1993); 4. No córtex cerebral pós-natal (Menezes *et al.*, 2000) em neurônios das camadas II-VI (Peinado *et al.*, 1993); 5. No bulbo olfatório (Menezes *et al.*, 2000; e resultados não mostrados) na camada granular interna e nas células mitrais (Reyer *et al.*, 1991); 6. Na retina (Silva, M., 2003; tese de Mestrado; Cusato *et al.* 2000) nas camadas de células ganglionares, na nuclear interna e entre células horizontais (revisado em Vaney, 1999); 7. Na medula espinhal adulta e na primeira semana pós-natal (Alves, J., Tese de Doutorado em preparação), envolvendo motoneurônios e outras células (Chang *et al.*, 1999; 2000).

Nesta tese não procuramos demonstrar formalmente, através de ensaios com bloqueios farmacológicos, que o acoplamento celular observado era mediado por junções comunicantes. Temos alguns motivos para acreditar que este acoplamento celular seja realmente dependente de junções comunicantes: 1. A distribuição deste acoplamento revelado por corantes segue o padrão conhecido de acoplamento

mediado por junções comunicantes para células do córtex cerebral embrionário, i.e., rico acoplamento na VZ, baixo ou inexistente na IZ e presente na placa cortical e subplaca, em neurônios em processo de diferenciação (Bittman *et al.*, 1997; Peinado *et al.*, 1993; LoTurco e Kriegstein, 1991); 2. Ausência de acoplamento por corantes em células mitóticas (Bittman *et al.*, 1997); 3. Ausência de captação dos corantes em cérebros e hemisférios cerebrais não transeccionados (experimentos realizados para o controle da técnica, dados não mostrados). Esta última observação exclui em parte a possibilidade de nossa metodologia revelar a presença de hemicanais de conexinas não-pareados no cérebro em desenvolvimento, como sugerido recentemente (Weissman *et al.*, 2004).

É possível, embora pouco provável, que parte das células que apresentaram acoplamento revelado por corantes tenha sido marcada através da captação de LY por poros formados por receptores purinérgicos P2X7 (Surprenant *et al.*, 1996; Illes e Ribeiro, 2004). Apesar de não podermos excluir a participação destes receptores na incorporação e difusão de LY na nossa preparação, por falta de ensaios farmacológicos, algumas características de nosso modelo e marcação obtida reduzem esta possibilidade: 1. As altas concentrações do ligante (ATP) necessárias para abertura destes poros (Virginio *et al.*, 1999a; 1999b) são pouco prováveis de serem alcançadas na nossa preparação, em que utilizamos um meio pobre em ATP; 2. Apesar de alguns autores defenderem tempos mais curtos para a abertura destes poros na presença de elevadas concentrações de ATP (Virginio *et al.*, 1999a; 1999b), tempos prolongados, da ordem de 10 ou mais minutos têm sido relatados para o registro de níveis detectáveis de captação direta de permeantes, portanto, freqüentemente maiores que o breve tempo de exposição aos corantes (1-3 minutos) utilizado em nosso método; 3. Se houvesse a participação destes poros,

esperaríamos a formação de grumos de células LY+/RD-, uniformemente distribuídos pelo tecido, não obedecendo o claro gradiente de difusão iniciado a partir do corte de carregamento observado em nossos experimentos.

Por fim, apesar de ainda não confirmadas em sistemas endógenos quanto à sua capacidade de formação de canais intercelulares completos e funcionais, não descartamos a possibilidade de que parte do acoplamento celular observado em nossas preparações deva-se a uma classe recém descrita de proteínas juncionais, as panexinas. Recentemente descritas na qualidade de homólogas funcionais das conexinas, porém, não homólogas no seqüenciamento gênico (Bruzzone *et al.*, 2003), estão presentes no cérebro em desenvolvimento (Vogt *et al.*, 2005), mas são ainda pouco estudadas em relação ao seu papel nas camadas germinativas.

## **5. 2. MECANISMOS DE PADRONIZAÇÃO DO SNC E COMUNICAÇÃO JUNCIONAL**

Os eventos de padronização dorso-ventral nos vertebrados têm início mesmo antes da fecundação. Em *Xenopus*, a distribuição assimétrica de moléculas maternas nos oócitos maduros - determinantes citoplasmáticos - provavelmente responde pelo perfil de distribuição molecular do embrião logo após as primeiras divisões celulares. A penetração do espermatozóide no oócito desencadeia uma rotação anti-horária do citoplasma cortical em relação ao citoplasma mais interno - rotação cortical (Vincent e Gerhart, 1987; Kessler e Melton, 1994). Esta gera um rearranjo dos determinantes citoplasmáticos no embrião e permite o posicionamento da atividade determinante dorsal embrionária no lado oposto ao da entrada do espermatozóide no oócito e, por conseguinte, o estabelecimento do eixo dorso-

ventral embrionário (Gerhart *et al.*, 1989; Kessler e Melton, 1994). A definição deste eixo embasa os eventos de indução mesodermal e neural que se seguem.

No prosencéfalo, a especificação do eixo dorso-ventral ocorre através da ação de sinais mediados por morfógenos secretados no mesencéfalo pré-cordal (Shh, sonic hedgehog) e no ectoderma não-neural (BMPs, bone morphogenetic protein) (Rubenstein e Beachy, 1998). Numa consideração simplista, Shh e BMPs, especificam, respectivamente, as regiões ventral e dorsal do prosencéfalo. Contudo, acredita-se que estas moléculas sejam os fatores primários de sinalização antagônica necessária à padronização regional prosencefálica, a qual prossegue através da ação de um vasto repertório de fatores de transcrição, em sua maioria contendo homeodomínio (Rubenstein *et al.*, 1994).

Neste paradigma, o estabelecimento de identidades moleculares distintas entre as células de córtex e estriado tem sido atribuído à expressão diferencial de genes codificadores de fatores de transcrição (Puelles *et al.*, 2000; Stoykova *et al.*, 2000; Toresson *et al.*, 2000), os quais, por sua vez, repercutem sobre a expressão de genes referentes a moléculas de adesão e de matriz extracelular (Stoykova *et al.*, 1997). Os agentes padronizadores do telencéfalo, cuja ação é bastante precoce (Stoykova *et al.*, 2000; Toresson *et al.*, 2000), determinariam a exata localização da FCE, onde existe a restrição ao acoplamento juncional inter-regional no telencéfalo em desenvolvimento descrita no presente trabalho. Então, um questionamento plausível é a interrelação entre a expressão diferencial destes genes regionalizantes e a comunicação juncional restrita no telencéfalo. De que forma a expressão gênica diferencial repercutiria sobre o padrão de acoplamento juncional entre córtex e estriado?

Uma via de ação indireta poderia constituir-se através de fatores de transcrição determinando a expressão diferencial de moléculas que interagem com as conexinas ou interferem na formação de junções comunicantes, como por exemplo as moléculas de adesão e as efrinas.

A adesão celular - mediada essencialmente por moléculas de adesão cálcio-dependentes (Matsunami e Takeichi, 1995; Götz *et al.*, 1996) repercute no acoplamento juncional, na medida em que o pareamento dos hemicanais tem como pré-requisito a aposição das membranas plasmáticas celulares (Montoro e Yuste, 2004). Vale ressaltar que há achados recentes de que a conexina 43 e a molécula de adesão N-caderina integram um complexo multiprotéico (Wei *et al.*, 2005). A presença desta conexina na membrana plasmática estaria condicionada à expressão daquela caderina e *vice-versa* (Wei *et al.*, 2005).

Há achados de que a expressão do gene *pax6* está a montante em relação à de *R-cad*, molécula de adesão cálcio-dependente (Stoykova *et al.*, 2000). O camundongo *sey/sey*, mutante para *pax6*, apresenta um desarranjo molecular consistente no telencéfalo (Stoykova *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1999; Caric *et al.*, 1997), incluindo uma diminuição na expressão de *R-cad* nas regiões de colocalização com o *pax6* (Stoykova *et al.*, 2000). A alteração exclusiva na expressão dessa proteína de adesão celular poderia ser suficiente para desequilibrar o esquema de segregação celular entre *pallium* e *subpallium*. Tal perturbação no padrão de adesão seletiva poderia, por fim, desencadear alterações no padrão de acoplamento juncional, já que estes são fortemente relacionados.

Em suma, a descaracterização dos compartimentos morfo-funcionais telencefálicos decorrente de alterações na expressão dos genes padronizadores

poderia perpassar pela segregação celular ineficiente, mas ter como agente direto a extinção da restrição ao acoplamento juncional entre as subdivisões telencefálicas.

Outro candidato a esta regulação é a família de receptores tirosina cinase e seus ligantes, Eph e efrinas, respectivamente. A sinalização proveniente da interação entre as efrinas e seus receptores Eph pode ser uni ou bidirecional, já que ambos (ligantes e receptores) contêm resíduos citoplasmáticos fosforiláveis. Apenas a sinalização bidirecional resulta num efeito de repulsão ou perda de adesão entre duas membranas adjacentes, como acontece nas fronteiras entre os rombômeros, por ocasião da segmentação rombomérica (Xu *et al.*, 1999; 2000; Mellitzer *et al.*, 1999). A sinalização unidirecional não é suficiente para gerar esta segregação, mas restringe a comunicação celular via junções comunicantes. Sugere-se que o modo unidirecional de sinalização impediria a estabilidade do contato célula-célula necessário para a formação de canais juncionais (Mellitzer *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000).

Esta hipótese é fortalecida pelos achados de Martinez e cols (1992), em que a difusão transjuncional de corantes permeantes de junções comunicantes foi diminuída nas fronteiras entre os rombômeros. A ação da sinalização Eph-efrina sobre o acoplamento juncional poderia perpassar pela adesão celular. Estes dois fenômenos poderiam ocorrer em paralelo ou a sinalização Eph-efrina regularia a adesão celular seletiva (Xu *et al.* 2000). Infelizmente, pouco se conhece sobre a expressão de efrinas e seus receptores nas camadas germinativas dos domínios cortical e subcortical do telencéfalo (Yun *et al.*, 2003; Mackarehtschian *et al.*, 1999 ).

### 5. 3. PERMEABILIDADE JUNCIONAL NA BORDA CÓRTICO-ESTRIATAL

Nosso principal achado foi a restrição precisa do acoplamento celular na região coincidente com a FCE. Vale ressaltar que não provemos uma localização da FCE através dos marcadores gênicos telencefálicos. Apenas a observação criteriosa da histoarquitetura norteou tal localização, já que na região da FCE as células da VZ cortical, cujos núcleos são revelados pela contra-coloração com DAPI, apresentam uma orientação peculiar, circundando o ângulo *caudatopallium*.

Esta abrupta restrição ao acoplamento celular (parada na difusão do corante LY) acontecia sistematicamente na região da FCE, independente da distância do corte de carregamento (veja as figuras 17, F e 19, B). Isto exclui a possibilidade de que esta restrição à difusão do corante LY, na região da FCE fosse devida a um limite da difusão inerente ao corante e a sua concentração intracelular atingida na preparação. Assim, tal restrição não seria dependente do número de células que o corante pode atravessar e ainda ser detectável à fluorescência - tamanho do sincício que este é capaz de revelar. Devido às observações experimentais neste trabalho e no trabalho anterior (Menezes *et al.*, 2000) acreditamos que com esta técnica não atingimos o limite teórico da difusão do corante, pois o encontramos difundido desde o corte de carregamento até grandes distâncias, algumas vezes da ordem de centenas de micrômetros.

Como descrito acima, os fatores que levam à formação desta barreira e sua função não estão claros.

Em um fenômeno semelhante ao descrito neste trabalho - a formação dos rombômeros - as fronteiras interromboméricas são áreas de reduzida permeabilidade juncional, em contraste com os rombômeros, onde corantes se

difundem transjuncionalmente entre as células (Martinez *et al.*, 1992). Este mesmo arranjo poderia ser vigente nas nossas regiões de interesse: córtex e corpo estriado. A restrição ao acoplamento entre eles poderia ser instalada por uma lacuna juncional, isto é, uma área não - permeante, estabelecida na região de borda. Contudo, nossos achados não sustentam esta hipótese, na medida em que demonstram a presença de acoplamento juncional na região da borda córtico-estriatal.

Observamos que as células da região de borda acoplam com as células corticais ou com as células estriatais, de acordo com o sentido de difusão do corante permeante. Se o corante se difunde no sentido estriado-córtex, as células da borda acoplam com a VZ estriatal; se o sentido é córtex-estriado, com a VZ cortical (Figs. 17 e 18). Portanto, até aqui parece tratar-se de acoplamento por reconhecimento celular seletivo.

#### **5. 4. ACOPLAMENTO JUNCIONAL E O CURSO TEMPORAL DA ATIVIDADE NEUROGÊNICA DA GLIA RADIAL NO TELENCEFALO**

Baseados nos achados de que a grande maioria das células da VZ cortical durante a neurogênese é composta por glia radial (Noctor *et al.*, 2002; Hartfuss *et al.*, 2001), e estendendo esta hipótese à VZ estriatal, podemos pressupor que as células da VZ telencefálica vistas acopladas em nossos ensaios são essencialmente células de glia radial. Em consonância com a hipótese de que o acoplamento juncional segregante observado aqui entre as duas camadas germinativas pudesse refletir células com diferentes comprometimentos funcionais ou em momentos

distintos de seu decurso de diferenciação, as células de glia radial do córtex e do estriado apresentam atividade neurogênica em diferentes janelas temporais. A maioria da glia radial do estriado tem sua atividade neurogênica finalizada por volta de E14,5, enquanto que no córtex tal atividade persiste após esta idade (Anthony *et al.*, 2004). Pode-se inferir então que as VZs de córtex e corpo estriado estariam em diferentes estágios de diferenciação, o que poderia ser correlacionado com o impedimento ao acoplamento juncional entre estas duas regiões. Possivelmente, domínios morfo-funcionais passando por diferentes etapas de desenvolvimento não compartilhariam os mesmos eventos celulares. De fato, no SNC as células acopladas parecem funcionar no intento de gerar respostas coordenadas ou sincrônicas em compartimentos celulares (Dermietzel, 1998).

A barreira ao acoplamento celular na FCE parece sofrer uma atenuação ao final do período embrionário. Embora este dado seja frágil, na medida em que realizamos apenas 1 experimento, esta atenuação coincide com outros aspectos do desenvolvimento telencefálico e pode fornecer pistas sobre os possíveis papéis da FCE no desenvolvimento desta região.

Nossos resultados foram obtidos a partir de ratos com idade entre E15/E19, ou seja, durante o período neurogênico, que se estende até E19 nos ratos (Altman e Bayer, 1990). Assim, nossos dados são relativos à maior parte da neurogênese cortical. Considerando que a distinção entre as populações neuronais do córtex e do estriado ocorra precocemente, antes ou no início do período neurogênico, acreditávamos que o padrão de acoplamento juncional sofresse modificações ao longo deste período, especialmente no período neurogênico tardio. Talvez, nesta etapa, a restrição ao acoplamento juncional no telencéfalo não mais estivesse presente, pois os dois grandes sincícios telencefálicos já estariam delineados. De

fato, a atenuação da barreira córtico-estriatal em nossos ensaios foi vista apenas neste período.

Esta atenuação está também em consonância com os achados de Anderson e cols (2001) que apontaram o aumento gradativo da presença de células de origem estriatal (DLX - positivas) nas camadas proliferativas corticais (poucas em E14,5, muitas em E16,5; no camundongo), conforme progredia a neurogênese. Além disso, Götz e cols (1996) observaram a extinção da segregação existente entre células oriundas do córtex cerebral e do corpo estriado em desenvolvimento a partir do fim do período neurogênico. Coincidentemente, a barreira ao acoplamento juncional perdura durante o tempo em que se mantém a segregação entre as células destes dois domínios neurogênicos, sugerindo sua relação direta com a compartimentalização observada.

## **5. 5. SEGREGAÇÃO CELULAR E ACOPLAMENTO JUNCIONAL RESTRITO ENTRE VZs DE CÓRTEX CEREBRAL E CORPO ESTRIADO NÃO DEPENDEM DE BARREIRA ESTRUTURAL**

Uma das hipóteses para explicar a natureza da barreira córtico-estriatal fundamenta-se na existência de elementos estruturais, isto é, histoarquitetônicos, entre *pallium* e *subpallium*, na região de borda. Os elementos elegíveis e já aventados seriam uma paliçada de glia radial (Chapouton *et al.*, 1999), que se estabelece na região entre E15/E17 e uma densa agregação de neurônios pós-mitóticos TuJ1+ detectados entre E14/E17 (Menezes e Luskin, 1994; Neyt *et al.*, 1997). Nossos ensaios estão majoritariamente concentrados nesta janela temporal, o que poderia pressupor uma contribuição destes elementos para os nossos

achados. Todavia, os resultados provenientes dos ensaios de reagregação celular descartaram o papel dos aspectos estruturais na geração da barreira córtico-estriatal, já que não houve acoplamento juncional entre células das VZs de córtex e estriado apesar da exclusão/perturbação da relação de vizinhança dos elementos histoarquitetônicos . Isto fortalece a hipótese de que a barreira entre as camadas germinativas se instalaria através da expressão diferencial de fatores de transcrição, moléculas de adesão e proteínas de matriz extracelular entre os compartimentos, fatores que presumivelmente sobreviveriam à dissociação celular.

Vale ressaltar que, nos ensaios de reagregação celular, as combinações celulares homotípicas geraram 10% e 30% de agregados puros, para córtex e GE, respectivamente. As combinações heterotípicas resultaram num aumento significativo desta taxa, mantendo-se em torno de 50%. Assim, a exemplo da restrição ao acoplamento juncional, também a segregação celular, ou a adesividade, entre as células das VZs de córtex e estriado parece ser independente de aspectos estruturais presentes na borda córtico-estriatal, sendo uma característica inerente a estas células e sustentada pela identidade molecular de suas membranas plasmáticas.

Conquanto os aspectos histoarquitetônicos da borda córtico-estriatal não sejam determinantes para os eventos de segregação celular e comunicação juncional, sua presença estratégica deve cooperar para a distinção entre as populações constituintes do *pallium* e do *subpallium*.

## **5. 6. A COMUNICAÇÃO JUNCIONAL CONTRIBUI PARA A GERAÇÃO DOS VARIADOS SUBTIPOS NEURONAIS DO TELENCEFALO?**

A exuberância de populações neuronais no telencéfalo, em termos neuroquímicos, possivelmente devida a exposições, qualitativa e quantitativamente distintas, a gradientes de morfógenos antagonistas (Marin e Rubenstein, 2001), pode ter como agente fundamental o acoplamento juncional restrito. A transdução de sinal decorrente da ação destes morfógenos pode ser intercambiada entre as células acopladas no interior das subdivisões telencefálicas, já que pelos canais juncionais transitam moléculas como AMPc, inositol trifosfato, NAD, nucleotídeos, aminoácidos, iRNAs, além de íons. Tal intercâmbio molecular poderia determinar a indução diferencial dos neurotransmissores presentes em neurônios corticais e estriatais. Segundo a literatura, células precursoras estão robustamente acopladas na VZ cortical, notavelmente no período neurogênico. Ao que parece, os neurônios gerados por elas desacoplam antes de migrar para seu destino final (LoTurco e Kriegstein, 1991; Bittman *et al.*, 1997). Isto é sugestivo de que as células acopladas, antes da mitose terminal, vivenciam um intercâmbio metabólico que poderia favorecer a definição de sua identidade molecular.

## **5. 7. ACOPLAMENTO JUNCIONAL FORA DAS CAMADAS GERMINATIVAS**

Duas cadeias de células acopladas nos cérebros de ratos E17 despertaram especial interesse, devido a sua localização: zona intermediária e fronteira córtico-estriatal.

A presença de uma faixa de células acopladas na IZ (Fig. 20), envolvendo células de glia radial e células não radiais, sugere uma contribuição da comunicação juncional para além da delimitação de territórios corticais. Talvez servindo como linha de comunicação direta entre territórios germinativos e pós-mitóticos. Por outro lado, algumas destas células, devido a seu aspecto morfológico, poderiam ser neurônios em migração tangencial cursando das eminências ganglionares para o córtex (Lavdas *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001; Marin e Rubenstein, 2001). Isto implica a possibilidade de acoplamento envolvendo células de glia radial e células migratórias, diretamente em contradição ao encontrado na literatura para a IZ do córtex dorsolateral, no contexto da migração radial (Bittman *et al.*, 1997).

Também de forma inesperada, encontramos algumas células acopladas em cadeia desde a região da fronteira córtico-estriatal até o córtex ventrolateral, apresentando morfologia migratória, com prolongamentos líderes orientados para o córtex ventrolateral. Stoykova e cols (1997) demonstraram que fascículos de glia radial delineiam um grupo de células na fronteira córtico-estriatal, sendo mais proeminentes por volta de E16,5 (no camundongo). Sendo assim, as células migratórias que vemos acopladas poderiam ter sua trajetória rumo ao córtex ventrolateral delimitada por fascículos de glia radial. Evento similar, para células derivadas da LGE, ocorre na porção anterior da SVZ pós-natal, especificamente na corrente migratória rostral, em que neurônios juvenis em trânsito encontram-se acoplados (Marins, M., 2006; Tese de Doutorado). Esta cadeia celular migratória destinada ao bulbo olfatório também se encontra em íntima relação com células gliais GFAP-positivas (Lois *et al.*, 1996) e células de glia radial (Menezes *et al.*, 1998, Alves *et al.*, 2002), que contornam grupos de neuroblastos migratórios.

Entretanto, há achados que sugerem que a paliçada de glia radial ao longo da fronteira córtico-estriatal estende-se desta para o córtex ventrolateral (Misson *et al.*, 1991; Neyt *et al.*, 1997). Desta forma, as células acopladas na região de transição córtico-estriatal poderiam ser neurônios da VZ cortical, destinados ao córtex ventrolateral e migrando sobre as fibras de glia radial, que nesta região apresentam uma disposição curva (Misson *et al.*, 1991). Independente de seus destinos e origem, com a técnica utilizada ainda não podemos afirmar se as células posicionadas na região de borda acoplarão entre si enquanto migrassem em cadeia ou estariam acopladas com as fibras de células de glia radial que lhes dessem suporte migratório.

## **5. 8. RESTRIÇÃO AO ACOPLAMENTO NO TELENCEFALO NÃO PARECE SER DECORRENTE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CONEXINAS**

Um dos possíveis catalisadores da compartimentalização seria a restrição ao acoplamento juncional pela expressão diferencial de conexinas. Nossos achados de imuno-histoquímica refutam esta hipótese, já que as conexinas 26 e 43 não tiveram expressão significativamente heterogênea na VZ telencefálica. Embora provenientes de uma análise limitada do numeroso repertório de conexinas - focamos apenas duas conexinas -, são significativos do ponto de vista qualitativo: As conexinas 26 e 43 são expressas durante o desenvolvimento cerebral (Nadarajah *et al.*, 1997), representam duas diferentes famílias de conexinas (Spray e Dermietzel, 1996; Evans e Martin, 2002) e, em cultura, não são compatíveis para a formação de canais juncionais (Tomasetto *et al.*, 1993).

Vale ressaltar que Filippov e cols (2003), discrepando frontalmente da literatura, detectaram a expressão de conexina 26 no SNC apenas nos tecidos meningeais. Não houve nenhuma marcação na zona ventricular. Eles sugerem que os anticorpos comerciais usualmente empregados para a detecção de conexina 26 têm baixa especificidade, ou seja, se ligariam a epítomos localizados em outras conexinas, principalmente conexina 30. Isto justificaria as discrepâncias, na literatura em geral, em relação à distribuição da conexina 26.

Tal hipótese não influencia a análise de nossos achados, na medida em que não houve heterogeneidade na distribuição das conexinas alvo, independente de sua natureza. Além disso, provemos um controle positivo - cortes de amostras de fígado, órgão em que a conexina 26 é tradicionalmente referida como abundante - para o funcionamento do anticorpo primário que utilizamos para sua detecção (Evans e Martin, 2002). Análises recentes do nosso laboratório (Ternes; tese de mestrado em conclusão) e de outros autores (Cina *et al.*, no prelo) indicam a expressão desta conexina no SNC nas idades aqui testadas.

Contudo, embora o repertório de conexinas expressas seja comum entre os domínios telencefálicos, fatores regulatórios poderiam ser determinantes do funcionamento diferencial dos canais juncionais de córtex e estriado já que respondem por seu estado condutor ou não-condutor. Assim, canais juncionais compostos de dado grupo de conexinas podem ser fechados no córtex, mas não no estriado, e *vice-versa*, o que estabeleceria uma heterogeneidade juncional funcional, a despeito da homogeneidade molecular.

## 6. CONCLUSÕES

A técnica de carregamento por transecção foi capaz de revelar o padrão esperado de acoplamento celular no córtex cerebral embrionário similar ao descrito na literatura para o acoplamento celular mediado por junções comunicantes.

Com esta técnica revelamos uma restrição à difusão intercelular de corante entre os compartimentos germinativos telencefálicos, as zonas ventriculares de *pallium* e *subpallium*.

Esta restrição ao acoplamento celular persistiu durante a maior parte do período neurogenético cortical, diminuindo ou desaparecendo ao final deste período.

Ensaio de reagregação celular descartaram a possibilidade desta restrição ao acoplamento celular ser devido a aspectos histoarquitetônicos locais da fronteira córtico-estriatal. Nestes ensaios a restrição ao acoplamento celular era mantida entre as células dissociadas e parecia ser diretamente proporcional à adesividade diferencial entre estes compartimentos.

Não encontramos expressão diferencial das conexinas 43 e 26 entre as zonas ventriculares de *pallium* e *subpallium* que justificasse a restrição ao acoplamento celular evidenciado pela técnica de “transection loading”.

## REFERÊNCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4<sup>a</sup> edição). New York: Garland Science.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137:433-458.
- Altman, J. e Bayer, S. (1990). Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 107:23-35.
- Alvarez-Buylla, A. e Lois, C. (1995). Neuronal Stem Cells in the Brain of Adult Vertebrates. *Stem Cells* 13:263-272.
- Alves, J., Barone, P., Engelender, S., Fróes, M. e Menezes, J. (2002). Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J. Neurobiology*, 52:251-265.
- Alves, J. (2003). *Transformação das Células de Glia Radial na Zona Subventricular Pós-Natal*. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Joao Ricardo Lacerda de Menezes.
- Anderson, S., Eisenstat, D., Shi, L. e Rubenstein, J. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson, S., Mione, M., Yun, K. e Rubenstein, J. (1999). Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of dlx genes in neocortical interneuronogenesis. *Cerebral Cortex* 9:646-654.
- Anderson, S.; Marin, O.; Horn, C.; Jennings, K.; Rubenstein, J. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
- Angevine, J. e Sidman, R. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768.
- Anthony, T., Klein, C., Fishell, G. e Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890.
- Anton, E., Cameron, R. e Rakic, P. (1996). Role of neuron-glial junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. *J. Neurosci.* 16:2283-2293.
- Berry, M. e Rogers, A. (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99:691-709.

- Bhide, P. (1996). Cell cycle kinetics in the embryonic mouse corpus striatum. *J. Comp. Neurol.* 374:506-522.
- Birgbauer, E. e Fraser, S. (1994). Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development* 120:1347–1356.
- Bittman, K., Owens, D., Kriegstein, A. e LoTurco, J. (1997). Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J. Neurosci.* 17:7037-7044.
- Bittman, K. e LoTurco, J. (1999). Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cerebral Cortex* 9:188-195.
- Boulder Committee (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat. Rec.* 166:257-262.
- Brazel, C., Romanko, M., Rothstein, R. e Levison, S. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress Neurobiology* 69:49-69.
- Brückner, K. e Klein, R. (1998). Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:375-382.
- Bruzzo, R., Hormuzdi, S., Barbe, M., Herb, A. e Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:13644–13649.
- Cai, L., Hayes, N. e Nowakowski, R. (1997). Local Homogeneity of Cell Cycle Length in Developing Mouse Cortex. *J. Neurosci.* 17:2079 –2087.
- Calegari, F. e Huttner, W. (2003). An inhibition of cyclindependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell. Sci.* 116:4947–4955.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C. e Huttner, W. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25:6533–6538.
- Campbell, K. e Götz, M., (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25:235-238.
- Caric, D., Gooday, D., Hill, R., McConnell, S. e Price, D. (1997). Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development* 124:5087-5096.
- Chang, Q., Gonzalez, M., Pinter, M. e Balice-Gordon, R. (1999). Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J. Neurosci.* 19:10813–10828.

Chang, Q., Pereda, A., Pinter, M. e Balice-Gordon, R. (2000). Nerve injury induces gap junctional coupling among axotomized adult motor neurons. *J. Neurosci.*, 20:674–684.

Chapouton, P., Gärtner, A. e Götz, M. (1999). The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development* 126:5569-5579.

Cina, C., Bechberger, J., Ozog, M. e Naus, C. Expression of Connexins in Embryonic Mouse Neocortical Development. *J. Comp. Neurol.* No prelo.

Corbin, J., Gaiano, N., Machold, R., Langston, A. e Fishell, G. (2000). The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127:5007-5020.

Correia, A. Comunicação juncional em coculturas de neurônios e astrócitos cerebelares. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. *Orientador*: Maira Monteiro Fróes.

Cusato, K.; Bosco, A.; Rozental, R., Guimarães, C., Reese, B., Linden, R., e Spray, D. (2003). Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. *J. Neurosci.* 23:6413–6422.

Dahman, C. e Basler, K. (1999). Compartment boundaries at the edge of development. *Trends Genet.* 15:320-326.

Denaxa, M., Chan, C., Schachner, M., Parnavelas, J. e Karagogeos, D. (2001). The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635-44.

Dermietzel, R. e Spray, D. (1993). Gap-junctions in the brain – where, what type, how many and why. *Trends Neurosci.* 16:186-192.

Dermietzel, R. (1996). Molecular diversity and plasticity of gap junctions in the nervous system. Em: Spray, D. e Dermietzel, R., eds. *Gap Junctions in the Nervous System*. Austin, R. G. Landes Company.

Dermietzel, R. (1998). Diversification of gap junction protein in the central nervous system and the concept of functional compartments. *Cell Biol. International* 22:719-730.

Doetsch, F. e Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14.895-14.900.

El-Fouly, M., Trosko, J. e Chang, C. (1987). Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell. Res.* 168:422-30.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R., Bulfone, A., Kowalczyk, T. e Hevner, R. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia,

intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 25:247-51.

Evans, W. e Martin, P. (2002). Gap junctions: structure and function (review). *Molec. Membrane Biology* 19:121-136.

Filippov, M., Hormuzdi, S., Fuchs, E., e Monyer, H. (2003). A reporter allele for investigatin connexin 26 gene expression in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 18:3183-3192.

Fishell, G., Mason, C. e Hatten, M. (1993). Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature* 362:636-638.

Fraser, S., Keynes, R. e Lumsden, A. (1990). Segmentation in the chick hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 344:431-435.

Fróes, M. e Menezes, J. (2002). Coupled heterocellular arrays in the brain. *Neurochemistry International* 41:367-375.

Gal, J., Morozov, Y., Ayoub, A., Chatterjee, M., Rakic, P. e Haydar, T. (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J. Neurosci.* 26:1045-1056.

Gehring, W. e Ieko, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15:371-7.

Gerfen, C. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Ann. Rev. Neurosci.* 15:285-320.

Gerhart, J. (1989). The primacy of cell interactions in development. *Trends Genet.* 5:233-6.

Götz, M., Wizenmann, A., Reinhard, S., Lumsden, A. e Price, J. (1996). Selective adhesion of cells from different telencephalic regions. *Neuron* 16:551-564.

Götz, M., Stoykova, A. e Gruss, P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21:1031-1044.

Götz, M., Hartfuss, E. e Malatesta, P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective of the correlation of morphology and lineage in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res. Bulletin* 57:777-788.

Götz, M. e Huttner, W. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews* 6:777-788.

Graham, A. (1992). Patterning the rostrocaudal axis of the hindbrain. *Sem. Neurosci.* 4:307-315.

Guthrie, S., Butcher, M. e Lumsden, A. (1991). Patterns of cell division and interkinetic nuclear migration in the chick embryo hindbrain. *J. Neurobiol.* 22:742–754.

Guthrie, S., Prince, V. e Lumsden, A. (1993). Selective dispersal of avian rhombomere cells in orthotopic and heterotopic grafts. *Development* 118:527-538.

Hamasaki, T., Goto, S, Nishikawa, S. e Ushio, Y. (2001). A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J. Neurosci.* 21:4272-4280.

Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. e Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229:15-30.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. e Huttner, W. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:3196–3201.

His, W. (1874). *Unsere körperform und das physiologische problem innerer entstehung*, Engleman.

His, W. (1904). *Die entwicklung des menschlichen gehirns während der ersten monate*. Leipzig: Hirzel.

Illes, P. e Ribeiro, J. (2004). Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Curr. Top. Med. Chem.* 4:831-8.

Inoue, T., Chisaka, O., Matsunami, H. e Takeichi, M. (1997). Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and neural crest subpopulations in mouse embryo. *Dev. Biol.* 183:183-194.

Inoue, T., Nakamura, S. e Osumi, N. (2000). Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev. Biol.* 219:373-383.

Inoue, T., Tanaka, T, Takeichi, M., Nakamura, S. e Osumi, N. (2001). Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development. *Development* 128:561-9.

Irving, C., Flenniken, A., Alldus, G. e Wilkinson, D. (1996). Cell-cell interactions and segmentation in the developing vertebrate hindbrain. *Biochem. Soc. Symp.* 62:85-95.

Jhaveri S., Erzurumlu R. e Crossin K. (1991). Barrel construction in the rodent neocortex: role of thalamic afferents versus extracellular matrix molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:4489-4493.

Johnston, J., Gerfen, C., Haber, S., Van der Kooy, D. (1990). Mechanisms of striatal pattern formation: conservation of mammalian compartmentalization. *Dev. Brain Res.* 57:93-102.

Kawaguchi Y, Wilson C., Augood S., Emson P. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological, and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18:527–535.

Kessler, D. e Melton, D. (1994). Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning. *Science.* 266:596-604.

Krieg, W. (1946). Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. B. Structure of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 84:277-324.

Lavdas, A., Grigoriou, M., Pachnis, V. e Parnavelas, J. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19:7881-7888.

Lawrence, P. (1992). *The Making of a Fly.* London: Blackwell.

Lois, C. e Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2074-2077.

Lois, C. e Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.

Lois, C., Garcia-Verdugo, J. e Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.

LoTurco, J. e Kriegstein, A. (1991). Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science* 252:563-566.

Lumsden, A. e Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337:424-428.

Lumsden, A. (1990). The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci.* 13:329-335.

Lumsden, A. e Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1114.

Luskin, M. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.

Mackarehtschian, K., Lau, C., Caras, I. e McConnell, S. (1999). Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cerebral Cortex* 9:601-10.

- McCarthy, M., Turnbull, D., Walsh, C. e Fishell, G. (2001). Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J. Neurosci.* 21:6772-6781.
- McGinnis, W. e Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68:283-302.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. e Gotz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.
- Malatesta, P., Hack, M., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. e Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
- Marin, O., Anderson, S. e Rubenstein, J. (2000). Origin and Molecular Specification of Striatal Interneurons. *J. Neurosci.* 20:6063-6076.
- Marin, O. e Rubenstein, J. (2001). A long remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:780-790.
- Marín-Padilla, M. (1971). Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex of the cat. A Golgi study. *Z. Anat. Entwickl-Gesch* 134:117-145.
- Marín-Padilla, M. (1978). Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat. Embryol.* 152:109-126.
- Marins, M. O acoplamento juncional e a migração celular na zona subventricular pós-natal. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Joao Ricardo Lacerda de Menezes.
- Marshall, C., Suzuki, S. e Goldman, J. (2003). Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia* 43:52-61.
- Martinez, S., Geijo, E., Sanches-Vivez, M., Puelles, L. e Gallego, R. (1992). Reduced junctional permeability at interrombhomeric boundaries. *Development* 116:1069-1076.
- Matsunami, H. e Takeichi, M. (1995). Fetal brain subdivisions defined by R- and E-cadherin expressions: evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* 172:466-478.
- Meller, K., Krah, K. e Theiss, C. (2005). Dye coupling in Purkinje cells of organotypic slice cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 160:101-5.
- Mellitzer, G., Xu, Q. e Wilkinson, D. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400:77-81.

Menezes, J. e Luskin, M. (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J. Neurosci.* 14:5399-5416.

Menezes, J., Dias, F., Garson, A. e Lent, R. (1998). Restricted distribution of S-phase cells in the anterior subventricular zone of the postnatal mouse forebrain. *Anat. Embryol.* 198:205-11.

Menezes, J., Froes, M., Moura Neto, V. e Lent, R. (2000). Gap junction-mediated coupling in the postnatal anterior subventricular zone. *Developmental Neuroscience*, 22:34-43.

Mercier, F., Hatton, G. (2001). Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: Roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *J. Comp. Neurol.* 431:88-104.

Merkle, F., Tramontin, A., García-Verdugo, J. e Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17528-32.

Métin, C., Godement, P. (1996). The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J. Neurosci.* 16:3219-35.

Misson, J., Edwards, M., Yamamoto, M. e Caviness Jr, V. (1988). Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Brain Research* 466:183-190.

Misson, J., Austin C., Takahashi, T., Cepko, C., Caviness Jr, V. (1991). The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cerebral Cortex* 1:221-229.

Miyama, S., Takahashi, T., Goto, T., Bhide, P. e Caviness Jr, V. (2001). Continuity with ganglionic eminence modulates interkinetic nuclear migration in the neocortical pseudostratified ventricular epithelium. *Exp. Neurology* 169: 486-495.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. e Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. e Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131:3133–3145.

Montoro, R. e Yuste, R. (2004). Gap junctions in developing neocortex: a review. *Brain Res. Reviews* 47:216-226.

Nadarajah, B., Jones, A., Evans, W. e Parnavelas, J. (1997). Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J. Neurosci.* 17:3096-3111.

Nadarajah, B., Brunstrom, J., Grutzendler, J. Wong, R. e Pearlman, A. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature* 4:143-150.

Nery S, Fishell G. e Corbin J. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* 5, 1279 –1287.

Neyt, C., Welch, M., Langston, A., Kohtz, J. e Fishell, G. (1997). A short-range signal restricts cell movement between telencephalic proliferative zones. *J. Neurosci.* 17: 9194-9203.

Nieto, M., Monuki, E., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S., Cunningham, J., Gotz, M. e Walsh, C. (2004). Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 479:168-80.

Noctor, S., Flint, A., Weissman, T., Dammerman, R. e Kriegstein, A. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.

Noctor, S., Flint, A., Weissman, T., Wong, W., Clinton, B. e Kriegstein, A. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* 22:3161-3173.

Noctor, S., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. e Kriegstein, A. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7:136–144.

O'Rourke, N., Dailey, M., Smith, S., McConnell, S. (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258:299-302.

O'Rourke, N. Sullivan, D., Kazowaki, C., Jacobs, A., McConnell, S. (1995). Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 121:2165-2176.

Owens, D. e Kriegstein, A. (1998). Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J. Neurosci.* 18:5374-5388.

Pakhotin, P. e Verkhratsky, A. (2005). Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol. Cell. Neurosci.* 28:79 – 84.

Pakhotin, P. e Verkhratsky, A. (2005). Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol. Cell. Neurosci.* 28:79-84.

Parnavelas, J. (1989). The central visual pathways. Em: *Handbook of Chemical neuroanatomy* (vol.7) Integrated systems of the CNS (part2) 1-164, Elsevier.

- Parnavelas, J., Barfield, J., Franke, E. e Luskin, M. (1991). Separate progenitors cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cerebral Cortex* 1:463-468.
- Parnavelas, J. (2000). The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.* 23:126-131.
- Peinado, A., Yuste, R. e Katz, L. (1993). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10:103–114.
- Pencea, V., Bingaman, K., Freedman, L. e Luskin, M. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp. Neurol.* 172:1-16.
- Pencea, V. e Luskin, M. (2003). Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *J. Comp. Neurol.* 463:402-18.
- Puelles, L. e Rubenstein, J. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggests a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16:472-479.
- Puelles, L., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S. e Rubenstein, J. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx2*, *Emx1*, *Nkx2.1*, *Pax6* e *Tbr1*. *J. Comp. Neurol.* 424:409-438.
- Puelles, L. e Rubenstein, J. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26:469-76.
- Rácz, E., Bácskai, T., Halasi, G., Kovács, E. e Matesz, C. (2006). Organization of dye-coupled cerebellar granule cells labeled from afferent vestibular and dorsal root fibers in the frog *Rana esculenta*. *J. Comp. Neurol.* 496:382-94.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145:61-84.
- Rakic, P. (1978). Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad. Med. J.* 54:25-40.
- Rakic, P. (1988) Specification of cortical areas, *Science* 241:170-176.
- Rakic, P., Cameron, R. e Komuro, H. (1994). Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr. Opin. Neurol.* 4:63-69.
- Rakic, P. (2003). Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43:19-32.
- Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres* (vol.2), Maloine.

Ramón y Cajal, S. (1952). Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. Reprint (Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Edition). Paris: A.Maloine.

Redies, C. e Takeichi, M. (1996). Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. Dev. Biol. 180:413-423.

Reyher, C., Lübke, J., Larsen, W., Hendrix, G., Shipley, M., Baumgarten, H. (1991). Olfactory bulb granule cell aggregates: morphological evidence for interperikaryal electrotonic coupling via gap junctions. J. Neurosci. 11:1485-95.

Rubenstein, J., Martinez, S., Shimamura, K. e Puellas, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. Science 266:578-580.

Rubenstein, J. e Beachy, P. (1998). Patterning of the embryonic forebrain. Curr. Opin. Neurobiol. 8:18-26.

Sauer, F. (1935). Mitosis in the neural tube. J. Comp. Neurol. 62:377-420.

Sauer, F. (1937). Some factors in the morphogenesis of vertebrate embryonic epithelia. J. Morphol. 61:563-579.

Sauer, M. e Chittenden, A. (1959). Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo: evidence for intermitotic migration of nuclei. Exp. Cell Res. 16:1-6.

Schaper, A. (1897). The earliest differentiation in the central nervous system of vertebrates. Science 5:430-431.

Silva, M. Carbocianinas como possiveis traçadores do acoplamento celular mediado por junções comunicantes. 2003. Dissertação (Mestrado em Programa de Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador*: Joao Ricardo Lacerda de Menezes.

Smart, I. e Sturrock, R. (1979). Ontogeny of the neostriatum. Em: *The neostriatum* 127-146. New York: Pergamon.

Smart I. e McSherry, G. (1982). Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. J. Anat. 134:415-442.

Smart, I. (1985). Differential growth of the cell production systems in the lateral wall of the developing mouse telencephalon. J. Anat. 141:219-229.

Smart, I., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M. e Kennedy, H. (2002). Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cerebral Cortex* 12:37–53.

Söhl, G., Maxeiner, S. e Willecke, K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nature Reviews Neuroscience* 6:191-200.

Spassky, N., Merkle, F., Flames, N., Tramontin, A., García-Verdugo, J. e Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *J. Neurosci.* 25:10-18.

Spray, D. e Dermietzel, R. (1996). Gap junctions in the nervous system: an introduction. Em: Spray, D. e Dermietzel, R., eds. *Gap Junctions in the Nervous System*. Austin, R. G. Landes Company.

Steindler D., Settles D., Erickson H., Laywell E., Yoshiki A., Faissner A. e Kusakabe M. (1995). Tenascin Knockout Mice: Barrels, Boundary Molecules, and Glial Scars. *J. Neurosci.* 15:1971-1983.

Stenman, J., Toresson, H. e Campbell, K. (2003). Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J. Neurosci.* 23:167-74.

Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C., e Gruss, P. (1996). Forebrain patterning defects in small eye mutant mice. *Development* 122:3453-3465.

Stoykova, A., Götz, M., Gruss, P. e Price, J. (1997). Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development* 124:3765-3777.

Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. e Gruss, P. (2000). Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J. Neurosci.* 20:8042-8050.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. e Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-8.

Tabata, H. e Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 23:9996-10001.

Takahashi T., Nowakowski R., Caviness Jr, V. (1992). BrdU as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J. Neurocytol.* 21:185-197.

Takahashi, T., Nowakowski, R. e Caviness, V. (1995a). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* 15:6046–6057.

Takahashi, T., Nowakowisk, R. e Caviness Jr., V. (1995b). Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* 15:6058-6068.

Tan, S., Kalloniatis, M., Sturm, K., Tam, P., Reese, B. e Faulkner-Jones, B. (1998). Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21:295–304.

Tarabykin V., Stoykova A., Usman N. e Gruss P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression. *Development* 128:1983-1993.

Ternes, G. Perfil de expressão de conexinas no telencéfalo de embriões de rato. Início: 2004. Dissertação (Mestrado em Pós-Graduação em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientadora: Maira Monteiro Fróes.

Tomasetto, C., Neveu, M., Daley, J., Horan, P. e Sager, R. (1993). Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell. Biol.* 122:157-67.

Toresson, H., Potter, S. e Campbell, K. (2000). Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for *Pax6* and *Gsh2*. *Development* 127:4361-4371.

Tramontin, A., García-Verdugo, J., Lim, D. e Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cerebral Cortex* 13:580-7.

Van der Kooy, D. e Fishell G. (1987). Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res.*401:155-161.

Vaney, D. (1999). Neuronal coupling in the central nervous system: lessons from the retina. *Novartis Found Symp.* 219:113-25

Vincent, J. e Gerhart, J. (1987). Subcortical rotation in *Xenopus* eggs: an early step in embryonic axis specification. *Dev. Biol.* 123:526-39.

Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. e Surprenant, A. (1999a). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J. Physiol.* 519: 335–346.

Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F., North, R. e Surprenant, A. (1999b). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 2:315–322.

Vogt, A., Hormuzdi, S. e Monyer, H. (2005). Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Molecular Brain Research* 141:113 – 120.

Warren, N., Caric, D., Pratt, T., Clausen, J., Asavaritikrai, P., Mason, J., Hill, R. e Price, D. (1999). The transcription factor Pax6 is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 9:627-635.

Wei, C., Francis, R., Xu, X. e Lo, C. (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J. Biol. Chemistry* 280:19925–19936.

Weissman, T., Riquelme, P., Ivic, L., Flint, A. e Kriegstein, A. (2004). Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron*, 43:647–66.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J., Herrera, D. e Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2:461-466.

Wichterle, H., Turnbull, D., Nery, S., Fishell, G. e Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.

Willaime-Morawek, S., Seaberg, R., Batista, C., Labbé, E., Attisano, L., Gorski, J., Jones, K., Kam, A., Morshead, K. e Van der Kooy, D. (2006). Embryonic cortical neural stem cells migrate ventrally and persist as postnatal striatal stem cells. *J. Cell Biology* 175:159-168.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. e Söhl, G. (2002). Structural and Functional Diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383:725-737.

Wizenmann, A. e Lumsden, A. (1997). Segregation of rombohomer by differential chemoaffinity. *Mol. Cell. Neurosci.* 9:448-459.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. e Meyerowitz, E. (1998). *Principles of Development* London: Current Biology.

Wonders, C. e Anderson, S. (2005). Cortical interneurons and their origins. *The Neuroscientist* 11:199-205.

Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V. e Wilkinson, D. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399:267-271.

Xu, Q., Mellitzer, G. e Wilkinson, D. (2000). Roles of Eph receptors and ephrins in segmental patterning. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 355:993-1002.

- Xu Q., Cobos I., De La Cruz E., Rubenstein J. e Anderson S. (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci.* 24:2612–2622.
- Yozu, M., Tabata, H. e Nakajima, K. (2005). The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J. Neurosci.* 25: 7268 –7277.
- Yun, M., Johnson, R., Antic, A. e Donoghue, M. (2003). EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J. Comp. Neurol.* 456:203-16.
- Yuste, R., Peinado, A. e Katz, L. (1992). Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257:665–669.
- Yuste, R., Nelson, D., Rubin, W. e Katz, L. (1995). Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* 14:7–17.
- Zimmer, C., Tiveron M., Bodmer, R. e Cremer, H. (2004). Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cerebral Cortex* 14:1408–1420.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)