

MARÍLIA KIMIE SHIMABUKURO

**INTERAÇÃO ENTRE PRECURSORES NEURAIS
ADULTOS E MATRIZES ÁCIDAS E NEUTRAS DE
LAMININA**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Rio de Janeiro
2007**

MARÍLIA KIMIE SHIMABUKURO

**INTERAÇÃO ENTRE PRECURSORES NEURAIS
ADULTOS E MATRIZES ÁCIDAS E NEUTRAS DE
LAMININA**

Orientadora: Claudia Maria de Castro Batista

Co-orientadora: Tatiana Lobo Coelho-Sampaio

**Rio de Janeiro
2007**

SHIMABUKURO, Marília Kimie.

INTERAÇÃO ENTRE PRECURSORES NEURAIIS ADULTOS E MATRIZES ÁCIDAS E BÁSICAS DE LAMININA / MARÍLIA KIMIE SHIMABUKURO. RIO DE JANEIRO, 2007.

xi, 89 f

Orientadora: Claudia Maria de Castro Batista

Co-orientadora: Tatiana Lobo Coelho-Sampaio

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

1. Células-tronco neurais. 2. Laminina. 3. Zona Subventricular.

I. Batista, Claudia Maria. II. Coelho-Sampaio, Tatiana. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Título.

Marília Kimie Shimabukuro

INTERAÇÃO ENTRE PRECURSORES NEURAIS ADULTOS E MATRIZES ÁCIDAS E NEUTRAS DE LAMININA

Tese de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas (Biologia celular), 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 (Biologia celular).

Esta tese foi desenvolvida no laboratório de Biologia da matriz extracelular, sob a orientação da Professora Claudia Maria de Castro Batista e co-orientação da Professora Tatiana Lobo Coelho-Sampaio e contou com o apoio financeiro das seguintes entidades: CAPES, CNPq/PRONEX, FUJB e e HDSA (Huntington's

Disease Society of America).

Rio de Janeiro

2007

RESUMO

SHIMABUKURO, Marília Kimie. INTERAÇÃO ENTRE PRECURSORES NEURAIIS ADULTOS E MATRIZES ÁCIDAS E NEUTRAS DE LAMININA. Rio de Janeiro, 2007. Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

O principal nicho neurogênico persistente no sistema nervoso central adulto é a zona subventricular. Precursores neurais provenientes desta região migram por uma grande distância até o bulbo olfatório, onde se diferenciam terminalmente em neurônios. A via migratória que une a zona subventricular ao bulbo olfatório, conhecida como via migratória rostral, é uma região restrita no cérebro adulto permissiva à migração e diferenciação de precursores neurais. Evidências recentes obtidas a partir de dados *in vitro* e *in vivo* indicam que a glicoproteína laminina exerça um papel importante na migração, proliferação e diferenciação de precursores neurais. Dados obtidos em nosso laboratório descreveram a polimerização da laminina em soluções acidificadas (pH 4). Tal processo leva à formação de uma matriz com estrutura supramolecular distinta de matrizes de laminina formadas em soluções neutras (pH 7). *In vitro*, foi verificado que matrizes ácidas de laminina induzem a migração celular a partir de explantes de córtex de animais neonatos enquanto matrizes ácidas de laminina induzem um aumento proliferativo nestas mesmas células. Com base nesses resultados nas evidências de que a laminina possa ser um componente importante no processo neurogênico adulto buscamos analisar o efeito de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre os precursores neurais adultos derivados da zona subventricular. Para isso, expandimos precursores neurais adultos sob a forma de neurosféricas e verificamos o efeito de matrizes ácidas e básicas sobre a migração, proliferação e diferenciação destas células. Nos diversos ensaios empregados com precursores neurais adultos verificamos que matrizes neutras de laminina induzem a migração destas células enquanto matrizes ácidas estimulam sua proliferação. Quanto à diferenciação, não parece haver diferenças na geração de astrócitos e neurônios sobre os dois tipos de matrizes de laminina, mas verificamos um maior número de células nestina-positivas sobre matrizes ácidas. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que matrizes ácidas e neutras de laminina induzem diferentes tipos de respostas celulares sobre a de precursores neurais adultos.

ABSTRACT

SHIMABUKURO, Marília Kimie. INTERACTIONS BETWEEN ADULT NEURAL PRECURSOR CELLS AND ACIDIC AND NEUTRAL LAMININ MATRICES. Rio de Janeiro, 2007. Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

The subventricular zone constitutes the major neurogenic niche in the adult central nervous system. Neural precursors from this region migrate for a long distance into the olfactory bulb, where they generate new neurons. The migratory pathway that connects the subventricular zone and the olfactory bulb is known as rostral migratory stream, and it is a restricted site in the adult brain that is permissive to both the migration and differentiation of neural precursors. Recent evidences indicate that the laminin glycoprotein has an important role in the migration, proliferation and differentiation of neural precursor cells. Previous data from our group described the laminin polymerization in acidified solutions (pH 4). Such polymerization process leads to the generation of laminin matrices with a distinct supramolecular structure when compared to laminin matrices formed in neutral solution (pH 7). *In vitro* assays with these matrices showed that acidic laminin induce cell migration from neonatal cortex explants while neutral matrices induce cell proliferation. Concerning these data and the possibility that laminin could be an important component of the neurogenic process, we sought to investigate the effect of both acidic and neutral laminin matrices on adult neural precursors derived from the subventricular zone. For this reason, adult neural precursors were expanded as neurospheres and we analyzed the effect of acidic and neutral laminin matrices on the migration, proliferation and differentiation of these cells. On the different assays we performed, we could notice that neutral laminin matrices induce adult neural precursors migration while laminin acidic matrices stimulate their proliferation. Regarding cell differentiation assays, we detected no differences in the generation of neurons and astrocytes on the different substrates but a higher number of nestin-positive cells on acidic matrices. Our data suggest that acidic and neutral laminin matrices induce different cellular responses in adult neural precursors.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
• Animais.....	30
• Cultura de Neurosfers.....	30
• Preparação de Matrizes de Laminina.....	32
• Ensaio de Migração de Neurosfers.....	33
• Ensaio de Migração a partir de Explantes de SVZ.....	33
• Ensaio de Formação de Neurosfers.....	34
• Ensaio de Diferenciação Celular.....	34
• Cinética de Incorporação de BrdU <i>in vitro</i>.....	35
• Processamento histológico.....	35
• Imunohistoquímica e Imunocitoquímica.....	36
• Imunocitoquímica para BrdU.....	37
• Aquisição de Imagens.....	38
• Análises Estatísticas.....	38

RESULTADOS.....	39
• A expressão de laminina na RMS.....	39
• A Influência de matrizes de laminina ácidas e neutras sobre a migração de precursores neurais em neurosfemas e explantes de SVZ.....	41
• Efeito de matrizes de laminina ácida ou neutra sobre a proliferação de progenitores neurais adultos.....	48
• Efeito de matrizes de laminina ácida ou neutra sobre a proliferação de células-tronco neurais adultas.....	50
• Efeito de matrizes de laminina ácida ou neutra sobre a diferenciação de precursores neurais adultos.....	57
DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

Introdução

Em 1965, foram obtidos os primeiros dados indicativos da ocorrência de neurogênese no sistema nervoso central de mamíferos adultos (ALTMAN & DAS, 1965; ALTMAN, 1962, 1969). Entretanto, a existência de tal fenômeno foi confirmada somente no início da década de 90.

A capacidade de proliferação *in vitro* de células derivadas do cérebro adulto foi descrita pela primeira vez em 1992 (REYNOLDS & WEISS, 1992). Esta propriedade foi, inicialmente, observada em culturas mistas de células derivadas da região do corpo estriado de camundongos adultos. Além de um potencial proliferativo, a capacidade de diferenciação destas mesmas células em neurônios e astrócitos também foi observada, o que levou à sugestão de que células-tronco neurais seriam persistentes no cérebro adulto.

A localização mais precisa da população de precursores neurais do cérebro adulto *in vivo* foi investigada com base em relatos prévios que apontavam para a existência de atividade mitótica na região subventricular (SVZ do inglês Subventricular Zone, Figura 1) do cérebro durante o período pós-natal. (SMART, 1961; PRIVAT & LEBLOND, 1972; BLAKEMORE & JOLLY, 1972; MCDERMOTT & LANTOS, 1991) (Figura 1). Com base neste indício, foi confirmado que células obtidas de explantes da SVZ apresentavam células com propriedades neurogênicas semelhantes às observadas anteriormente em precursores neurais *in vitro* (LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1993).

Uma das primeiras investigações a respeito do mecanismo neurogênico supostamente associado à SVZ *in vivo* revelou a existência de uma altíssima taxa de morte celular pós-mitótica entre precursores neurais da SVZ

(MORSHEAD & VAN DER KOOY, 1992). Isso levou à hipótese de que o ambiente do cérebro adulto restringiria aqueles potenciais de proliferação e diferenciação intrínsecos das células-tronco, observados *in vitro* em culturas de precursores neurais (MORSHEAD & VAN DER KOOY, 1992; LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1993).

Posteriormente, a utilização da técnica de traçamento celular com o gene repórter LacZ *in vivo*, permitiu acompanhar o comportamento de precursores neurais na SVZ. Observou-se que algumas células da SVZ apresentam um padrão migratório bem definido espacialmente, direcionado ao Bulbo Olfatório (OB, do inglês Olfactory Bulb), onde as células migratórias da SVZ dão origem a interneurônios das camadas granular e glomerular (LUSKIN, 1993).

Com base nesses resultados, pôde-se verificar que, de fato, precursores neurais apresentam uma função neurogênica bem definida no cérebro adulto. Assim, o conjunto de dados referentes à presença de precursores neurais com potenciais de diferenciação e proliferação no cérebro adulto e o seu envolvimento em um processo neurogênico levou à queda definitiva do dogma ,até então existente, de que a neurogênese em mamíferos se restringia temporalmente desde o período embrionário até poucos dias após o nascimento (GROSS, 2000; NOTTEBOHM, 2002; TAUPIN, 2006).

A SVZ compreende poucas camadas de células localizadas entre o epêndima que reveste a luz dos ventrículos laterais, e o corpo estriado. Sua citoarquitetura foi caracterizada através de microscopia eletrônica, imunohistoquímica e ensaios de incorporação de timidina triciada, que em

combinação revelaram a coexistência de 3 populações celulares distintas com atividade mitótica nessa região (MORSHEAD & VAN DER KOOY, 1992; DOETSCH *et al.*, 1997) (Figura 1):

- **Células “B”**: com características astrocíticas, imunorreativas para a proteína fibrilar glial (GFAP, do inglês Glial Fibrillary Acidic Protein) (DOETSCH *et al.*, 1997).

- **Células “C”**: Também conhecidas como células amplificadoras em trânsito. São imunorreativas para o fator de transcrição Dlx2 e não expressam GFAP ou a molécula de adesão neural polisialilada (PSA-NCAM, do inglês Polysialylated Acid - Neural Cell Adhesion Molecule) (DOETSCH *et al.*, 1997; DOETSCH *et al.*, 2002).

- **Células “A”**: correspondentes aos neuroblastos em migração que expressam PSA-NCAM, Dlx-2 e Tuj1 (Beta-tubulina III) (LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1993; DOETSCH *et al.*, 1997).

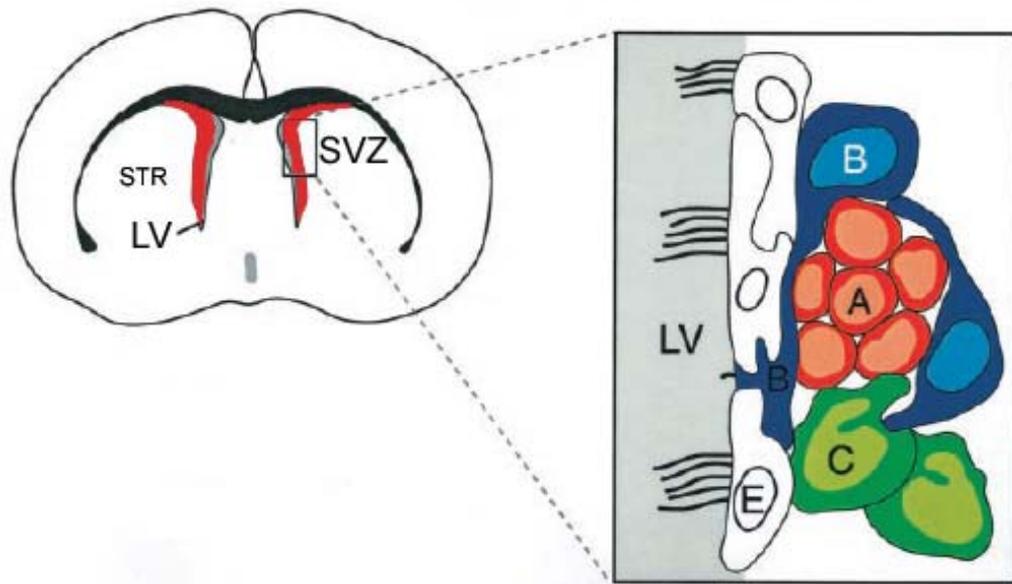


Figura 1: Localização da SVZ (em vermelho à esquerda), dos ventrículos laterais e do corpo estriado no cérebro murino adulto. No detalhe (à direita), a organização das populações celulares da SVZ no cérebro murino adulto: células “B” em azul; células “C” em verde e células “A” em vermelho. Abreviações: Str - Estriado, LV - Ventrículo lateral, E - Epêndima, SVZ – Zona subventricular (Adaptado de ALVAREZ-BUYLLA & GARCÍA- VERDUGO, 2002).

Dada a presença de uma população heterogênea de células proliferativas na SVZ, a identidade da população correspondente à de células-tronco neurais não foi elucidada de imediato. Esta só foi revelada posteriormente através da estratégia de administração do anti-mitótico Beta-D-arabinofuranoside *in vivo*. A administração do anti-mitótico por longos períodos revelou que, após a eliminação das células proliferantes da SVZ, as células “B” que, aparentemente, não eram eliminadas neste período, eram capazes de recolonizar a SVZ, dando origem novamente às células “C” e “A”. A capacidade de recolonização da SVZ por células da subpopulação “B” demonstrou, que dentre as células proliferantes

da SVZ, o subtipo celular com características astrocitárias (células “B”), corresponde às células-tronco neurais, persistentes no sistema nervoso central adulto (DOETSCH *et al.*, 1999).

As células-tronco neurais são, claramente, diferenciadas das demais células proliferantes da SVZ quanto ao seu ciclo celular. Enquanto ensaios de incorporação de 5-Bromo 2-deoxi Uridina (BrdU) revelaram que as células “A” e “C” têm um ciclo de aproximadamente 12h (MORSHEAD & VAN DER KOOY, 1992), as células-tronco neurais aparentam ser quiescentes. Em ensaios de eliminação seletiva das células “A” e “C”, com altas doses de timidina triada, verificou-se que células com ciclo celular mais lento promoviam a recolonização da Zona Subventricular. Assim, foi proposto que as células-tronco neurais realizariam divisões ocasionalmente de forma a manter a homeostase celular da SVZ (MORSHEAD *et al.*, 1994).

Tais dados revelaram a relação entre as células-tronco neurais e as células de ciclos mais curtos da SVZ no processo neurogênico pós-natal (Figura 2): os astrócitos da SVZ, quiescentes, dividem-se dando origem às células C, também denominadas “amplificadoras intermediárias”, que se dividem mais rapidamente e por sua vez, dão origem às células A, que migram até o bulbo olfatório onde se diferenciam terminalmente em neurônios (MORSHEAD & VAN DER KOOY, 1992; MORSHEAD *et al.*, 1994 DOETSCH *et al.*, 1999) (Figura 2). Complementarmente, estudos posteriores identificaram *in vivo* a presença de células-tronco neurais na SVZ de primatas (KORNACK & RAKIC, 2001), incluindo humanos (Edson *et al.*, 1998; SANAL *et al.*, 2004).

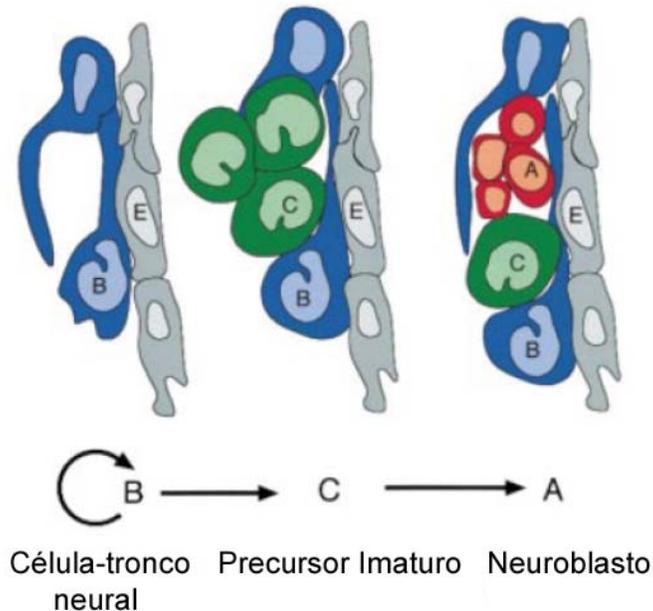


Figura 2: A relação entre as diferentes populações celulares da SVZ no processo neurogênico pós-natal. As células-tronco neurais “B” possuem um ciclo celular lento (em azul) e dividem-se dando origem a progenitores imaturos “C” (em verde) que por sua vez geram neuroblastos “A” (em vermelho). (Adaptado de DOETSCH & ALVAREZ-BUYLLA, 1999)

Além da SVZ, a Zona Subgranular do Giro Denteado Hipocampal é considerada um sítio neurogênico secundário no cérebro adulto (CAMERON *et al*, 1993; PALMER *et al*, 1997; DOETSCH, 2003; LIM & ALVAREZ-BUYLLA, 2004). Entretanto, a verdadeira identidade dos precursores neurais hipocampais é controversa, dadas as evidências que apontam limitações de proliferação e de diferenciação destas células. Partindo-se da comparação *in vitro* entre precursores neurais derivados da SVZ e do hipocampo foi observado que os precursores hipocampais exibem uma baixa taxa proliferativa, não podem ser mantidos em cultura por mais de três passagens, e não são multipotentes (SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; BULL & BARTLETT, 2005). Ao contrário,

os precursores da SVZ podem ser mantidos em cultura, preservando seu potencial de diferenciação por um grande número de passagens (REYNOLDS & WEISS, 1992; POTTEN & LOEFFLER, 1990 SEABERG & VAN DER KOOY, 2003; BULL & BARTLETT, 2005). Assim, especula-se que o hipocampo não contenha células-tronco estrito senso. Ao invés disto acredita-se que o hipocampo albergue somente progenitores mais diferenciados, comprometidos com uma das linhagens neurais, o que levanta a possibilidade de que as verdadeiras células-tronco que dão origem a novos neurônios neste local residam fora do hipocampo (SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; BULL & BARTLETT, 2005).

Os precursores neurais da SVZ são responsivos aos fatores EGF (do inglês Epidermal Growth Factor) e bFGF (do inglês Basic Fibroblast Growth Factor). *In vitro*, estes fatores levam à formação de esferóides celulares em suspensão, denominados neurosféricas (REYNOLDS & WEISS, 1992; RAY *et al.*, 1995) (Figura 3).

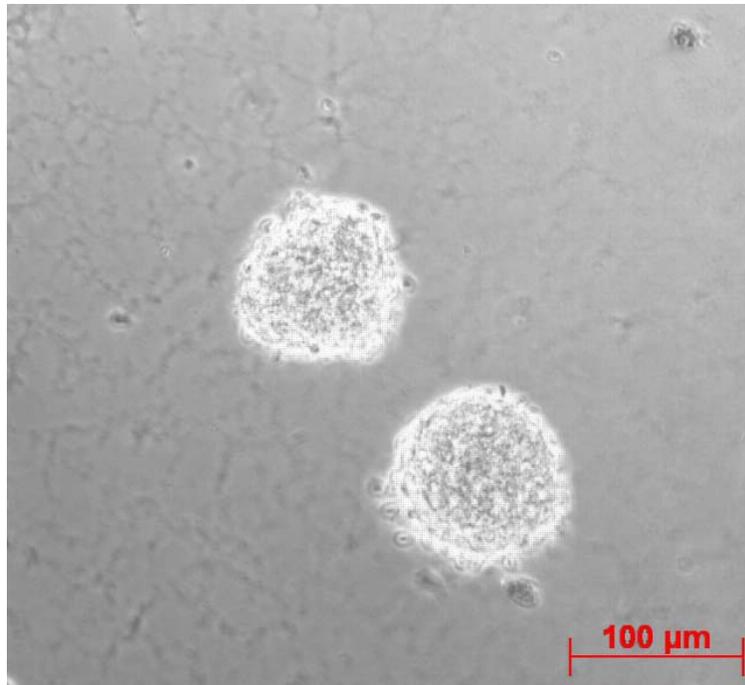


Figura 3: Aspecto geral de neurosféricas em cultura. Precusores neurais adultos após 7 dias de cultivo em meio contendo EGF e FGF formam neurosféricas em suspensão. Fotomicrografia obtida por microscopia ótica de campo claro.

Através do plaqueamento de precusores neurais sob baixa densidade, verificou-se que cada neurosfera possui origem clonal a partir de uma única célula (REYNOLDS *et al.*, 1992). Assume-se que cada célula capaz de gerar uma neurosfera seja uma célula-tronco neural (MORSHEAD *et al.*, 1994; MORSHEAD *et al.*, 1998). Utilizando esse modelo de cultura, foi possível a identificação das propriedades cardeais de uma célula-tronco *in vitro*: a capacidade de auto-renovação, proliferação e o potencial de diferenciação em mais de um tipo de linhagem celular (Figura 4) (POTTEN & LOEFFLER, 2000).

Quanto à capacidade de diferenciação, as células contidas em uma única neurosfera, podem dar origem às principais linhagens celulares do tecido neural. Neurônios, astrócitos e oligodendrócitos são simultaneamente obtidos, o que

caracteriza as células-tronco neurais como multipotentes (REYNOLDS & WEISS, 1992). Adicionalmente foi verificado que cada neurosfera contém uma pequena fração de células com capacidade prolongada de auto-renovação, que levam à formação de novas neurosferas clonais após sua dissociação e passagem em cultura, o que demonstra a propriedade de auto-renovação das células-tronco neurais, a cada divisão. O restante das células seria de progenitores, caracterizados por seu potencial limitado de auto-renovação e comprometimento com a diferenciação em uma das linhagens neurais (SEABERG & VAN DER KOOY, 2003).

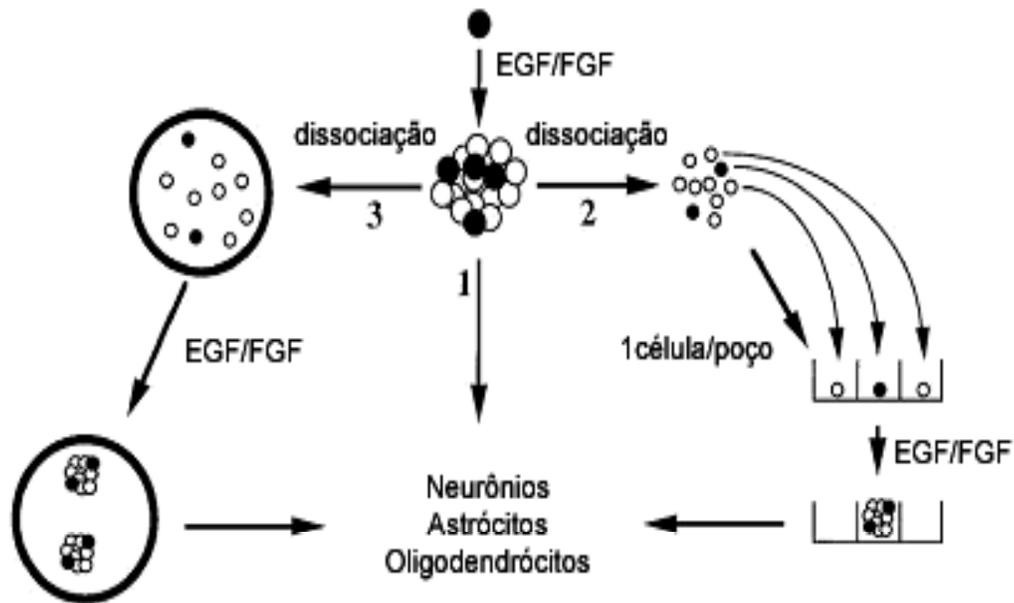


Figura 4: Esquema representativo dos ensaios que demonstram as propriedades de células-tronco neurais *in vitro*. Diferentes ensaios permitem identificar a capacidade de diferenciação e auto-renovação em neuroesferas derivadas da SVZ.

Em “1”, na ausência dos fatores de crescimento EGF e FGF, neuroesferas derivadas da SVZ geram simultaneamente neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Em “2” após a dissociação de neuroesferas e o seu replaqueadas na presença de EGF e FGF em diluição de 1 célula por poço revelam que novas neuroesferas só são geradas a partir de poços contendo células-tronco neurais. Em “3” células de neuroesferas dissociadas, replaqueadas na presença de EGF e FGF em densidade clonal, são capazes de formar novas neuroesferas que são iniciadas clonalmente por cada célula-tronco (Adaptado de REYNOLDS & WEISS, 1992).

A citoarquitetura de uma neuroesfera é caracteristicamente heterogênea, sendo os progenitores neurais predominantes em termos quantitativos. Uma única neuroesfera é composta de células-tronco e progenitores neurais em diferentes graus de diferenciação, incluindo neurônios e astrócitos imaturos (SUSLOV *et al.*, 2002, SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; BULL &

BARTLETT, 2005). Sob o ponto de vista espacial, há dados que indicam que células progenitoras em estágios mais avançados de diferenciação localizam-se predominantemente nas áreas periféricas de uma neurosfera, enquanto seu núcleo seria mais indiferenciado (REYNOLDS *et al.*, 1992; SVENDSEN *et al.*, 1998). Mais recentemente, dados moleculares deram suporte a essa hipótese através da verificação de que genes característicos de progenitores mais diferenciados, como PAX6, MAP2 e HuEMAP, são expressos nas camadas mais externas das neurosféricas. Assim, demonstrou-se que tais estruturas são espacialmente organizadas, sendo o grau de diferenciação celular crescente do centro para a periferia (SUSLOV *et al.*, 2002).

A partir desses dados, pode-se dizer que a estrutura tridimensional de uma neurosfera resguarda uma composição heterogênea, apresentando uma certa homologia com um microsistema de desenvolvimento do sistema nervoso central. Constitui-se, portanto, uma ferramenta para a compreensão de mecanismos de diferenciação e de interações celulares no nicho da SVZ *in vivo*.

Os progenitores neuronais produzidos na SVZ têm como destino final a integração no OB. Em especial, os roedores contêm uma grande população de interneurônios envolvidos no aprendizado associado ao olfato que são continuamente produzidos durante todo o período pós-natal a partir dos neuroblastos provenientes da SVZ (KEVERNE, 1995; ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 1997). O OB e a SVZ encontram-se afastados por cerca de 5 mm no cérebro murino adulto. Tal distância é percorrida pelos neuroblastos através da via migratória rostral (RMS, do inglês, Rostral Migratory Stream), considerada uma

extensão especializada da porção anterior da SVZ (LUSKIN, 1993) (Figura 5). Cadeias de neuroblastos PSA-NCAM positivos migram tangencialmente a partir da SVZ e percorrem a RMS até atingir o OB onde os neuroblastos adotam um padrão de migração radial, integrando-se às camadas granular e periglomerular (LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1993; DOETSCH & ALVAREZ-BUYLLA, 1996).

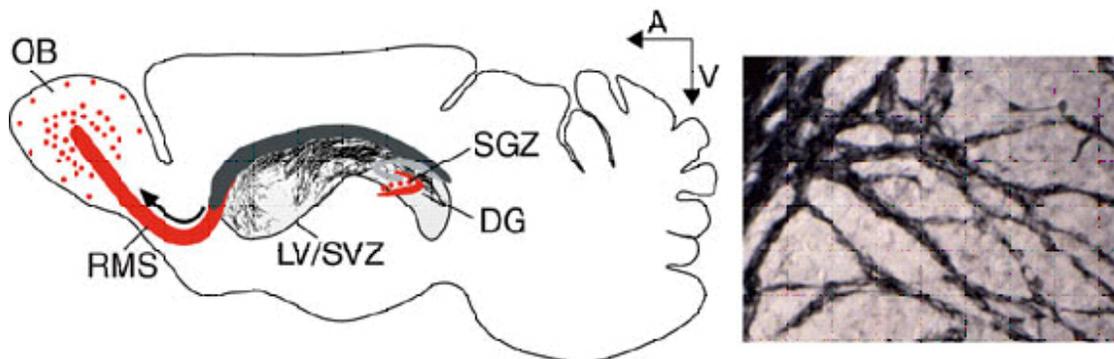


Figura 5: A via migratória rostral (RMS).

Ilustração de um corte sagital do cérebro de roedores adultos indicando a localização da via RMS. À esquerda em vermelho, é representado o direcionamento de cadeias de neuroblastos desde a SVZ nos ventrículos laterais até o OB. Uma vez que cheguem a esta região os neuroblastos migram de forma radial (representada pelos pontos vermelhos no OB).

À esquerda, visualiza-se uma imagem obtida a partir da técnica de imunohistoquímica mostrando feixes de neuroblastos PSA-NCAM positivos na SVZ. Abreviações: DG- Giro Denteado, SGZ- Zona Subgranular (DOETSCH & SCHARFF, 2001).

A organização celular da RMS é diferente da SVZ, sendo que os tipos celulares predominantes nesta região são os neuroblastos migrantes e os astrócitos.

A distribuição celular na RMS revela que feixes de neuroblastos encontram-se intimamente associados a astrócitos, que formam uma estrutura tubular ao redor de cada cadeia de neuroblastos. Desta forma, durante a

migração através de RMS, neurônios imaturos estabelecem contatos através de junções especializadas, o que levou à sugestão de que interações homofílicas sejam essenciais para a migração (ALVAREZ-BUYLLA, 1997).

De fato, foi demonstrado que a expressão de PSA, um homopolímero composto por resíduos de ácido N-acetil Neuramínico que se liga ao NCAM na superfície celular, promove a redução de interações de adesão celulares criando condições permissivas para modificações de organização tecidual (RUTISHAUSER *et al.*, 1985; EL MAAROUF *et al.*, 2006; CONCHONAUD *et al.*, 2007). Além disso, um modelo animal nocaute para NCAM apresentou migração deficiente através da RMS, resultando em uma atrofia do OB (TOMASIEWICZ *et al.*, 1993). Adicionalmente, resultados similares foram obtidos em animais tratados com Endoneuraminidase N, que promove a clivagem específica de resíduos de PSA (ONO *et al.*, 1994), o que confirma seu papel crítico para a manutenção das populações celulares do OB. O papel efetivo dos astrócitos para a migração na RMS ainda é motivo de dúvida. Porém, especulou-se que eles possam constituir uma barreira física de isolamento do parênquima cerebral, e/ou favorecer a sobrevivência, maturação e migração dos neuroblastos. Isto ocorreria através da liberação de fatores, visto que a interação entre astrócitos e precursores da SVZ, *in vitro*, parece favorecer a neurogênese (ALVAREZ-BUYLLA, 1997; LIM & ALVAREZ-BUYLLA, 1999). Ao mesmo tempo, há dados que indicam que os astrócitos da RMS não são necessários para a migração tangencial das cadeias de neuroblastos, pois este tipo de migração também ocorre durante a primeira semana pós-natal, quando os astrócitos ainda não

podem ser encontrados na RMS (LAW *et al.*, 1999). Neste período, os precursores neuronais parecem migrar através de uma região ampla de espaço extracelular (KISHI *et al.*, 1990). Desta forma é possível que a matriz extracelular presente na região da RMS até a primeira semana pós-natal seja mais permissiva à migração de neuroblastos e diferente da matriz encontrada na mesma região na fase adulta.

Um possível efeito quimiotáxico do OB sobre neuroblastos também foi sugerido e investigado, porém os resultados existentes na literatura são controversos. Dados sobre o efeito da bulbectomia sobre a RMS revelaram, que a migração de neuroblastos não sofre alterações, e o volume celular da RMS tem um aumento significativamente após este procedimento (KIRSCHENBAUM *et al.*, 1999). Os mesmos resultados foram ainda obtidos em um modelo de interrupção da RMS (JANKOVSKI, 1998), mas experimentos mais recentes, *in vitro*, demonstram que explantes de OB possuem um evidente efeito quimioatraente sobre células migrantes a partir de explantes de SVZ (LIU & RAO, 2003).

Até o momento, pouco se sabe a respeito dos mecanismos extrínsecos e intrínsecos que modulam a migração no eixo SVZ-OB, ao longo do período pós-natal. Além do papel do PSA nas interações homofílicas, citado anteriormente, sabe-se que o fluxo do fluido cérebro-espinhal nos ventrículos laterais exerce um papel importante na orientação dos feixes de neuroblastos ao longo da RMS (SAWAMOTO *et al.*, 2006). Os poucos dados existentes a respeito dos tipos de sinalização celular envolvidos na regulação da RMS demonstraram que a

ephrina e seus ligantes transmembranares, envolvidos em uma via de sinalização bidirecional, são expressos por precursores neurais no eixo SVZ-OB. Além disso, a infusão de formas truncadas de EphB2 e de Efrina-B2 é capaz de diminuir o número de feixes de neuroblastos migrantes além de afetar sua distribuição (CONOVER *et al.*, 2000). O fator BDNF e o seu receptor TrkB são expressos *in vivo* ao longo de toda a via migratória, o que sugere que o BDNF possa também mediar sinais migratórios. A proteína doublecortina mantém o formato bipolar e a translocação nuclear durante a migração no telencéfalo adulto.

Fenômenos migratórios são regulados por um balanço entre a atração e a repulsão celular. Para esta segunda situação, há um papel conhecido para as proteínas solúveis Slit, expressas pela porção caudal do septo (HU & RUTISHAUSER, 1996) e ao longo da RMS. O efeito seria de quimiorrepulsão, que poderia atuar na orientação de feixes de neuroblastos nesta região (NGUYEN-BA-CHARVET *et al.*, 2004). Curiosamente, a reelina, outro fator solúvel, migração tangencial da RMS e o padrão radial adquirido normalmente no OB. Em parece estar envolvida, especificamente, na transição entre o padrão de modelos nocaute para esta molécula, verifica-se um acúmulo de neuroblastos, que leva à formação de agrupamentos destas células no OB (HACK *et al.*, 2002).

A expressão diferencial de diversos tipos de integrinas foi verificada na RMS ao longo do desenvolvimento. Neste sentido, enquanto animais neonatos expressam as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\beta 8$ de integrinas, animais adultos passam a expressar as subunidades αv , $\beta 6$ e $\beta 3$. O bloqueio de integrinas na

RMS através de diferentes combinações de anticorpos em culturas organotípicas demonstrou que a velocidade de migração de precursores neuronais na RMS é reduzida em até 80% (MURASE & HORWITZ, 2002). Potenciais ligantes para estas Integrinas são componentes da matriz extracelular como a tenascina C e a laminina (MURASE & HORWITZ, 2002). Enquanto camundongos nocaute para a tenascina C, altamente expressa na RMS, não parecem apresentar alterações fenotípicas claras (SAGA *et al.*, 1992) a laminina presente ao longo da RMS é um efetivo substrato para migração de precursores neurais e neurônios (MURASE & HORWITZ, 2002; LIANG & CRUTCHER, 1992; KEARNS *et al.*, 2003).

Dados recentes mostraram que as subunidades $\beta 1$ e $\beta 5$ da integrina são expressas em neuroblastos da RMS. Enquanto a subunidade $\beta 5$ parece ser dispensável para este evento migratório, a não expressão da subunidade $\beta 1$ leva à desorganização das cadeias de neuroblastos e atrofia do OB (BELVINDRAH *et al.*, 2007). A heterodimerização da subunidade $\beta 1$ com as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$, também expressas nos neuroblastos da RMS leva a formação de receptores de laminina (HYNES, 2002; BELVINDRAH *et al.*, 2007). Complementarmente, os neuroblastos da RMS expressam laminina, cuja expressão parece ser crítica tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para a formação das cadeias migratórias destas células. (BELVINDRAH *et al.* 2007).

A laminina é uma glicoproteína que se apresenta como a principal componente da membrana basal e presente em quase todos os órgãos. Cada molécula de laminina-1 isolada a partir do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)

tem cerca de 800kDa, mas pode alcançar até perto de 1000kDa devido a variações entre as diferentes isoformas. A laminina é composta por 3 subunidades: α , β e γ que em combinação dão origem a pelo menos 15 tipos de heterotrímeros (COLOGNATO & YURCHENCO, 1992; COLOGNATO & YURCHENCO, 2000; MINER & YURCHENCO, 2004). Estruturalmente a isoforma canônica é caracterizada pela presença de 3 braços curtos, sendo um deles ligeiramente maior, além de 1 braço longo (ENGEL et al. 1981) (Figura 6). Dentre as subunidades da laminina, a cadeia α forma o braço longo e o maior braço curto enquanto as demais subunidades, β e γ , compõem cada um dos braços curtos. Outras características estruturais da laminina incluem a presença de um grande domínio globular na porção C-terminal do braço longo além de três domínios globulares alternados na extremidade de sua porção N-terminal. As cadeias β e γ , por sua vez possuem domínios globulares em suas porções N-terminais (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000).

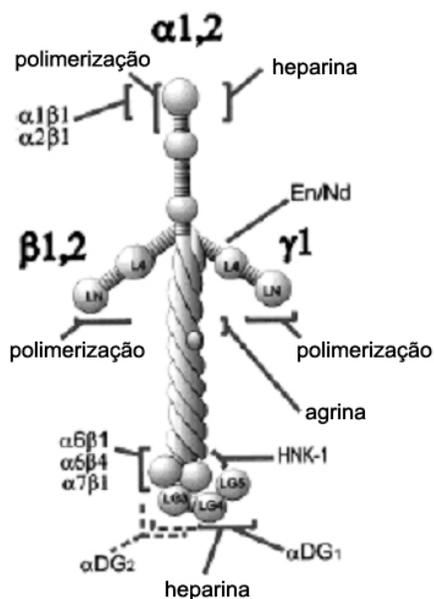


Figura 6: A estrutura terciária básica da laminina, equivalente à encontrada nas lamininas dos tipos 1 ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$); 2 ($\alpha 2$ $\beta 1$, $\gamma 1$); 3 ($\alpha 1$ $\beta 2$, $\gamma 1$) e 4 ($\alpha 2$ $\beta 2$, $\gamma 1$). Em detalhe, indicações de alguns de seus ligantes conhecidos para seus diferentes domínios (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000).

A laminina é expressa desde o estágio de duas células em embriões de camundongo. Posteriormente, esta molécula está presente na membrana basal de todos os tecidos sendo requerida em eventos importantes da organogênese como na migração celular na crista neural, na diferenciação do epiblasto, no direcionamento do cone de crescimento axonal e posteriormente na maturação das células ganglionares (DZIADEK & TIMPL, 1985; CHALAZONITIS *et al.*, 1997; DESBAND & DUBAND, 1997; BONNER & CONNOR, 2001; LI & YURCHENCO, 2006). Evidências genéticas demonstraram que pelo menos 9 tipos de subunidades da laminina são essenciais ao longo do desenvolvimento (SCHÉELE *et al.*, 2007). No período pós-natal, as principais doenças associadas à deficiência de expressão de cadeias da laminina são a

epidermólise bolhosa, onde a ausência das cadeias $\alpha 3$, $\beta 3$ ou $\gamma 3$ foi reportada (MITSUHASHI & HASHIMOTO, 2003; UITTO & RICHARD, 2004) e a distrofia muscular congênita, que é associada a uma deficiência da expressão da cadeia $\alpha 2$ na membrana basal do sistema neuromuscular (YUASA et al., 2004). Por outro lado, a super-expressão ou clivagem de cadeias específicas de laminina vêm sendo associada à progressão tumoral. Em geral a malignidade de um tumor está ligada à presença de falhas estruturais na membrana basal (PATARROYO *et al.*, 2002).

No cérebro adulto, as regiões com maior expressão de laminina são os vasos, o plexo coróide e a membrana basal da pia-máter ao redor do cérebro (MINER & YURCHENCO, 2004). Especificamente, na RMS, há expressão das cadeias $\alpha 5$ e $\gamma 1$ de laminina entre a terceira semana embrionária até a primeira semana pós natal. Neste período outras subunidades da laminina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\gamma 2$) não foram detectadas (MURASE & HORWITZ, 2002). Em contraste com este resultado, dados mais recentes identificaram a expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ na RMS e foi demonstrado que modelos animais com deleções das cadeias $\alpha 2$ e $\alpha 4$ da laminina apresentavam alterações significativas na migração até o OB (BELVINDRAH *et al.*, 2007).

A laminina, além de seu efeito adesivo, é capaz de modular a proliferação, migração e diferenciação celular, através de alterações de expressão gênica, levando a modificações no padrão de organização das células (TIMPL & BROWN, 1994; KLEINMAN *et al.*, 1993; MINER & YURCHENCO, 2004).

Observa-se uma expressão diferencial de isoformas da laminina ao longo do tempo. A cadeia $\alpha 1$, que possui ampla expressão durante o desenvolvimento, é praticamente ausente em tecidos adultos (MINER *et al.*, 1997; NISSINEN *et al.*, 1991; SALMIVIRTA *et al.*, 1997; SCHUGER *et al.*, 1997; SOROKIN *et al.*, 1997). A expressão diferencial de laminina ao longo do tempo foi também detectada na membrana basal de vasos, que são componentes importantes do nicho de células-tronco da SVZ (PALMER *et al.*, 1997; DOETSCH, 2003; SHEN *et al.*, 2004). Na membrana basal de vasos, a subunidade $\alpha 4$ é constitutivamente expressa desde as fases iniciais do desenvolvimento, e a subunidade $\alpha 5$ só passa a ser expressa em capilares e vasos de menor calibre no período pós-natal (HALLMANN *et al.*, 2005).

A estrutura geral da membrana basal é formada por duas redes de laminina e colágeno IV, organizadas de forma independente de outros componentes da membrana basal (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990). A descrição da polimerização da laminina, *in vitro*, foi realizada em 1985 por YURCHENCO e colaboradores. Segundo este método, as condições necessárias para a obtenção destas matrizes de laminina, *in vitro*, foram divididas em 2 etapas: uma primeira fase dependente de temperatura, na qual oligômeros protéicos eram formados seguida de uma segunda fase dependente de Ca^{++} , onde a sua adição promovia a formação de grandes agregados. Além disso, a polimerização da laminina seria dependente de sua concentração, sendo necessárias concentrações mínimas de 60 nM (YURCHENCO *et al.*, 1985). Análises da arquitetura molecular da laminina permitiram verificar que a

sua polimerização leva à formação de uma estrutura tridimensional em forma de malha, com aspecto geométrico (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990).

Posteriormente, foi identificada a capacidade de polimerização da laminina em membranas bilipídicas (ENGEL & KALB, 1991). Neste modelo bicamadas lipídicas de diferentes composições foram utilizadas, o que permitiu a observação de uma maior eficiência de polimerização da laminina sobre lipídeos ácidos, mais precisamente sobre sulfatídeos. Este resultado foi correlacionado com dados demonstrando que a heparina favorece a polimerização da laminina em solução (YURCHENCO *et al.*, 1990), levando à sugestão de que a presença de superfícies negativamente carregadas ou a simples densidade de cargas negativas em carboidratos poderia mediar a polimerização em condições fisiológicas (ENGEL & KALB, 1991).

Um primeiro modelo para o mecanismo de polimerização da laminina foi proposto, em 1993, a partir da descoberta de que a junção dos braços curtos desta molécula era capaz de levar à formação de polímeros (YURCHENCO & CHENG, 1993). Assim, uma unidade do complexo de polimerização seria formada por três moléculas de laminina interligadas através de seus braços curtos. enquanto o braço longo ficaria livre para realizar interações com células (Figura 7). Dados que apóiam esta hipótese foram recentemente obtidos, através da observação de que moléculas de laminina recombinantes sem o domínio α do braço longo não são capazes de se polimerizar sobre células de Schwann (MCKEE *et al.*, 2007).

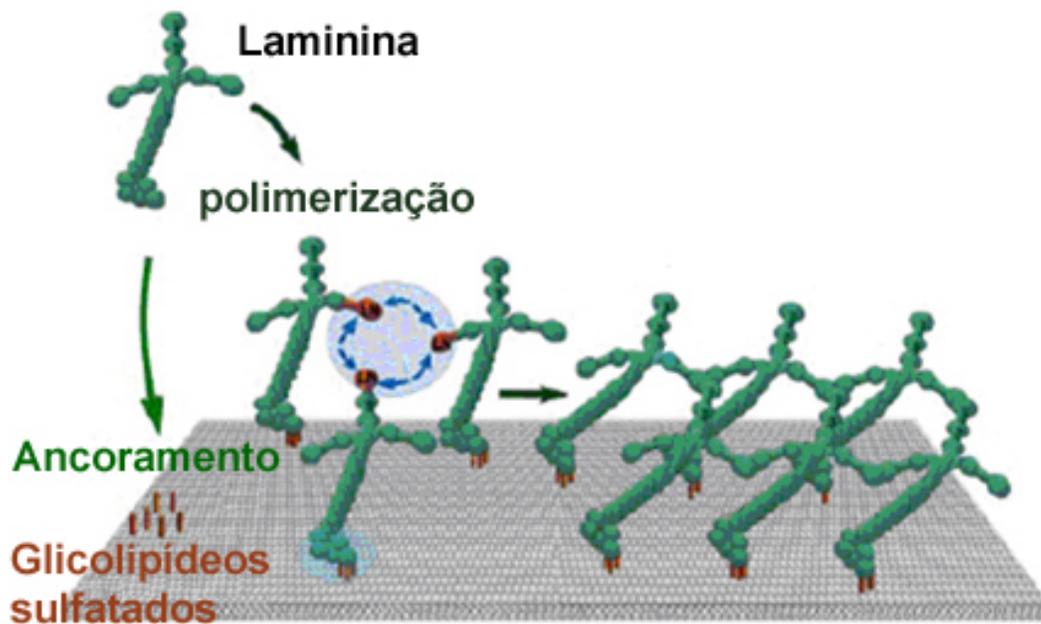


Figura 7: Modelo de polimerização da laminina *in vivo*. Interações entre os braços curtos de 3 moléculas de laminina formam a unidade básica do polímero enquanto o braço longo estaria envolvido em um processo de ancoramento a superfície celular (adaptado de MCKEE *et al.*, 2007).

Com base na hipótese de que a simples densidade de cargas negativas em uma superfície poderia induzir a polimerização da laminina, verificou-se que o aumento da proporção de fosfolipídeos ácidos em vesículas lipídicas era também capaz de induzir a polimerização da laminina e este efeito poderia ser reproduzido, simplesmente, através da sua diluição em uma solução acidificada (FREIRE & COELHO-SAMPAIO, 2000). Neste modelo, verificou-se também que baixas concentrações de laminina (6 nM) são suficientes para sua polimerização (FREIRE & COELHO-SAMPAIO, 2000).

A estrutura supramolecular da laminina polimerizada *in vitro*, em soluções acidificadas possui um padrão geométrico característico em forma de “colméia”. Além disso, e reconstruções tridimensionais destas matrizes através de microscopia confocal revelaram ainda que seu “relevo” é plano (Figura 8, C e D) (FREIRE *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2007). Comparativamente, matrizes de laminina neutra possuem uma estrutura desorganizada e reconstruções laterais deste tipo de matriz artificial revelam a existência de uma estrutura irregular tridimensional (Figura 8, A e B) (FREIRE *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2007).

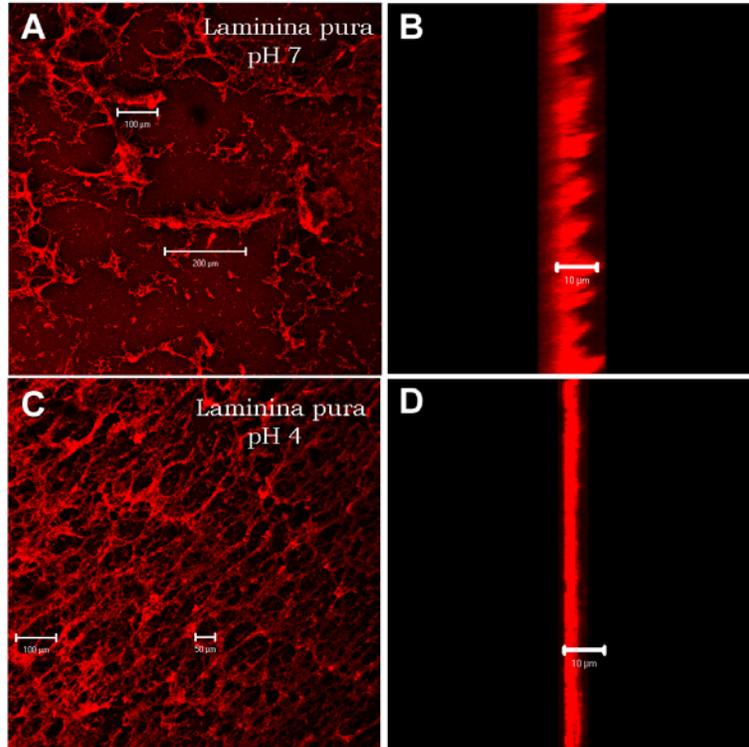


Figura 8: A polimerização da laminina *in vitro*.

Os polímeros de laminina em matrizes neutras (A e B) e ácidas (C e D) artificiais apresentam estruturas supramoleculares distintas. Em soluções neutras (pH 7) há a formação de agregados desorganizados (A) de laminina que formam uma superfície irregular, conforme observado em reconstrução lateral da matriz (B).

Enquanto isso, em solução ácida (pH 4), obtém-se uma matriz de organização mais uniforme em forma de “colméia” (C) cuja superfície aparenta ser plana em reconstrução lateral (D). Barras de calibração: 100 e 200 μm (A), 50 e 100 μm (C), 10 μm (B e D) (BARROSO *et al.*, 2007).

Matrizes de laminina com estruturas similares aos 2 tipos de matriz obtidas artificialmente *in vitro* foram observadas na retina e sobre culturas de astrócitos em diferentes estágios do desenvolvimento (FREIRE *et al.*, 2002; FREIRE *et al.*, 2004). Na retina imatura, depósitos de laminina encontrados na sua região central assemelham-se as matrizes artificiais de laminina neutra, enquanto matrizes de laminina com uma estrutura poligonal e uniforme

semelhantes às matrizes ácidas obtidas *in vitro* são observadas em sua região periférica (FREIRE *et al.*, 2002).

A maturação da retina progride do seu centro em direção a periferia. Sendo assim, especula-se que as diferentes organizações da laminina nestas mesmas regiões possam ter algum papel de regulação deste processo *in vivo* (RAPAPORT & STONE, 1984; FREIRE *et al.*, 2002).

Posteriormente, foi demonstrado que astrócitos de animais embrionários, E16 e pós-natais, P2 são capazes de produzir matrizes de laminina com estruturas distintas (FREIRE *et al.*, 2004). Astrócitos embrionários apresentam um maior grau de acidez em sua superfície devido a maior quantidade de resíduos de ácido siálico em sua membrana e são capazes de produzir matrizes similares as obtidas *in vitro* em soluções ácidas. A retirada dos resíduos de ácido siálico da superfície de astrócitos embrionários confirmou sua importância para a polimerização da laminina, pois após o tratamento destas células, com neuraminidase, a laminina produzida passa a apresentar morfologia similar a encontrada em animais recém-nascidos (FREIRE *et al.*, 2004).

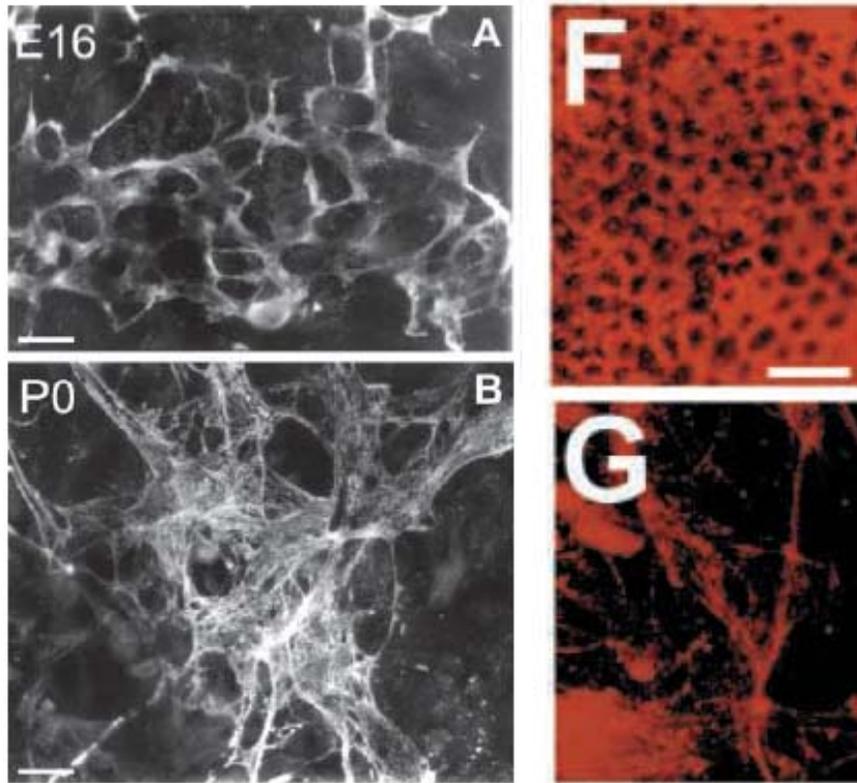


Figura 9: A polimerização da laminina *in vivo*.

Os polímeros de laminina em matrizes ácidas e matrizes neutras artificiais apresentam semelhanças com depósitos de laminina encontrados em regiões distintas da retina (F e G) e com a matriz sobre astrócitos embrionários E16 e pós-natais P2 (A e B). No centro da retina imatura e em astrócitos de animais P2 há a formação de agregados desorganizados de laminina (G). Por outro lado, a periferia a retina e astrócitos de animais E16 exibem uma matriz de organização mais uniforme com o padrão característico de “colméia” (A e F) (FREIRE *et al.*, 2004). Modificado de FREIRE *et al.*, 2002 e FREIRE *et al.*, 2004.

Esses modelos de formação de matrizes de laminina *in vitro* permitiram verificar que sua forma polimerizada em solução ácida ou sobre astrócitos embrionários é capaz de induzir a maturação neuronal, promovendo uma acentuada neuritogênese (FREIRE *et al.*, 2002; FREIRE *et al.*, 2004) e induzir a

migração neuronal a partir de explantes do córtex de animais recém nascidos (P2) (FREIRE *et al.*, 2002). Enquanto isso, matrizes de laminina neutra promoveriam a proliferação de neurônios embrionários (FREIRE *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

Os mecanismos que regulam a migração, proliferação e diferenciação de precursores neurais ao longo da RMS ainda são pouco conhecidos. Há indícios recentes que apontam para a existência de um papel importante da laminina na migração de células precursoras neurais pela RMS (BELVINDRAH *et al.*, 2007). Acredita-se que variações da organização supramolecular da laminina possam modular o comportamento celular (RAPAPORT & STONE, 1984; FREIRE *et al.*, 2002; FREIRE *et al.*, 2004). Corroborando com esta hipótese, resultados prévios obtidos em nosso laboratório demonstraram que matrizes ácidas de laminina promovem a formação de neuritos em neurônios embrionários e a migração de neurônios corticais P2. Por outro lado, matrizes neutras de laminina promoveriam a proliferação de neurônios embrionários (FREIRE *et al.*, 2002). Baseado em tais dados, no presente trabalho, pretendemos investigar os possíveis efeitos regulatórios promovidos por matrizes ácidas de laminina polimerizada ou de laminina neutra sobre a migração, proliferação e diferenciação de precursores neurais adultos *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão de laminina na RMS.
- Avaliar o efeito de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre a migração de precursores neurais em explantes de SVZ e neurosféricas;
- Avaliar o efeito de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre a proliferação de células-tronco e precursores neurais;
- Avaliar o efeito de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre a diferenciação de precursores neurais.

METODOLOGIA

- Animais

Camundongos da linhagem C57/Bl6 (n=28) com 1 mês de idade foram utilizados em todos os experimentos, tendo sido adquiridas através do biotério do Instituto de Bioquímica.

- Cultura de Neurosféricas

Para a cultura de precursores neurais adultos, o subepêndima do ventrículo lateral de animais C57/Bl6 com 4 semanas de idade (n=20) é dissecado (MORSHEAD *et al.*, 1998) e submetido à digestão enzimática (1,33 mg/ml de tripsina; 9,67 mg/ml de hialuronidase e 0,2 mg/ml de ácido kinurênico) por 30 minutos a 37°C sob agitação constante. Em seguida a inibição da atividade enzimática foi realizada pela adição de EBSS (do inglês, Earle's Balanced Salt Solution) contendo 4% de albumina bovina sérica (EBSS-BSA 4%) e o tecido é dissociado mecanicamente com pipetas Pasteur com pontas polidas a fogo até a obtenção de uma suspensão celular. Esta suspensão é filtrada através de uma malha de 70 µm de abertura para a eliminação de possíveis porções de tecido não dissociadas além de debris celular sendo então centrifugada por 5 minutos a 300g. O sobrenadante é descartado e o "pellet celular" resultante da centrifugação foi ressuscitado em 10 ml de EBSS contendo sacarose 0,9 M e assim submetido a centrifugação por 10 minutos a 400 rpm. O sobrenadante foi então descartado e o centrifugado celular

ressuspendido em 2 ml de EBSS-BSA 4%. Em um novo tubo falcon foram colocados 12ml de EBSS-BSA 4%. Sobre esta solução, os 2 ml de suspensão celular foram cuidadosamente depositados, de forma a não misturar as duas frações. A solução foi centrifugada por 7 minutos a 300g e o sobrenadante descartado para que o centrifugado fosse ressuspendido em 1ml de meio DMEM-F12 (Invitrogen) sem soro suplementado com B27 (Invitrogen) 10 ng/ml de EGF (Sigma), 20 ng/ml de FGF (Sigma) e Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen) 1 µl/ml. A densidade e viabilidade celular foram determinadas através da contagem e exclusão de células coradas com Azul de Tripán. As células foram cultivadas em uma densidade clonal, que variou entre 10 e 50 células/µl, em garrafas de 25 cm² ou placas não aderentes durante 7 dias, tempo necessário para a formação de neurosféricas.

Para a passagem das culturas, neurosféricas em suspensão de 7 dias foram coletadas, centrifugadas por 5 minutos a 300g e dissociadas com tripsina 0,125% (Invitrogen) por 7 minutos a 37°C. A inibição enzimática foi realizada com a adição de EBSS-BSA 4% e após esta etapa as células foram ressuspendidas e centrifugadas em PBS por 2 vezes antes da contagem celular e novo plaqueamento sob densidade clonal. Todos os ensaios realizados neste trabalho utilizaram neurosféricas de segunda passagem.

- Preparação de Matrizes de laminina

Matrizes de laminina são preparadas de acordo com o método descrito originalmente por Freire *et al.* em 2002. A laminina-1 murina isolada a partir do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (Sigma) é utilizada em uma concentração final de 50 µg/ml para todos ensaios. Sua diluição é realizada imediatamente antes do uso em tampão Acetato de Sódio 20 mM, CaCl₂ 1 mM com pH 4 (matrizes ácidas) ou em tampão Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM com pH 7 (matrizes neutras).

Imediatamente após a diluição as soluções de laminina (50 µg/ml) são aplicadas sobre lamínulas redondas de 26 mm de diâmetro, que são então incubadas a 37°C overnight para que ocorra a deposição da laminina. Posteriormente, as lamínulas são lavadas com PBS pH 7 por 3 vezes antes de servirem como substrato celular.

Como controle experimental utilizamos o extrato de membrana basal derivado do tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm, matrigel (BD Biosciences), que possui diversos componentes da matriz extracelular. Para os controles, o matrigel foi diluído 25 vezes em DMEM/F12, aplicado sobre lamínulas e incubado por 30 minutos a 37°C. Após isto as lamínulas contendo Matrigel foram lavadas com PBS pH 7 por 3 vezes para o posterior plaqueamento celular.

- Ensaio de Migração em Neurosféricas

Para analisar a migração celular de precursores neurais puros, neurosféricas secundárias de aproximadamente 100 µm de diâmetro foram selecionadas e depositadas individualmente sobre matrizes de laminina em placas de 24 poços. Neste ensaio foi utilizado o meio de cultivo DMEM/F12 sem soro suplementado com B27 e sem a adição de fatores de crescimento (n=3 para cada condição em 3 experimentos independentes).

Logo após o plaqueamento, foi realizada a captura de imagens de cada neurosfera para a determinação da medida de seus raios iniciais. Após 24h sobre os substratos, realizou-se uma nova captura de imagens e obteve-se a distância total de migração, que foi calculada através da diferença entre o raio final (24h) e o raio inicial da cada neurosfera. Para a quantificação da migração neste ensaio, foram tomadas medidas a cada 45° da circunferência da neurosfera.

- Ensaio de Migração a Partir de Explantes da SVZ

A SVZ de camundongos C57/Bl6 com 4 semanas de idade foi dissecada e explantes com cerca de 1 mm de diâmetro foram depositados individualmente nas lamínulas com cada substrato em placas de 24 poços. Foi realizada uma incubação inicial dos explantes por 1h a 37°C para permitir sua adesão aos substratos. Neste momento cada poço recebeu inicialmente 100 µl de meio DMEM/F12 sem soro suplementado com B27 sem fatores de crescimento e após a incubação, mais 100 µl do mesmo meio de cultura foram adicionados.

Os explantes são mantidos na estufa a 37°C por um total de 72h e, ao final desse período, foi realizada a captura de imagens e os cálculos das distâncias migratórias a partir da borda dos explantes. n=3 para cada condição em 3 experimentos independentes

- Ensaio de Formação de Neurosfers

Visando avaliar o efeito das matrizes de laminina sobre a população de células-tronco neurais, neurosfers secundárias foram dissociadas e 2500 células foram plaqueadas sobre cada substrato em meio DMEM/F12 contendo EGF (20 ng/ml), FGF (10 ng/ml) e B27. Após 7 dias de expansão aderida sobre cada substrato, as células de cada grupo foram tripsinizadas e recolocadas em cultura em placas não aderentes a uma densidade clonal de 10 células/μl em meio DMEM/F12 contendo EGF (20 ng/ml), FGF (10 ng/ml) e B27 para a formação de neurosfers. Depois de 7 dias adicionais, realizou-se a contagem dos agregados celulares clonais presentes nos poços de cada grupo de substrato ao qual as células foram previamente expostas. n=3 para cada condição em 3 experimentos independentes.

- Ensaio de Diferenciação Celular

Para testar a diferenciação de precursores neurais, 2500 células de neurosfers secundárias dissociadas foram plaqueadas sobre cada tipo de substrato e mantidas sob condições proliferativas (DMEM/F12 contendo EGF

(20ng/ml), FGF (10 ng/ml) e B27) por 7 dias. Após este período, o meio foi retirado e substituído pelo “meio de diferenciação” DMEM/F12 suplementado com B27, 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) e sem Fatores de Crescimento. As células, diferenciadas ao longo de 7 dias neste meio, foram posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos para análises imunocitoquímicas.

- Cinética de Incorporação de BrdU *in Vitro*

2500 células foram plaqueadas sobre cada substrato em condições que favorecem a sua proliferação (DMEM/F12 contendo EGF, FGF e B27) e após 2 horas, é adicionado BrdU, para uma concentração final de 1 μ M n=2 para cada condição em 2 experimentos independentes.

As células foram incubadas com BrdU por 2, 4 e 6 horas a 37°C e fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos para a realização de imunocitoquímica específica para este marcador.

- Processamento Histológico

Para a técnica de imunohistoquímica, camundongos (n=8) foram inicialmente perfundidos por via transcardíaca com cerca de 30 ml de PBS para retirada do sangue e em seguida com 50 ml de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram retirados e mantidos em PBS contendo 30% de sacarose por pelo menos 24h até processamentos adicionais. Após este período, o material foi congelado em resina OCT e cortes de 20 µm de espessura na orientação sagital do cérebro foram obtidos em criostato. Até o seu processamento imunohistoquímico, o material é mantido a -20°C.

- Imunohistoquímica e Imunocitoquímica

Para o procedimento imunohistóquímico, os cortes foram descongelados, lavados com PBS, incubados com soro de cabra 10% (NGS – Sigma) por 1 hora para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos e incubados por 16h a 4°C com anticorpos primários. Alternativamente, para a marcação de moléculas intrecelulares, o tecido foi permeabilizado com PBS- Triton X-100 0,3% antes da etapa de bloqueio. Os anticorpos primários utilizados incluíram: anti-laminina (1:30 Sigma) e anti-PSA NCAM (1:200 Chemicon). Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e incubados com os respectivos anticorpos secundários por 2h a 37°C. Nesta etapa foram utilizados os anticorpos: Cy3 (1:1000, Jackson labs), e Alexa 488 (1:300, Molecular Probes).

Após a incubação com os anticorpos secundários, os cortes foram lavados com PBS e contra-corados com o marcador nuclear Hoechst 1µg/ml

(Sigma). Após esta etapa, foi realizada uma nova lavagem dos cortes em PBS e as lâminas foram montadas com Vecta Shield (Vector). Especificamente, em imunohistoquímicas duplas para os marcadores laminina e PSA-NCAM, após a incubação com o anticorpo secundário para a imunomarcação de laminina procedeu-se uma pós-fixação com paraformaldeído 4% por 20 minutos.

Para a imunocitoquímica relativa aos ensaios de diferenciação celular, as lamínulas foram primeiramente lavadas em PBS, submetidas a permeabilização com PBS contendo 0,3% Triton X-100 por 5 minutos, incubadas por 1 hora com NBS 10% para bloqueio de sítios inespecíficos e incubadas com os anticorpos primários anti-Beta Tubulina III (1:400, Sigma), anti-GFAP (1:400, Dako) ou anti-Nestina (1:200 Chemicon) a 4°C por 16h. Em seguida, são realizou-se lavagens com PBS e as amostras foram incubadas por 40 minutos a 37°C com os respectivos anticorpos secundários.

- Imunocitoquímica para BrdU

As amostras foram inicialmente lavadas em PBS e incubadas por 30 minutos com HCl 2N a 37°C. Em seguida as amostras foram lavadas por 5 minutos com tampão Borato 0,1M pH 8,5, lavadas com PBS e então incubadas por 1h na solução de bloqueio contendo NGS 5%, Triton X-100 0,4%, BSA 3% e glicina 1% em PBS. As amostras foram novamente lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo primário (anti-BrdU 1:100, Chemicon) a 4°C por 16h. Após esta etapa, as amostras foram novamente lavadas, expostas ao anticorpo secundário (FITC anti-Rat, Jackson Labs) e processadas de acordo com a metodologia normal de imunocitoquímica citada anteriormente.

- Aquisição de Imagens

Os procedimentos de imunohistoquímica, imunocitoquímica bem como imagens em campo claro foram observados e analisados através microscópio Axiovert 200M (Zeiss) equipado com Apotome e fluorescência ótica.

- Análises Estatísticas

Análises de variância fatorial (ANOVA) foram utilizados na verificação da significância dos dados de quantificações e distâncias obtidos. Adicionalmente os valores de ANOVA significativos ($*p < 0.05$) foram submetidos a comparações post-hoc de médias individuais através do método Tukey.

RESULTADOS

1- A expressão de laminina na RMS

Inicialmente, buscamos analisar *in vivo* a expressão de laminina na RMS de camundongos adultos.

Verificamos por análises histoquímicas que há expressão de laminina na RMS do cérebro de camundongos adultos. Esta expressão é claramente diferenciada do restante do parênquima cerebral, onde a expressão de laminina está restrita apenas à vasculatura. Verificamos que na RMS há uma acentuada expressão de laminina em vasos (Figura 11) e além disso, também identificamos sua expressão em feixes de neuroblastos (Figura 10).

Neuroblastos aparentaram co-expressar laminina e PSA-NCAM extracelularmente (Figura 11) enquanto vasos, com alta expressão de laminina parecem intercalar-se com os feixes de neuroblastos na RMS.

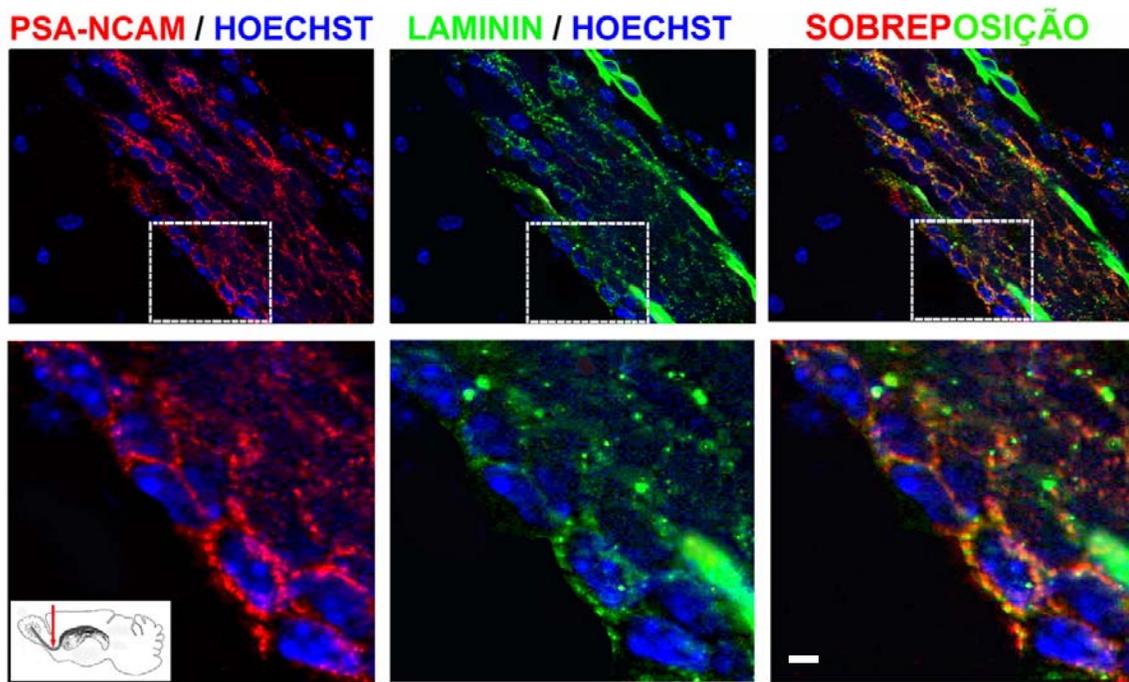


Figura 10: Expressão de laminina na RMS. Feixes de neuroblastos da RMS de camundongos adultos marcados para PSA-NCAM (em vermelho), laminina (em verde) e o marcador nuclear Hoechst (em azul) por imunofluorescência. Abaixo, em detalhe, mostra-se em maior aumento um dos feixes de neuroblastos positivo para PSA-NCAM e laminina. No inserto, à esquerda, a seta vermelha indica a região da RMS observada. Barra = 5 μ m nos insertos ampliados.

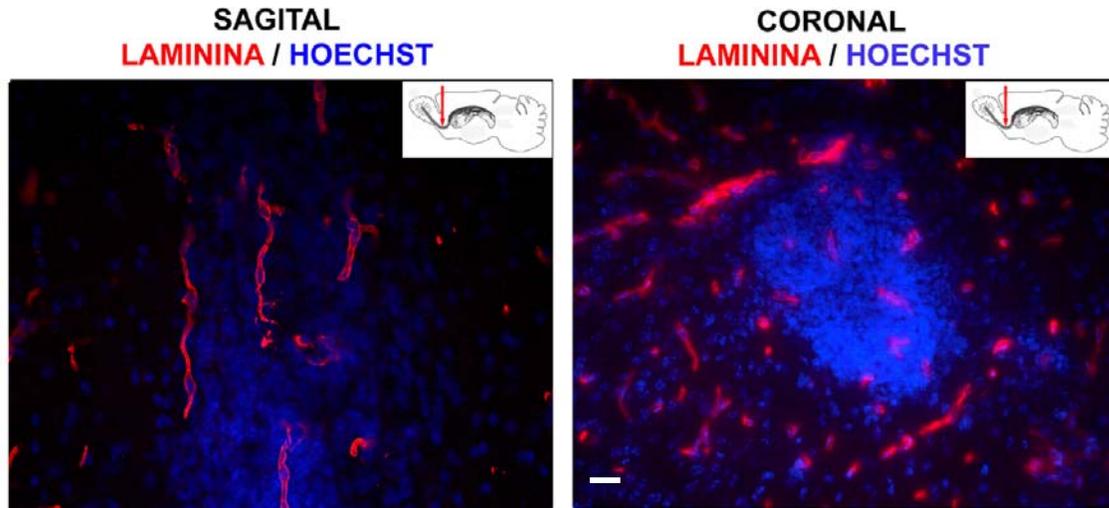


Figura 11: Expressão de laminina em vasos da RMS. Vasos da RMS de camundongos adultos marcados para laminina por imunofluorescência (em vermelho) em cortes sagitais (à esquerda), e coronais (à direita). Em detalhe, a seta vermelha, no esquema, indica a região da RMS observada. Barra = 30 μ m.

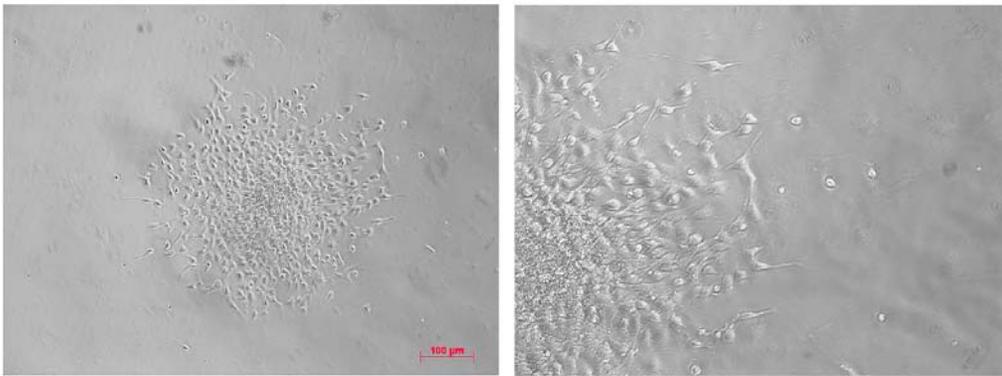
2 – Influência de matrizes de laminina ácidas e neutras sobre a migração de precursores neurais em neuroferas e explantes de SVZ

Para avaliar o efeito de matrizes ácidas e neutras sobre a migração precursores neurais adultos purificados, selecionamos neuroferas secundárias com cerca de 100 μ m de diâmetro, que foram plaqueadas sobre matrizes de laminina ácida (pH 4), laminina neutra (pH 7) e matrigel. Imediatamente após o plaqueamento, foi realizada a capturadas imagens em campo claro para a obtenção exata dos diâmetros iniciais de cada neurofera. As neuroferas aderem rapidamente aos substratos onde adquirem uma morfologia

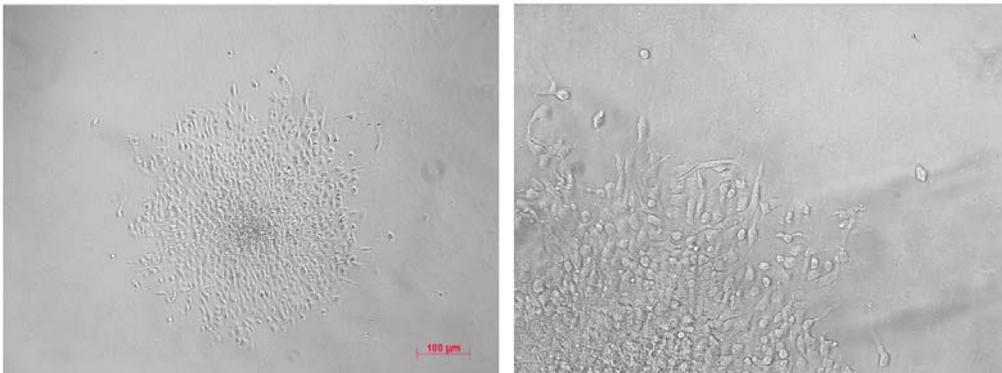
progressivamente achatada devido à migração celular progressiva que ocorre no sentido de sua periferia (Figura 12). Após 24 sobre cada substrato, novas imagens são capturadas (Figura 12) e a migração a partir de cada neurosfera é então calculada através da subtração da medida do raio de migração subtraído pelo raio inicial da neurosfera correspondente em cada campo.

Foi verificada uma média de migração de 218,7 μm ($218,7 \pm 13,71$) sobre matrizes neutras. Tal taxa de migração foi significativamente maior em relação aos outros grupos (pH 4, 162 $\mu\text{m} \pm 7,338$; matrigel, 145,5 $\mu\text{m} \pm 11,2$), que por sua vez não apresentaram diferença significativa entre si (Figura13).

MATRIGEL



pH 4



pH 7

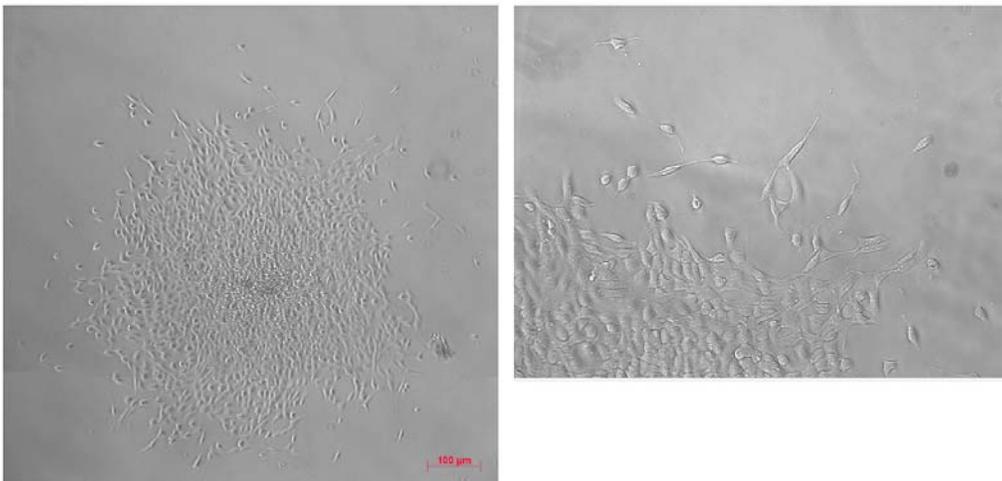


Figura 12: Neurosféricas 24h após o plaqueamento sobre matrigel e matrizes de laminina ácidas e neutras. Na coluna à esquerda, observam-se neurosféricas individuais, aderidas sobre cada tipo substrato 1 dia após o plaqueamento. Na coluna à direita são mostrados detalhes da migração de cada figura da coluna esquerda. Magnificação: 100x (esquerda) e 200x (direita).

Neurosferas exibem maior migração sobre matrizes neutras de laminina

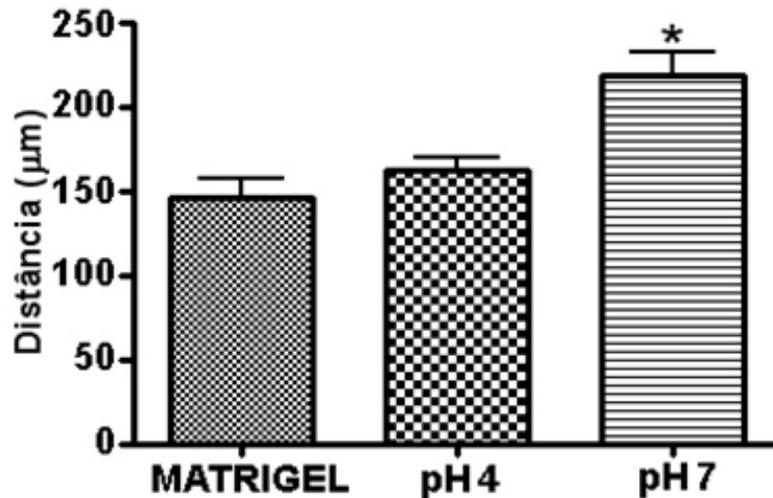
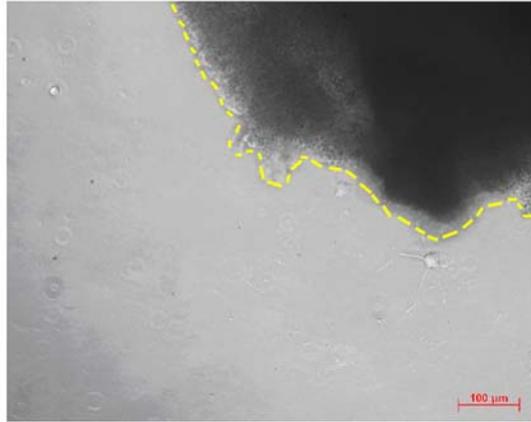


Figura 13: Distância média de migração quantificada em neurosféricas. O asterisco indica uma diferença significativa em relação aos demais grupos. ANOVA [$F(2,98) = 14,251$, $p < 0,05$].

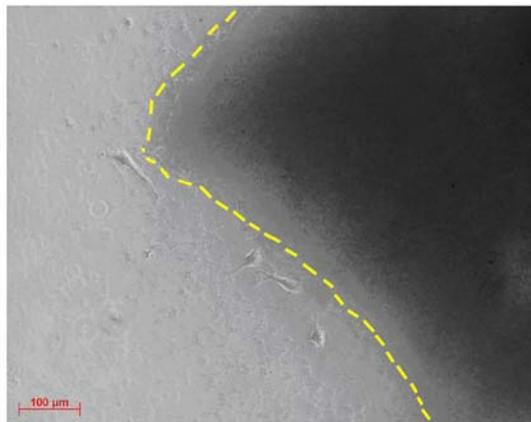
Paralelamente, avaliou-se a influência de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre explantes da SVZ de animais com a mesma idade dos utilizados na preparação de culturas de neurosféricas. Após 3 dias em cultura, um número pequeno de células migrava isoladamente umas das outras, a partir dos explantes (Figura 14). Observamos uma maior quantidade de células migratórias por explante sobre matrizes de laminina neutra (matrigel, $1,250 \pm 0,75$; pH4 $4,25 \pm 0,62$; pH7 $8,4 \pm 1,91$), enquanto a migração sobre matrigel foi praticamente nula. Verificou-se que apesar de não termos detectado diferenças significativas entre os grupos de matrizes ácidas e neutras, há uma tendência a maior migração a partir de explantes sobre as matrizes neutras (Figura 15).

A partir da análise da distância migratória a partir desses mesmos explantes, verificamos também que a distância média a partir da explantes sobre marizes neutras são significativamente maiores (matrigel, $18,4 \pm 9,467$; pH4 $118,8 \pm 28,06$; pH7 $372,2 \pm 70,1$) (Figura 16).

MATRIGEL



pH 4



pH 7

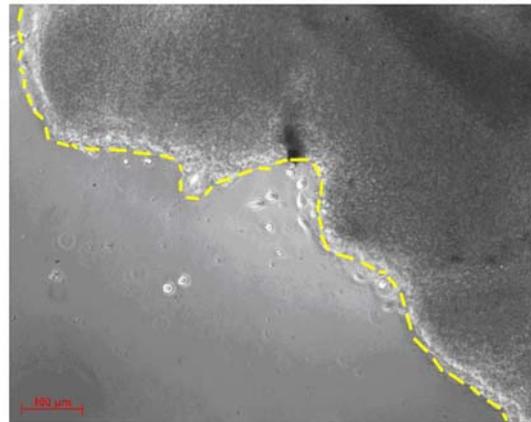


Figura 14: Células migratórias a partir de explantes de SVZ sobre matrizes de laminina ácida e neutra além de matrigel como controle. As figuras mostram explantes com 72 horas após o plaqueamento. A linha tracejada demarca o limite dos explantes em cultura. Barra = 100x.

Efeito de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre a migração de células a partir de explantes de SVZ

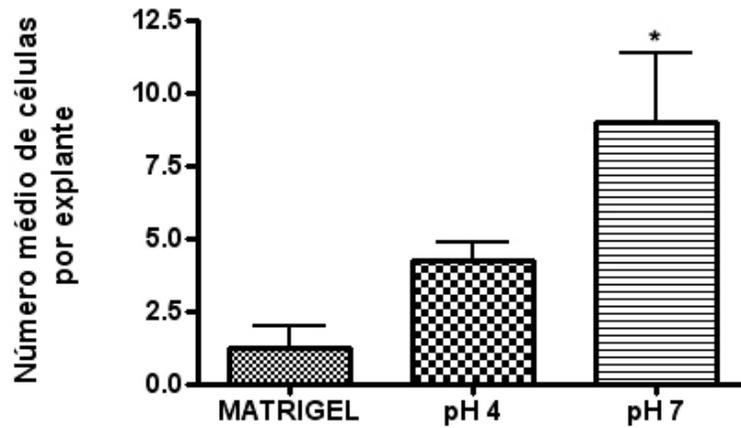


Figura 15: Média do número de células migratórias por explante após 72h. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle (matrigel). ANOVA [$F(2,11) = 7,094$, $p > 0,05$].

Matrizes de laminina neutra promovem o aumento da migração de precursores neurais adultos a partir de explantes de SVZ

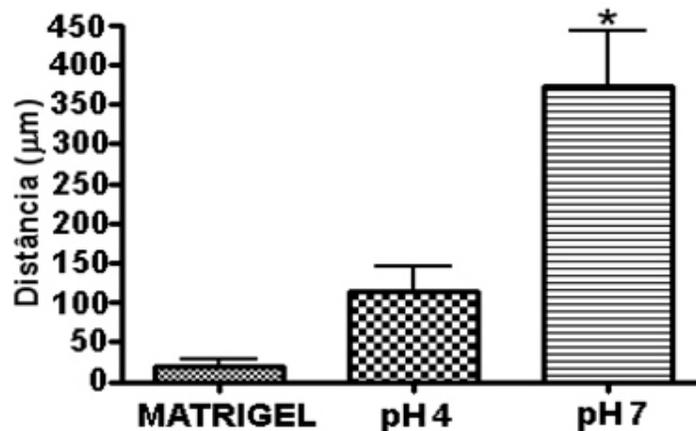


Figura 16: Distância média da migração celular a partir de explantes de SVZ. A quantificação das distâncias migratórias de células a partir de explantes revelaram que há uma maior média de migração sobre matrizes neutras de laminina. O asterisco indica uma diferença significativa entre a laminina neutra e os demais grupos. ANOVA [$F(2,101) = 14,656$, $p < 0,05$].

4 – Efeito de matrizes de laminina ácida ou neutra sobre a proliferação de progenitores neurais adultos da SVZ *in vitro*.

Para avaliar o efeito de matrizes de laminina ácidas e neutras sobre os precursores neurais adultos, realizamos uma cinética de incorporação de 5-Bromo 2-deoxiuridina (BrdU) 2h após o plaqueamento das células sobre os substratos. O BrdU é análogo à base nitrogenada timina, e portanto, é incorporado durante a fase de síntese do DNA, permitindo a posterior identificação de células proliferantes através da execução da técnica de imunocitoquímica com anticorpos específicos para BrdU. Duas horas após o plaqueamento de precursores neurais pudemos observar através de microscopia ótica que a totalidade das células já se encontra aderida sobre os diferentes substratos. Assim, a adição de BrdU após este período nos permite avaliar exclusivamente a proliferação de células em contato com o substrato.

A incorporação de BrdU por 2, 4 ou 6 horas após a adesão das células não revelou diferenças de significativas de proliferação entre os precursores neurais nos diferentes substratos (Figura 17). Verificou-se que após 6h de exposição ao BrdU aproximadamente 20% dos precursores neurais exibem atividade mitótica (matrigel, $19,656 \pm 2,4$; pH 4, $22,683 \pm 1,19$; pH 7, $19,74 \pm 2,37$). Considerando-se que a população de progenitores neurais possui um ciclo celular consideravelmente mais curto do que células-tronco neurais, este resultado sugere que não há uma diferença na taxa de proliferação específica de progenitores neurais em cada substrato logo após o plaqueamento.

A proliferação de progenitores neurais adultos não é diferencialmente modulada por matrizes ácidas e básicas de laminina

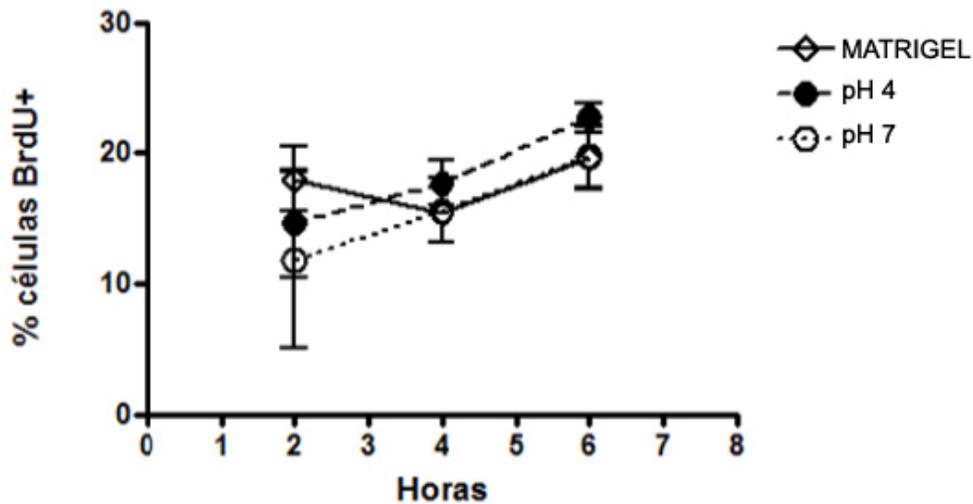


Figura 17: Ensaio de incorporação de BrdU após a adesão de precursores neurais sobre laminina ácida, neutra e matrigel. O gráfico mostra o percentual de células BrdU-positivas após os diferentes **tempos de exposição** a este marcador de proliferação celular. Neste ensaio não foram encontradas diferenças significativas de proliferação celular sobre os diferentes substratos. ANOVA: 2h [F (2,8) = 0.522, $p > 0,05$]; 4h [F (2,8) = 0.351, $p > 0,05$]; 6h [F (2,8) = 0.696, $p > 0,05$].

5– Efeito de matrizes de laminina ácida ou neutra sobre a proliferação de células-tronco neurais adultas da SVZ *in vitro*

Um efeito específico sobre a proliferação de células-tronco neurais pode ser avaliado através do ensaio de formação de neurosféricas (MORSHEAD *et al.*, 1994; MORSHEAD *et al.*, 1998) onde a formação de cada neurosfera corresponderia a presença de uma única célula-tronco neural (Figura 4). Desta forma, utilizamos o ensaio de formação de neurosféricas como índice do efeito

dos diferentes substratos sobre a proliferação simétrica de células-tronco neurais. Para isto, realizamos inicialmente a expansão de precursores neurais por um período sobre cada substrato por 7 dias. Em seguida, realizou-se a passagem dessas células e o seu replaqueamento na ausência de substratos para a formação de neuroesferas.

Após mais 7 dias, realizamos inicialmente a contagem do número total de neuroesferas em suspensão, independente de seu tamanho. Esta quantificação revelou que há uma tendência à formação de mais neuroesferas por células previamente expostas a matrizes ácidas de laminina em relação aos demais substratos (matrigel, $12 \pm 3,055$; pH4 19 ± 4 ; pH7 $8,33 \pm 2,185$) (Figura 16-A).

Matrizes ácidas de laminina promovem um aumento no número de neurosféricas de precursores neurais adultos

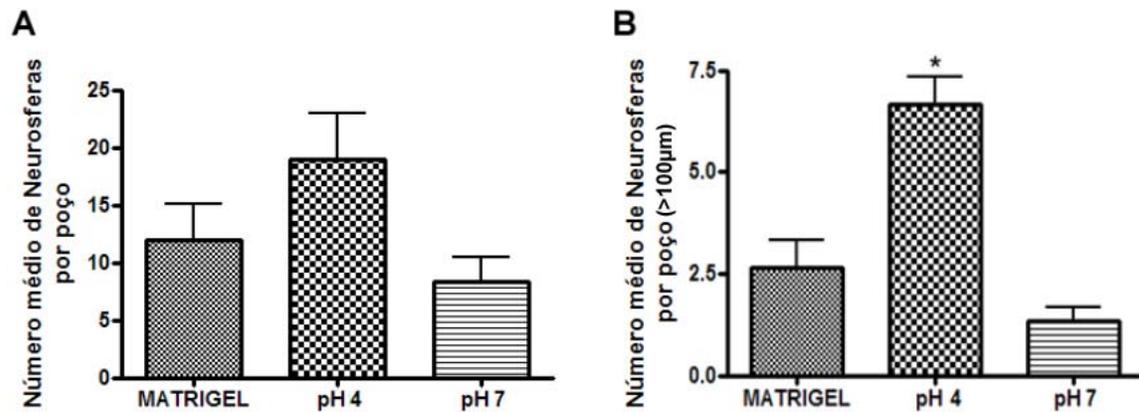


Figura 18: Média do número de neurosféricas por poço, obtido após 7 dias de expansão sobre matrizes de laminina o matruigel e nova dissociação e plaqueamento das células em ausência de qualquer substrato. Na figura A, temos a média calculada com base no total de neurosféricas formadas, e verifica-se uma tendência a maior formação de neurosféricas por células expandidas em matrizes ácidas de laminina. ANOVA [F (2,8) = 2,926, $p > 0,05$]. Na figura B temos a média de neurosféricas por poço baseada na quantificação seletiva de neurosféricas com diâmetros superiores a 100µm. ANOVA [F (2,8) = 23,111, $p < 0,05$].

Dado que tanto células-tronco quanto progenitores neurais possuem capacidade de proliferação, a formação de neurosféricas não é por si somente, uma evidência conclusiva de sua origem clonal a partir de uma célula-tronco (REYNOLDS & RIETZE, 2005; BULL & BARTLETT, 2005) e que, progenitores neurais têm uma capacidade limitada proliferação em relação às células-tronco, realizamos alternativamente uma nova quantificação seletiva de neurosféricas formadas. Para isto, foram contadas apenas neurosféricas com diâmetros superiores a 100µm (figura 17). Com base nesta nova quantificação verificamos que um número significativamente maior de neurosféricas (>100µm) é derivado de

precursores neurais expostos a laminina ácida (matrigel, $2,66 \pm 0,66$; pH4 $6,66 \pm 0,66$; pH7 $1,33 \pm 0,33$) (Figura 16-B).

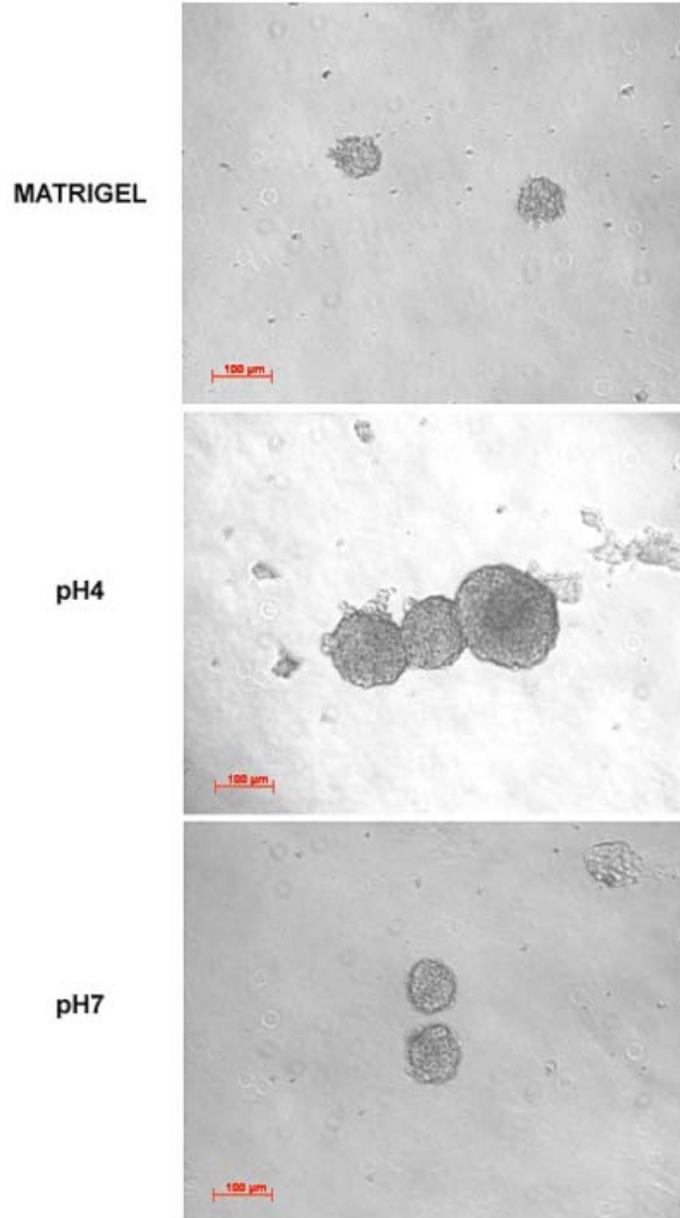


Figura 19: Aspecto geral das neurosféricas obtidas após a expansão, dissociação e replaqueamento de precursores neurais previamente expandidos sobre matrizes de laminina ácida e básica além do controle matrigel. Observa-se na figura de microscopia de campo claro o maior diâmetro das neurosféricas formadas por precursores neurais que haviam sido expostos a matrizes ácidas de laminina. Barra de calibrção: 100 μ m; Magnificação: 100x.

Através de microscopia ótica de campo claro, pudemos observar complementarmente que o aspecto geral das neurosféricas formadas por células expandidas sobre os 3 tipos de substrato era diferente. Neurosféricas formadas por precursores expandidos sobre matrizes ácidas de laminina aparentavam possuir diâmetros maiores (Figura 20). Com base nesta observação, o diâmetro médio do total de neurosféricas obtidas foi calculado, sendo verificado que precursores neurais expandidos sobre matrizes ácida de laminina eram capazes de formar neurosféricas maiores (matrigel, $74,4 \pm 2,5$; pH4 $102,8 \pm 4,515$; pH7 $74,2 \pm 3,733$) (Figura 19). Estas apresentaram uma diferença média de cerca de $30 \mu\text{m}$ de diâmetro em relação aos demais grupos.

**Matrizes ácidas de laminina induzem
precursores neurais adultos a
formar neurosféricas de maior diâmetro**

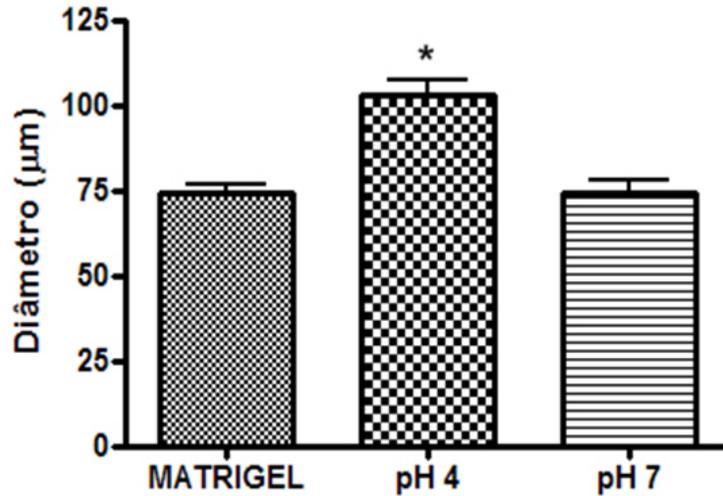


Figura 20: Diâmetro médio de neurosféricas no ensaio anterior. Observa-se que neurosféricas derivadas de precursores neurais expandidos sobre laminina ácida apresentam diâmetros significativamente maiores em relação aos demais grupos. ANOVA [F (2,59) = 20,181, $p < 0,05$].

As diferenças quantitativas de número e diâmetro poderiam ser um indicativo de que as neurosféricas geradas pelos precursores neurais previamente expandidos sobre laminina ácida são provenientes de células mais indiferenciadas do que as células formadoras de neurosféricas previamente expandidas sobre laminina neutra e matrigel.

6– Efeito de matrizes de laminina ácida ou neutra sobre a diferenciação de precursores neurais adultos da SVZ *in vitro*.

Como próximo passo, verificamos o efeito de matrizes ácidas e básicas de laminina sobre a diferenciação de precursores neurais adultos. Neste ensaio, realizamos uma primeira etapa de 7 dias para expansão de precursores neurais adultos sobre cada substrato, utilizando meio de cultivo de neurosféricas (contendo EGF e FGF) seguida de uma segunda etapa de 7 dias adicionais para diferenciação. A indução deste processo ocorre através da troca do meio de proliferação da etapa inicial pelo meio DMEM/F12 contendo 1% de soro fetal bovino e sem a adição dos fatores de crescimento EGF e FGF.

Utilizando posteriormente marcações imunocitoquímicas para Beta-tubulina III neuronal e GFAP observamos que não há um efeito aparente dos substratos sobre a gliogênese (matrigel: 93,025% \pm 1,425%; pH4: 92,5252% \pm 4,08%; pH7: 4,3487% \pm 0,058%) ou a neurogênese (matrigel, 2,3796% \pm 0,97%; pH4 4,3026% \pm 1,75%; pH7 4,4028% \pm 1,61%) (Figura 21). Verifica-se no entanto, uma tendência a maior geração de neurônios sobre os dois tipos de matrizes de laminina em relação ao controle matrigel. A quantificação dos marcadores neuronais e gliais neste ensaio de diferenciação nos permitiu ainda estimar, por exclusão, o número de oligodendrócitos gerados (matrigel: 4,5678%; pH 4: 3,1722%; pH 7 1,2485%) (Figura 21).

Adicionalmente, usamos o marcador de precursores neurais nestina, para identificar o número de células que teriam permanecido em um estado indiferenciado mesmo após da indução a diferenciação durante o ensaio *in vitro*.

A quantificação de células nestina-positivas nos levou a constatar uma expressivo número de células indiferenciadas sobre as matrizes ácidas de laminina. Este número foi significativamente alto em relação aos demais grupos, nos quais a células nestina-positivas eram raras (matrigel: 0,51282% ± 0.51284% ; pH 4: 5,8308%; pH 7 1,022%).

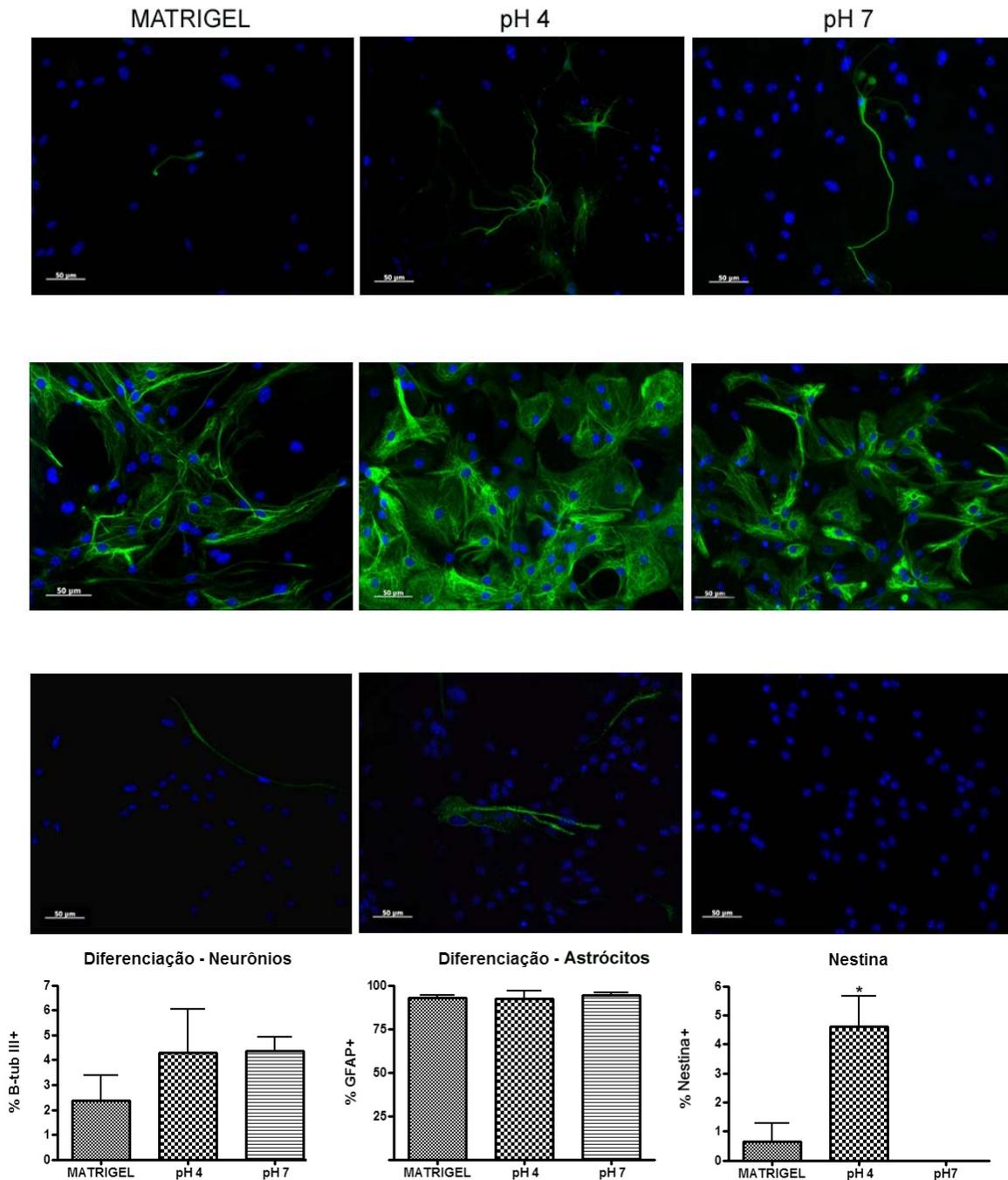


Figura 21: Ensaio de diferenciação de precursores neurais adultos sobre matrizes ácidas e básicas de laminina. Após 14 dias de proliferação e diferenciação sobre cada substrato não observamos diferenças significativas no número de astrócitos e neurônios gerados. Verificamos, no entanto, que uma quantidade significativa de células mantém-se positivas para o marcador de indiferenciação Nestina. Matrigel foi usado como controle. As figuras mostram neurônios marcados com anticorpo anti-Beta tubulina III (primeira linha), astrócitos marcados com anti-GFAP (segunda linha) e células nestina-positivas (terceira linha) em cada uma dos grupos **ANOVA**: Neurônios [F (2,14) = 1,434, p>0,05]; Astrócitos [F (2,10) = 0,175, p>0,05]; Nestina [F (2,13) = 12,616, p<0,05]. Barra de calibração: 50µm; Magnificação: 200x.

DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos o efeito de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre precursores neurais adultos. Estes, estão envolvidos na neurogênese adulta, que ocorre ao longo de todo o período pós-natal .

A migração de progenitores neurais através da RMS, utiliza um mecanismo migratório especializado, diferente do que se observa em outros tipos de migração guiadas por axônios (neurofílica) ou glia radial (gliofílica) (RAKIC, 1990; ALVAREZ-BUYLLA, 1997) Os neuroblastos da RMS apresentam uma morfologia alongada, sendo o prolongamento anterior semelhante ao cone de crescimento neuronal (KISHI, 1987; ALVAREZ-BUYLLA, 1997) e a principal característica deste mecanismo incomum de migração é a presença de interações homofílicas entre os neuroblastos, distribuídos em feixes desde a SVZ até o OB. Considera-se que este tipo de migração seja diferenciado por não requerir guias axonais ou glia radial como um suporte físico (ALVAREZ-BUYLLA, 1997).

A laminina parece estar envolvida nos diversos tipos de migração celular no sistema nervoso central, sendo ela expressa em células da glia radial (COLUMBO & NAPP, 1996), e por diversos tipos de neurônios. Dentre eles, os neurônios produtores de fatores de secreção do hormônio Luteinizante (do inglês, lutenizing hormone-releasing hormone neurons), que se originam da placa olfatória e migram através de axônios do complexo olfatório até o sistema nervoso central (FUESHKO & WRAY, 1994).

Quanto à migração de progenitores neurais através da RMS, até o momento pouco se sabe a respeito da expressão e das prováveis funções da laminina neste processo. Embora o principal mecanismo migratório nessa região seja atribuído a interação homofílica mediada por resíduos PSA sobre NCAM em neuroblastos, sendo o PSA um potente regulador negativo de interações celulares, (LUSKIN, 1993; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; BONFANTI, 2006; CONCHONAUD *et al.*, 2007) outros fatores e mecanismos envolvidos neste tipo de migração são pouco conhecidos.

A expressão de laminina pelos neuroblastos na RMS já foi sido detectada (BELVINDRAH, 2007; MURASE & HORWITZ, 2002), entretanto o seu padrão de expressão permanece inconclusivo. No presente trabalho, verificamos inicialmente que a laminina é expressa na RMS, havendo uma co-localização com o marcador PSA-NCAM, expresso nos neuroblastos migratórios desta região (Figura 9). Até a obtenção deste resultado, diversos protocolos de recuperação de epítomos e fixação de tecido foram testados. Desta forma, observamos que os melhores resultados para este tipo de dupla-imunomarcação foram obtidos com o emprego de uma etapa de pós-fixação do tecido após a incubação com o anticorpo secundário do marcador laminina.

Na RMS, a expressão de laminina parece estar restrita ao redor de feixes de neuroblastos desta região, além de vasos, que exibem um alto grau de expressão de laminina em comparação ao que se observa ao redor de feixes de neuroblastos. Adicionalmente verificamos a presença de algumas células duplamente negativas para PSA-CAM e laminina próximas aos feixes de

neuroblastos. É possível que estas células representem astrócitos desta região. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que ao menos em parte, também haja expressão de laminina pelos astrócitos que compõem o tubo glial que embainha os neuroblastos e demarca a RMS uma vez que os astrócitos são considerados a maior fonte de moléculas da matriz extracelular no sistema nervoso central (PINDZOLLA, 1993; POWELL, 1997). Apesar de termos detectado uma co-expressão de laminina e PSA-NCAM na RMS, há a possibilidade de que a laminina presente ao redor de feixes de neuroblastos não seja expressada por estas células, mas sim em prolongamentos dos astrócitos locais que estejam associados aos neuroblastos.

Obtivemos nossos primeiros resultados *in vitro* em ensaios de migração sobre laminina ácida, neutra e matrigel. A migração celular a partir de neuroesferas humanas e de camundongos sobre laminina já foi anteriormente comparada com outros tipos de substratos como fibronectina e matrigel, tendo sido verificadas maiores taxas de migração sobre laminina (FLANAGAN *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram que há uma maior migração de precursores neurais tanto em neuroesferas como em explantes sobre matrizes de laminina neutra, não polimerizada (Figuras 10 a 14).

Este resultado foi inesperado dada a diferença entre a estrutura supramolecular de matrizes de laminina neutra e ácida (Figura 8). Além disto, este resultado contrasta observações prévias de nosso laboratório. Em 2002, Freire e colaboradores verificaram uma migração neuronal intensa a partir de

explantes de córtex de animais P2, enquanto células de explantes sobre laminina neutra não apresentaram atividade migratória.

Uma das primeiras possibilidades que justificariam a maior migração de precusores neurais adultos sobre laminina neutra seria a consideração de que as matrizes ácidas e neutras possuem estruturas supramoleculares distintas e que portanto, os domínios da laminina “disponíveis” para contato célula-substrato seriam diferentes. Assim, poderia haver domínios específicos da laminina expostos nas matrizes neutras que promoveriam uma maior migração através de sinalização celular.

De fato, segundo o modelo de polimerização da laminina (MCKEE, 2007) há uma interação entre os braços curtos dessas moléculas enquanto o braço longo ficaria ancorado sobre uma membrana de glicolípídeos sulfatados (YURCHENCO & CHENG, 1993; MCKEE, 2007). Por outro lado, matrizes neutras representariam a associação desordenada de moléculas de laminina, criando portanto uma estrutura supramolecular tridimensional (FREIRE *et al.*, 2004) onde todos os domínios da laminina estariam presentes.

A acessibilidade de domínios da laminina disponíveis para reconhecimento nos diferentes arranjos supramoleculares não parece explicar por si somente as respostas celulares diferenciadas sobre as matrizes de laminina ácida e neutra. Isto porque foi verificado recentemente em nosso laboratório através de um ensaio no qual a laminina foi adsorvida em solução contendo EDTA sobre superfícies lisas similares à estrutura da laminina ácida ou sobre superfícies irregulares similares à laminina neutra (BARROSO *et al.*,

2007a). Nestas condições a laminina não se polimeriza (FREIRE & COELHO-SAMPAIO, 2000), e todos os seus domínios ficam expostos em ambos os substratos. O subsequente plaqueamento de neurônios embrionários sobre estas superfícies permitiu verificar que a superfície artificial plana contendo laminina era capaz de induzir uma intensa neuritogênese em relação a superfície artificial irregular, reproduzindo assim os resultados obtidos com o plaqueamento destas mesmas células sobre matrizes ácidas de laminina polimerizada (FREIRE *et al.*, 2002; FREIRE *et al.*, 2004; BARROSO *et al.*, 2007). Outro ensaio complementar realizado em nosso laboratório teve como objetivo verificar se a laminina seria realmente necessária para induzir esse tipo de resposta celular ou se este efeito poderia ser induzido apenas pela geometria do substrato. Neste caso, ao invés de laminina, poli-ornitina foi adsorvida sobre superfícies lisas e rugosas, similares à laminina ácida e neutra e após o plaqueamento de neurônios corticiais, verificou-se que a poli-ornitina não foi capaz de reproduzir o resultado deste experimento obtido com laminina.

Tendo em vista esses resultados, pode-se dizer que a própria geometria da estrutura supramolecular da laminina, sob diferentes configurações, parece ser capaz de modular o comportamento celular (BARROSO *et al.*, 2007).

Conforme citado anteriormente, a migração característica da RMS se diferencia dos outros tipos de migração guiadas por axônios ou glia radial. Considerando-se a possibilidade de que a migração possa ser promovida pela estrutura supramolecular de substratos deve ser levado em conta que nos tipos migração por de um suporte como a glia radial ou feixes de axônios as células

migratórias se deslocam sobre um substrato bidimensional. Já na RMS, o mecanismo de deslizamento e interação entre diversos neuroblastos dentro de feixes compactos, faz com que o substrato para migração destas células se distribua tridimensionalmente. Assim, sugerimos que é possível que as matrizes neutras de laminina, por apresentarem uma organização tridimensional, poderiam promover a migração de precursores neurais por reproduzirem o tipo de organização do substrato *in vivo*.

Apesar dessas possibilidades ainda não podemos avaliar a participação de interações ligante-receptor específicas nesses eventos de migração. Investigações *in vivo* demonstraram que há expressão de diversas subunidades de integrinas na RMS (MURASE & HORWITZ, 2002; BELVINDRAH *et al.*, 2007). Esta expressão varia ao longo do tempo, sendo que subunidades de integrina expressas nesta região durante o desenvolvimento até os primeiros dias do período pós-natal diferem das integrinas expressas em animais adultos (MURASE & HORWITZ, 2002; EMSLEY & HAGG, 2003). Dentre as integrinas expressas na RMS, a integrina $\alpha6\beta1$ se liga apenas à laminina (AUMAILLEY *et al.*, 1990; TALTS *et al.*, 2000; EMSLEY & HAGG, 2003) e este mesmo tipo de integrina parece ser crítico para a migração de neuroblastos (JACQUES *et al.*, 1998).

Complementarmente, em 2003 Emsley e Hagg demonstraram através de infusões estriatais com um peptídeo do domínio E8 da laminina que se liga à integrina $\alpha6\beta1$ promove um redirecionamento de neuroblastos da SVZ para o estriado, o que é um forte indício de que a sinalização celular mediada por

integrinas e laminina possa promover uma modulação migratória de progenitores neurais.

Belvindrah e colaboradores demonstraram que camundongos nocaute para a subunidade $\beta 1$ da integrina apresentam uma desorganização de feixes de neuroblastos na RMS. Aparentemente a subunidade da integrina $\beta 1$ e a laminina são co-expressas pelos neuroblastos desta região e por isto, acredita-se que esta interação seja capaz de promover a organização de cadeias de neuroblastos na RMS. Em particular nos ensaios de migração sobre matrizes de laminina que realizamos utilizando explantes, não observamos a formação de cadeias de neuroblastos e o número de células migratórias foi bastante reduzido em comparação com explantes de SVZ pós-natal em outros trabalhos (BELVINDRAH, 2007; LIU & RAO, 2003). Entretanto, em nossos ensaios utilizamos apenas laminina pura como substrato bidimensional.

As neurosféricas possuem uma composição celular heterogênea (SUSLOV *et al.*, 2002, SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; BULL & BARTLETT, 2005). Além de conterem células-tronco das quais podem se originar novas neurosféricas, elas contêm em sua maior parte progenitores neurais com certo grau de comprometimento para a diferenciação em neurônios, astrócitos ou oligodendrócitos (SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; BULL & BARTLETT, 2005, BATISTA *et al.*, 2006). *In vivo*, sabe-se que células-tronco e progenitores neurais (que juntos compõem a população total de precursores neurais) apresentam ciclos celulares bastante distintos (MORSHEAD & VANDER KOOY, 2004; MORSHEAD & VANDER KOOY, 1994; SEABERG & VAN DER KOOY,

2003). Progenitores neurais apresentam um ciclo celular curto estimado em 12h, enquanto células-tronco neurais parecem se dividir ocasionalmente de forma mais lenta, uma vez que a eliminação de progenitores neurais da SVZ com a administração da droga citostática Ara-C ou [H^3], não elimina a população de células-tronco neurais (MORSHEAD & VAN DER KOOY, 1994; DOETSCH *et al.*, 1999).

Quanto a proliferação de precursores neurais adultos, analisamos primeiramente o efeito sobre progenitores neurais adultos. Uma vez que estes se dividem mais rapidamente e compõem a maior fração celular em neuroesferas, a incorporação de BrdU por curtos períodos de tempo revela a proliferação de progenitores. Observamos que nas primeiras horas após o plaqueamento de precursores neurais sobre laminina ácida, neutra e matrigel, não houve diferenças de proliferação significativas, mas há uma pequena tendência à maior proliferação sobre matrizes ácidas (Figura 15). Em 2006, Flanagan e colaboradores verificaram que matrizes de laminina promoviam uma maior expansão de precursores neurais de camundongo e humanos em comparação a outros substratos como matrigel e fibronectina. Em precursores neurais humanos uma diferença proliferativa de células sobre laminina em relação a outros substratos começa a surgir após 24h em cultura (FLANAGAN *et al.*, 2006). Outro dado obtido recentemente indica que a exposição de células endoteliais a um substrato sintético com aspecto de “colméia” promove um aumento de proliferação (TANAKA *et al.*, 2007). Este substrato seria comparável à laminina ácida e, portanto, seria um indicativo de que a própria estrutura supramolecular

deste substrato poderia estar correlacionada com a tendência a maior proliferação sobre matrizes ácidas que observamos. No entanto, como o ensaio de incorporação que realizamos não cobre todo o ciclo celular dos progenitores neurais não podemos afirmar que exista uma diferença proliferativa entre as células sobre os tipos de substrato que utilizamos. Assume-se que *in vitro* cada neurosfera tem origem clonal a partir de uma única células-tronco neural, no entanto progenitores neurais também são mitoticamente ativos sendo assim capazes de formar “neurosferas”. É possível detectar diferenças entre progenitores neurais e células-tronco neurais *in vitro* pois progenitores neurais ainda que possuam atividade mitótica, apresentam limitações de proliferação e diferenciação (BARTLETT, 2005; SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; SEABERG & VAN DER KOOY, 2003). Exemplos desta diferenciação entre “neurosferas” de progenitores neurais e culturas de neurosferas derivadas de células-tronco neurais são encontrados nas publicações que sugerem que o hipocampo não contém células-tronco neurais mas apenas progenitores neurais que seriam provenientes de outra região do cérebro (BARTLETT, 2005; SEABERG & VAN DER KOOY, 2002). Em ambos os trabalhos foi inicialmente verificada uma diferença quantitativa do número de neurosferas geradas bem como diferenças no aspecto geral das culturas derivadas do hipocampo em comparação com neurosferas derivadas da SVZ. Culturas de “neurosferas” derivadas do hipocampo apresentaram um potencial limitado de proliferação ao longo das passagens, e mostrou-se que estas células são unipotentes, diferenciando-se apenas em astrócitos (BARTLETT, 2005;

SEABERG & VAN DER KOOY, 2002).

Com base nesses ensaios testamos em seguida se os diferentes substratos teriam algum efeito sobre a proliferação específica de células-tronco neurais. Assim, executamos primeiramente uma etapa de expansão de precursores neurais sobre os substratos em seguida, sua dissociação e replaqueamento para formação de neurosféricas. Verificamos então através da quantificação inicial do número total de neurosféricas, uma tendência à formação de maior quantidade de neurosféricas por precursores neurais previamente expandidos sobre laminina ácida (Figura 16). Entretanto, verificamos que o aspecto geral das neurosféricas dos diferentes grupos era diferente (Figura 18), sendo as neurosféricas, obtidas a partir de precursores neurais expandidos sobre laminina ácida, aparentemente maiores. Desta forma, como assume-se que “neurosféricas” derivadas de células progenitoras são menores do que neurosféricas formadas a partir de células-tronco (BARTLETT, 2005; SEABERG & VAN DER KOOY, 2002; SEABERG & VAN DER KOOY, 2003) realizamos uma nova quantificação seletiva na qual apenas neurosféricas com diâmetros superiores a 100 μ m foram contadas. A partir desta nova quantificação, demonstramos que uma quantidade maior de neurosféricas é formada a partir de precursores expandidos sobre laminina ácida (Figura 18).

Verificamos através desses resultados que matrizes ácidas de laminina parecem estimular a proliferação de precursores neurais adultos. Entretanto, não no momento, inferir se este é um efeito geral sobre precursores neurais ou específico sobre a população de células-tronco ou progenitores. Para isto,

ensaios adicionais de incorporação de BrdU por períodos mais longos devem ser realizados.

O terceiro aspecto analisado foi o efeito das matrizes ácidas e neutras de laminina sobre a diferenciação dos precursores neurais adultos. Ensaios de diferenciação de precursores neurais derivados de células-tronco embrionárias mostram que a laminina aumenta de forma significativa o número de neurônios gerados em comparação com outros tipos de substrato (GOETZ *et al.*, 2007). Ensaios de diferenciação similares realizados com neuroesferas humanas e neuroesferas embrionárias de camundongos também mostram um aumento no número de neurônios gerados, juntamente com um aumento no o número de astrócitos gerados (FLANAGAN *et al.*, 2006).

Os dados de diferenciação que obtivemos revelam uma tendência a maior geração de neurônios sobre laminina independente da sua estrutura supramolecular (Figura 21). Verificamos também uma diferença significativa na presença de células positivas para o marcador de células neurais indiferenciadas nestina (Figura 21). Este marcador é co-expresso tanto em progenitores quanto células-tronco neurais *in vivo* e *in vitro* (MORSHEAD *et al.*, 1994; GRITTI *et al.*, 1996; KAWAGUCHI *et al.*, 2001) e a presença de células nestina positivas após a indução de sua diferenciação poderia ser justificada pela presença de progenitores neurais que ainda não completaram sua maturação. Entretanto, verificamos uma diferença significativa entre os grupos o que pode sugerir também que laminina ácida pudesse estimular divisões simétricas da população de precursores mais indiferenciados.

Sabe-se que a matriz extracelular interage e se liga a fatores, auxiliando a sua “apresentação” para progenitores neurais (FAISSNER & STENDLER, 1995) mas até o momento não são conhecidos substratos que promovam a proliferação específica de células-tronco. A única molécula conhecida capaz de induzir tal efeito é o fator derivado do pigmento epitelial (PEDF) que é capaz de promover a proliferação simétrica de células-tronco neurais *in vivo* e *in vitro* (RAMIREZ-CASTILLJO *et al.*, 2006).

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho revelou alguns dos efeitos de matrizes ácidas e neutras de laminina sobre precursores neurais adultos. Surpreendentemente, muitos dos resultados obtidos são diferentes dos dados prévios de nosso grupo. Em 2002, Freire e colaboradores observaram em ensaios com culturas de neurônios corticais de animais E14 que matrizes ácidas de laminina promoviam uma intensa neuritogênese enquanto matrizes neutras de laminina promoviam a proliferação celular. Além disto matrizes ácidas de animais P2 eram capazes de induzir a migração a partir de explantes de córtex. Opostamente verificamos que a migração de precursores neurais adultos é favorecida por laminina neutra e a sua proliferação é promovida por laminina ácida. Quanto a estes resultados sugerimos que além da utilização de tipos celulares distintos, contribuíram para a obtenção de resultados distintos.

O ambiente neurogênico do sistema nervoso central embrionário é distinto do ambiente neurogênico adulto. Enquanto ao longo do desenvolvimento, o cérebro possui uma ampla permissividade à ocorrência de neurogênese, os precursores neurais adultos estão envolvidos de forma praticamente exclusiva

na manutenção celular do OB ao longo do período pós-natal. Ao que tudo indica, o eixo SVZ-OB conectado pela RMS representa uma via neurogênia restrita, que sustenta a migração de precursores neurais subventriculares apenas para o OB, pois regiões como o estriado, perdem a capacidade permissiva à migração celular ainda no período neonatal (HERRERA *et al.*, 1999). O transplante de precursores neurais da SVZ para múltiplas regiões do cérebro adulto, incluindo o córtex, hipocampo, estriado e o OB revela que células transplantadas para regiões fora do eixo SVZ-OB apresentam uma capacidade extremamente limitada de sobrevivência e diferenciação (HERRERA *et al.*, 1999). O efeito oposto é observado quando as mesmas células são transplantadas para o cérebro de camundongos com idade até P10, sendo observada uma ampla integração celular em múltiplas regiões do cérebro (LIM *et al.*, 1997). Logo, é possível que a resposta de precursores neurais dos períodos embrionário e neonatal seja diferente da resposta de precursores neurais adultos a um determinado estímulo.

Em 2000 Ary-Pires e Linden verificaram que a laminina exercia efeitos opostos sobre células ganglionares da retina entre os primeiros dias do período pós-natal e a fase adulta. Células de animais com idades de P2 a P6 apresentavam neuritogênese regulada positivamente pela laminina enquanto em animais P14 em diante a neuritogênese era suprimida pelo mesmo substrato. Murase e Horwitz também demonstraram que a expressão de subunidades de integrina variava, mesmo durante o período pós-natal.

O conjunto de dados obtidos nos levou a verificar que matrizes de

laminina ácida e neutra, modulam de forma distinta o comportamento de precursores neurais adultos. Enquanto matrizes neutras estimulam a migração destas células, matrizes ácidas parecem estimular a sua proliferação e manutenção em estado indiferenciado.

Sugerimos com base nos dados que vêm sendo obtidos em nosso laboratório, que as diferentes respostas celulares às matrizes ácidas e neutras de laminina são dependentes da geometria planar específica de apresentação de seus domínios. Desta forma, as estruturas supramoleculares distintas de matrizes ácidas e neutras de laminina favoreceriam respostas celulares distintas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram primeiramente que há uma aparente expressão de laminina na RMS em feixes de neuroblastos migrantes. Quanto ao efeito das matrizes ácidas e neutras de laminina sobre a migração, proliferação e diferenciação de precursores neurais adultos, encontramos indícios de que a proliferação e migração de precursores neurais adultos são moduladas de formas distintas por matrizes de laminina ácidas e neutras. Neste caso, verificamos que matrizes neutras promovem a migração celular enquanto matrizes ácidas a proliferação e manutenção em estado indiferenciado.

Em relação à diferenciação de precursores neurais adultos, não observamos diferenças significativas entre matrizes neutras e ácidas quanto a geração de neurônios e astrócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS D.N., KAO E.Y., HYPOLITE C.L., DISTEFANO M.D., HU W.S., LETOURNEAU P.C. Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *J Neurobiol*, v62, n1, pp. 134-147; 2005.
- ALTMAN J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, v137, n4, pp.433-457;1969.
- ALTMAN J., DAS G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, v124, n3, pp.319-335; 1965.
- ALVAREZ-BUYLLA A. Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Semin Cell Dev Biol*, v8, n2, pp.207-213; 1997.
- ALVAREZ-BUYLLA A. Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Semin Cell Dev Biol*, v8, n2, pp.207-213; 1997.
- ALVAREZ-BUYLLA A. GARCIA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, v22, n3, pp. 629-634, 2002.
- AUMAILLEY M, TIMPL R, SONNENBERG A. Antibody to integrin alpha 6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8. *Exp Cell Res*, v188, n1, pp. 55-60; 1990
- BARROSO, M. *et al.*; 2007a. Manuscrito em preparação.
- BARROSO, M. & COELHO-SAMPAIO, T. 2007. Manuscrito em preparação.

BELVINDRAH R., HANKEL S., WALKER J., PATTON B.L., MÜLLER U. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J Neurosci*, v27, n10, pp.2704-2717; 2007.

BLAKEMORE W.F., JOLLY R.D. The subependymal plate and associated ependyma in the dog. An ultrastructural study. *J Neurocytol*, v 1, n 1, pp 69-84; 1972.

BONFANTI L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol*, v80, n3, pp. 129-164; 2006.

BONNER J., CONNOR T.P. The Permissive Cue Laminin Is Essential for Growth Cone Turning In Vivo. *J Neurosci*, v21, n24, pp. 9782-9791, 2001.

BULL N.D., BARTLETT P.F. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci*, v25, n47, pp.10815-10821, 2005.

CAMERON, H.A., WOOLLEY, C.S., MCEWEN, B.S. & GOULD, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, v56, n2, pp. 337–344; 1993

CHALAZONITIS A., TENNYSON V.M., KIBBEY M.C., ROTHMAN T.P., GERSHON M.D.. The alpha1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut. *J Neurobiol*. v33, n2, pp.118-138, 1997.

COLOGNATO H., YURCHENCO P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, v218, n2, pp.213-234; 2000.

COLOGNATO H., CHENG Y.S., YURCHENCO P.D. Laminin forma an independent network in basement membranes. *J Cell Biol*, v117, n5, pp.1119-1133; 1992.

COLOMBO J.A., NAPP M.I. Ex vivo astroglial-induced radial glia express in vivo markers. *J Neurosci Res*, v46, n6, pp. 674-677; 1996.

CONCHONAUD F., NICOLAS S., AMOUREUX M.C., MÉNAGER C., MARGUET D., LENNE P.F., ROUGON G., MATARAZZO V. Polysialylation increases lateral diffusion of neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, v282, n36, pp. 26266-26274; 2007.

CONOVER J.C., DOETSCH F., GARCIA-VERDUGO J.M., GALE N.W., YANCOPOULOS G.D., ALVAREZ-BUYLLA A. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci*, v3, n11, pp.1091-1097; 2000.

DESBAN N., DUBAND J.L. Avian neural crest cell migration on laminin: interaction of the alpha1beta1 integrin with distinct laminin-1 domains mediates different adhesive responses. *J Cell Sci*, v110, n 21, pp.2729-2744; 1997.

DE ARY-PIRES R., LINDEN R.. Laminin modulates neuritogenesis of developing rat retinal ganglion cells through a protein kinase C-dependent pathway. *J Neurosci Res*, v60, n3, pp. 291-301; 2000.

DOETSCH F., GARCÍA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *PNAS*, v93, n25, pp.14895-14900; 1996.

DOETSCH F., GARCÍA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, v17, n13, pp. 5046-5061; 1997.

DOETSCH F., CAILLE I., LIM D.A., GARCIA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* v97, n6, pp.703-716; 1999.

DOETSCH F., SCHARFF, C. Changes for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav Evol*, v58, n5, pp. 306-322; 2001.

DOETSCH F., PETREANU L., CAILLE I., GARCÍA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, v36, n6, pp.1021-1034; 2002.

DOETSCH F., GARCÍA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, v36, n6, pp.1021-1034; 2002.

DOETSCH F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*, v6, n11, pp.1127- 1134; 2003.

DZIADEK M., TIMPL R. Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev Biol*, v111, n2, pp.372-382; 1985.

EL MAAROUF A, PETRIDIS AK, RUTISHAUSER U. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *PNAS*, v103, n45, pp. 16989-16994; 2006.

EMSLEY J.G., HAGG T. Alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol*, v183, n2, pp. 273-285; 2003.

ENGEL J., ODERMATT E., ENGEL A., MADRI J.A., FURTHMAYR H., ROHDE H., TIMPL R. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol*, v150, n1, pp.97-120; 1981.

FAISSNER A, STEINDLER D. Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia*, v13, n4, pp. 233-254; 1995.

FLANAGAN L.A., REBAZA L.M., DERZIC S., SCHWARTZ P.H., MONUKI E.S. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *J Neurosci Res*, v83, n5, pp. 845-856; 2006.

FREIRE E, COELHO-SAMPAIO T. Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *J Biol Chem*, v275, n2, pp.817-822, 2000.

FREIRE E., GOMES F.C., LINDEN R., NETO V.M., COELHO-SAMPAIO T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J Cell Sci*, v115, n24, pp.4867-4876; 2002.

FREIRE E., GOMES F.C., JOTHA-MATTOS T., NETO V.M., SILVA FILHO F.C., COELHO-SAMPAIO T. Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. *J Cell Sci*, v117, n18, pp.4067-4076.; 2004.

FUESHKO S., WRAY S. LHRH cells migrate on peripherin fibers in embryonic olfactory explant cultures: an in vitro model for neurophilic neuronal migration. *Dev Biol*, v166, n1, pp. 331-348; 1994.

GOETZ AK, SCHEFFLER B, CHEN HX, WANG S, SUSLOV O, XIANG H, BRÜSTLE O, ROPER SN, STEINDLER DA. Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *PNAS*, v103, n29, pp. 11063-8; 2006.

GRITTI A., BONFANTI L., DOETSCH F., CAILLE I., ALVAREZ-BUYLLA A., LIM D.A., GALLI R., VERDUGO J.M., HERRERA D.G., VESCOVI A.L. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci*, v22, n2, pp.437-445; 2002.

GROSS, C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*, v1, n1, pp.67-83; 2000.

HACK I., BANCILA M., LOULIER K., CARROLL P., CREMER H. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci.* v5, n10, pp.939-945; 2002.

HALLMANN R., HORN N., SELG M., WENDLER O., PAUSCH F., SOROKIN L.M. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*, v85, n3, pp.979-1000; 2005.

HERRERA, D.G., GARCIA-VERDUGO, J.M., ALVAREZ-BUYLLA, A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions of the brain. *Ann Neurol*, v46, n6, pp.867-877; 1999.

HU H., RUTISHAUSER U. A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron*, v16, n5, pp. 933-940; 1996.

HYNES R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v110, n6, pp.673-687; 2002.

JACQUES T.S., RELVAS J.B., NISHIMURA S., PYTELA R., EDWARDS G.M., STREULI C.H., FFRENCH-CONSTANT C. Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins.v125, n16, pp. 3167-3177;1998.

JANKOVSKI A., GARCIA C., SORIANO E., SOTELO C. Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, v10, n12, pp.3853-3868; 1998.

KALB E., ENGEL J. Binding and calcium-induced aggregation of laminin onto lipid bilayers. *J Biol Chem*, v266, n28, pp.19047-19052; 1991.

KAWAGUCHI A., MIYATA T., SAWAMOTO K., TAKASHITA N., MURAYAMA A., AKAMATSU W., OGAWA M., OKABE M., TANO Y., GOLDMAN S.A., OKANO H.

Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci*, v17, n2, pp. 250-273; 2001.

KEARNS S.M., LAYWELL E.D., KUKEROV V.K., STEINDLER D.A. Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Exp Neurol*. v182, n1, pp.240-244; 2003.

KEVERNE EB. Olfactory learning. *Curr Opin Neurobiol*, v5, n4, pp.482-488; 1995.

KIRSCHENBAUM B, DOETSCH F, LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci*, v19, n6, pp. 2171-2180; 1999.

KISHI K. Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *J Comp Neurol*, v258, n1, pp. 112-124; 1987.

KISHI K., PENG J.Y., KAKUTA S., MURAKAMI K., KURODA M., YOKOTA S., HAYAKAWA S., KUGE T., ASAYAMA T. Migration of bipolar subependymal cells, precursors of the granule cells of the rat olfactory bulb, with reference to the arrangement of the radial glial fibers. *Arch Histol Cytol*, v53, n2, pp. 219–226; 1999.

KLEINMAN H.K., WEEKS B.S., SCHNAPER H.W., KIBBEY M.C., YAMAMURA K., GRANT D.S. The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases. *Vitam Horm*, v47, pp.161-186; 1993.

KORNACK DR, RAKIC P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *PNAS*, V98, N8, pp. 4752-457; 2001.

LAW AK., PENCEA V., BUCK C.R., LUSKIN M.B. Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes. *Dev Biol.* v16, n2, pp. 622-634; 1999.

LI S., YURCHENCO P.D. Matrix assembly, cell polarization, and cell survival: analysis of peri-implantation development with cultured embryonic stem cells.. *Methods Mol Biol*, v329, pp.113-125; 2006.

LIANG S., CRUTCHER K.A. Neuronal migration on laminin in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, v66, n1, pp,127-132; 1992.

LI S., EDGAR D., FÄSSLER R., WADSWORTH W, YURCHENCO PD.**The Role of Laminin in Embryonic** cell polarization and tissue organization. *Dev Cell*, v4, n5, pp. 613-624; 2003.

LIM D.A., FISHELL G.J., ALVAREZ-BUYLLA, A. Postnatal mouse subventricular zone neuronal precursors can migrate and differentiate within multiple levels of the developong neuraxis. *PNAS*, v94, pp. 14832-14836; 1997.

LIM D.A., ALVAREZ-BUYLLA A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *PNAS*, v96, n13, pp.7526-7531; 1999.

LIU G., RAO Y. Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *J Neurosci*, v23, n16, pp.6651-6659; 2003.

LOERS G, SCHACHNER M, Recognition molecules and neural repair. *J Neurochem*, v101, n4, 865-872; 2007).

LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *PNAS*, v90, n5, pp.2074-2077; 1993.

LUSKIN M.B., Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, v11, n 1, pp. 173-189; 1993.

MCDERMOTT K.W., LANTOS P.L. Distribution and fine structural analysis of undifferentiated cells in the primate subependymal layer. *J Anat*, v178, pp.45-63; 1991.

MCKEE K.K., HARRISON D., CAPIZZI S., YURCHENCO P.D. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem*, v282, n29, pp.21437-21447;2007

MINER J.H., YURCHENCO P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v20, pp.255-84; 2004.

MINER JH, PATTON BL, LENTZ SI, GILBERT DJ, SNIDER WD, JENKINS NA, COPELAND NG, SANES JR. The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol*, v137, n3, pp. 685-701; 1997.

MITSUHASHI Y, HASHIMOTO I. Genetic abnormalities and clinical classification of epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol Res*, v295, n1, pp.29-33; 2003.

MORSHEAD C., VAN DER KOOY D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* , v12, n 1, pp.249-256; 1992.

MORSHEAD C.M., REYNOLDS B.A., CRAIG C.G., MCBURNEY M.W., STAINES W.A., MORASSUTTI D., WEISS S., VAN DER KOOY D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, v13, n5, pp. 1071-1082; 1994.

MORSHEAD C.M., CRAIG C.G., VAN DER KOOY D. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development*, v125, n12, pp.2251-2261; 1998.

MURASE S., HORWITZ A.F. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci*. v22, n9, pp.3568-3579; 2002.

NGUYEN-BA-CHARVET KT, PICARD-RIERA N, TESSIER-LAVIGNE M, BARON-VAN EVERCOOREN A, SOTELO C, CHÉDOTAL A. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci*, v24, n6, pp.1497-1506; 2004.

NISSINEN M., VUOLTEENAHO R., BOOT-HANDFORD R., KALLUNKI P., TRYGGVASON K. Primary structure of the human laminin A chain. Limited expression in human tissues. *Biochem J*. v276, n2, pp.369-379; 1991.

NOTTEBOHM, F. Neuronal Replacement in adult brain. *Brain Res Bull*, v57, n6, pp.737-749; 2002.

ONO K., TOMASIEWICZ H., MAGNUSON T., RUTISHAUSER U. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron*, v13, n3, pp.595-609; 1994.

PALMER TD, TAKAHASHI J, GAGE FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, v8, n6, pp. 389-404; 1997.

PATARROYO M., TRYGGVASON K., VIRTANEN I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* v12, n13, pp.:197–207; 2002.

PINDZOLLA R.R., DOLLER C., SILVER J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol*, v156, n1, pp. 34-48; 1993.

POTTEN C.S. & LOEFFLER M. Stem cell: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, v110, n4, pp.1001-1020; 1990.

POWELL E.M., MEINERS S., DIPROSPERO N.A., GELLER H.M. Mechanisms of astrocyte-directed neurite guidance. *Cell Tissue Res*, v290, n2, pp. 385-393; 1997.

PRIVAT A. & LEBLOND C.P. The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J Comp Neurol*, v146, n3, pp.277-302; 1972.

RAKIC, P. Principles of neural cell migration. *Experientia*, v46, n9, pp.882-891; 1990.

RAMÍREZ-CASTILLEJO C, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ F, ANDREU-AGULLÓ C, FERRÓN SR, AROCA-AGUILAR JD, SÁNCHEZ P, MIRA H, ESCRIBANO J, FARIÑAS I. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*, v9, n3, pp. 331-339; 2006.

RAPAPPORT, D. H. AND STONE, J. The area centralis of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. *Neuroscience*, v11, n2, pp.289-301; 1984.

RAY J., RAYMON H.K., GAGE F.H. Generation and culturing of precursor cells and neuroblasts from embryonic and adult central nervous system. *Methods Enzymol*, v254, pp. 20-37; 1995.

REYNOLDS B.A. & WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* v255, n5052, pp. 1707-1710; 1992.

REYNOLDS B.A., TETZLAFF W., WEISS S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, v12, n11, pp. 4565-4574; 1992.

RUTISHAUSER U, LANDMESSER L. Polysialic acid on the surface of axons regulates patterns of normal and activity-dependent innervation. *Trends Neurosci*, v14, n12, pp.528-532; 1991.

SAGA Y., YAGI T., IKAWA Y., SAKAKURA T., AIZAWA S. Mice develop normally without tenascin. *Gene Dev*, v6, n10, pp.1821-1831; 1992.

SALMIVIRTA K, SOROKIN LM, EKBLOM P. Differential expression of laminin alpha chains during murine tooth development. *Dev Dyn*, v210, n3, pp.206-215; 1997.

SANAL N., TRAMONTIN A.D., QUIÑONES-HINOJOSA A., BARBARO N.M., GUPTA N., KUNWAR S., LAWTON M.T., MCDERMOT M.W., PARSA A.T., GARCÍA-VERDUGO J.M., BERGER M.S., ALVAREZ-BUYLLA A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744; 2004.

SAWAMOTO K., WICHTERLE H., GONZALEZ-PEREZ O., CHOLFIN J.A., YAMADA M., SPASSKY N., MURCIA N.S., GARCIA-VERDUGO J.M., MARIN O., RUBENSTEIN J.L., TESSIER-LAVIGNE M., OKANO H., ALVAREZ-BUYLLA A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, v311, n5761, pp.629-632; 2003.

SCHÉELE S., NYSTRÖM A., DURBEEJ.M., TALTS J.F., EKBLÖM M., EKBLÖM P. Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med*, v85, n8, pp.825-836; 2007.

SCHUGER L., SKUBITZ A.P., ZHANG J., SOROKIN L., HE L. Laminin alpha1 chain synthesis in the mouse developing lung: requirement for epithelial-mesenchymal contact and possible role in bronchial smooth muscle development. *J Cell Biol*, v139, n2, pp.553-562; 1997.

SEABERG R.M., VAN DER KOOY D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*, v22, n5, pp. 1784-1793; 2002.

SEABERG R.M., VAN DER KOOY D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*, v26, n3, pp.125-131; 2003.

SERI B, GARCÍA-VERDUGO JM, MCEWEN BS, ALVAREZ-BUYLLA A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, v18, n18, pp. 7153-7160; 2001.

SHEN Q., GODERIE S.K., JIN L., KARANTH N., SUN Y., ABRAMOVA N., VINCENT P., PUMIGLIA K., TEMPLE S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, v304, n5675, pp.1338-1340; 2004.

SMART, I. The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J Comp Neurol*, v116, n3, pp. 325-347; 1961.

SOROKIN LM, PAUSCH F, DURBEEJ M, EKBLÖM P. Differential expression of five laminin alpha (1-5) chains in developing and adult mouse kidney. *Dev Dyn*, v210, n4, pp.446-462; 1997.

SVENDSEN C.N., TER BORG M.G., ARMSTRONG R.J., ROSSER A.E., CHANDRAN S., OSTENFELD T., CALDWELL M.A. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods*, v85, n2, pp. 141-152; 1998.

SUSLOV O.N., KUKEKOV V.G., IGNATOVA T.N., STEINDLER D.A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *PNAS*, v99, n22, pp. 14506-11; 2002.

TALTS J.F., SASAKI T., MIOSGE N., GÖHRING W., MANN K., MAYNE R., TIMPL R. Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha4 chain and its proteolytic processing in tissues. *J Biol Chem*, v275, n45, pp. 35192-35199; 2000.

TAUPIN P. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C R Biol.* V329, n7, pp.465-475; 2006.

TIMPL R, BROWN JC. The laminins. *Matrix Biol.* v14, n4, pp.275-281; 1994.

TOMASIEWICZ H., ONO K., YEE D., THOMPSON C., GORIDIS C., RUTISHAUSER U., MAGNUSON T. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron*, v11, n6, pp.1163–1174; 1993.

TURNEY S.G., BRIDGMAN P.C. Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity. *Nat Neurosci*, v8, n6, pp. 717-719; 2005.

UITTO J., RICHARD G. Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, v15, n1, pp:61-74; 2004.

YUASA K., FUKUMOTO S., KAMASAKI Y., YAMADA A., FUKUMOTO E., KANAOKA K., SAITO K., HARADA H., ARIKAWA-HIRASAWA E., MIYAGOE-

SUZUKI Y., TAKEDA S., OKAMOTO K., KATO Y., FUJIWARA T. Laminin alpha2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *J Biol Chem*, v279, n11, pp.10286-10292; 2004.

YURCHENCO P.D, TSILIBARY E.C., CHARONIS A.S., FURTHMAYR H. Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J Biol Chem*, v260, n12, pp.7636-7644; 1985.

YURCHENCO P.D., SCHITTNY J.C. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. v4, n6, pp.1577-1590; 1990.

YURCHENCO PD, CHENG YS, COLOGNATO H. Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol* , v117, n5, pp.1119-1133; 1992.

YURCHENCO PD, CHENG YS. Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J Biol Chem*, 268v, n23, pp.17286-17299; 1993.

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](#)