



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

SHEILA CRISTINA DE SOUZA MARTINS

# EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SINEMINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR DO SISTEMA NERVOSO

RIO DE JANEIRO  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

SHEILA CRISTINA DE SOUZA MARTINS

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SINEMINA DURANTE A  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR DO SISTEMA NERVOSO

Tese de Doutorado apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em Ciências  
Morfológicas da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos

Orientador: Vivaldo Moura Neto  
Laboratório de Morfogênese Celular -  
Programa de Biologia Celular e do  
Desenvolvimento - Instituto de Ciências  
Biomédicas - Universidade Federal do Rio de  
Janeiro

RIO DE JANEIRO  
2008

Martins, Sheila Cristina de Souza

Expressão da proteína sinemina durante a diferenciação celular do sistema nervoso / Sheila Cristina de Souza Martins. – Rio de Janeiro: UFRJ / ICB, 2008.

xvi, 126 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Vivaldo Moura Neto

Tese (doutorado) – UFRJ/ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2008.

Referências bibliográficas: f. 106-114

1. Proteínas citoesqueleto. 2. Células-tronco embrionárias. 3. Sistema nervoso central - citologia. 4. Neoplasias encefálicas. 5. Marcadores biológicos. 6. Hormônios tireóideos. 7. Diferenciação celular. 8. Humanos. 9. Animais. 10. Biologia Celular – Tese. I. Moura Neto, Vivaldo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

“Expressão da proteína sinemina durante a diferenciação celular do sistema nervoso”

Sheila Cristina de Souza Martins

Rio de Janeiro, 04 de dezembro de 2008

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Presidente da Banca:

---

Prof. Vivaldo Moura Neto

Professor Titular, Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, UFRJ, RJ

---

Dra. Flávia Alcântara Gomes

Professora Associada I, Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, UFRJ, RJ

---

Dr. Marcelo Einicker Lamas

Professor Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, RJ

---

Dr. Jackson C. Bittencourt

Professor Titular, Departamento de Anatomia ICB/USP, SP

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Professor Vivaldo Moura Neto, no Laboratório de Morfogênese Celular, do Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento - Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ; Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular, do Programa de Neurociência Básica e Clínica - Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ; Laboratoire de Génétique et Physiologie des Tissus Musculaires - UMR 7079 CNRS - UPMC Univ. Paris 6, Paris, França. Contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior da CAPES (PDEE/CAPES), Programme des Actions en Régions de Coopération Universitaire et Scientifique (ARCUS) e Programa dos Núcleos de Excelência (PRONEX).

*“A neve e as tempestades matam as flores,  
mas nada podem contra as sementes”*

*(Khalil Gibran)*

*Em memória de Tia Lena*

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, como de costume!

Ao Vivaldo, pela humildade em me deixar beber de sua fonte de sabedoria e, sobretudo, por ser um grande amigo nas horas difíceis e sempre. Exemplo científico e de caráter. Minha eterna gratidão!!

À minha família, sobretudo minhas mãe e irmã, pelo amor, dedicação e suporte. Obrigada pelas “velas e âncoras”. “Navegar é preciso!”

À galera do lab. Os que estão aqui e os que já estiveram. Jane, pelos fins de semana no lab que nos renderam um paper em colaboração. Anna, pela grande ajuda com a análise de incorporação de timidina, culturas de astrócitos e microglia; junto da Flávia sempre tão solícita. Bruno, com os TNTs e computadores sempre dando trabalho. Ainda Lú, Rose, Giselle, Gustavo, Natan, TT, Milena, Helena, Aninha, Rô, Dona Luiza, Rachele, Sú, Débora, Archi, Evaldo,... Amigos queridos essenciais à minha formação, trabalhando-brincando. É sempre um prazer estar em casa com vocês. Valeu por tudo!

Ao Bitty, Bruna e LandIC, pela colaboração frutífera que nos fez trabalhar sábado de Carnaval. Nunca vou esquecer as porpurinas *in vitro*. He! He! He! Obrigada pela troca de idéias e amizade.

À mes labos et amis en France. Mme Paulin, Zhenlin, Jean-Christophe, Claudio, Eva, Adrien, les 2 Guillaumes, Zhigang, Mathias, Alex, Alex, et Alex (He! He! He!), Jocelyne, Nico, Nadine, Catherine, Jean-Marc, Lívia, Rheda,..., pour l'aide inconditionnelle et amitié. Merci beaucoup.



“Si on me presse de dire pourquoi, je les aimais, je sens que cela ne peut s'exprimer qu'en répondant: <<Parce que c'étaient eux, parce que c'était moi.>>”

Ao Jean Cristophe, pela excelente e rápida revisão.

Aos amigos-vizinhos do departamento, andar de cima, de baixo e dos arredores. Garcia, Flávia, Tônia, Bete, Didi, Taninha, Rômulo, Fernando, Alines e Anas, Maricotinha, Alê, Leandros, Sandra, Madalena, Renato e Dani, Marcelo, Chico, Cícero, Lena, Roberto, Maira, João, Silvania, Cristina, Dudu, Carlinha, Marcos e Fábio, ... Todos sem exceção. Muitíssimo obrigada pelo apoio e carinho!

Aos meus amigos de longas caminhadas. Cada passo foi verdadeiramente imprescindível nesta jornada. Não seria possível sem a colaboração de vocês. “andorinha sozinha não faz verão.”

## RESUMO

MARTINS, Sheila Cristina de Souza. **Expressão da proteína sinemina durante a diferenciação do sistema nervoso**. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Sineminas são componentes da família de filamentos intermediários. Suas três isoformas, de 41 (L), 150 (M) e 180 kDa (H), possuem expressão temporalmente regulada durante o desenvolvimento do sistema nervoso (SN) via processamento alternativo de RNA mensageiro. Sinemina L é expressa em neurônios pós-mitóticos, enquanto a sinemina H/M é encontrada em neurônios do SN periférico, células gliais e tumores gliais humanos. Neste trabalho investigamos o desenvolvimento biológico através da expressão de sinemina durante a diferenciação celular e sua regulação por hormônio tireoideano (T3), utilizando para tal três protocolos experimentais: cultivo de células neurais **(1)** e glioblastoma humano tratado com T3 **(2)**, e cultivo e diferenciação neural de células-tronco embrionárias murinas (CTEs) **(3)**. Em astrócitos corticais, células microglias, células endoteliais e CTEs, as sineminas H e/ou M são distribuídas por toda célula, sendo encontradas ainda nos nanotubos (TNTs) que medeiam a interconexão celular. A expressão de sinemina H/M persiste nos gliomas humanos, ependimomas e glioblastomas. Neste último, observamos que T3 aumenta a expressão de sinemina H e M em 3 e 2,5 vezes, respectivamente. Enquanto diferentes variantes isoelétricas de sinemina M são expressas precocemente em CTEs pluripotentes, antes mesmo da nestina e persistem após a diferenciação neural, a sinemina H é induzida apenas nos primeiros estágios da diferenciação neural destas células. Assim, a sinemina H/M serve como sinalizadora do estágio de desenvolvimento, sob controle de T3.

## ABSTRACT

MARTINS, Sheila Cristina de Souza. **Expressão da proteína sinemina durante a diferenciação do sistema nervoso**. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Synemins are components of intermediate filaments family. Their three isoforms, of 41 (L), 150 (M) and 180 kDa (H) respectively, are temporally regulated during the development of the nervous system (NS) through alternative splicing of their mRNA. L synemin is expressed in postmitotic neurons, while H/M synemin is present in peripheral neurons, glial cells and human gliomas. We investigated biological development through monitoring of synemin expression during cell differentiation, and its regulation by thyroid hormone (T3), using for this purpose three experimental protocols: culture of neural **(1)** and human glioblastoma T3-treated cells **(2)** and culture and neural differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells **(3)**. In cortical astrocytes, microglia, endothelial and ES cells, synemin (H and/or M) is distributed throughout the cell. Moreover, it is found in tunneling nanotubes which interconnect the cells. H/M synemin expression persists in human gliomas, ependymomas and glioblastomas. In the later, we observed a 3 and 2,5 folds increase in H and M synemin, respectively, after T3-treatment. Different isoelectric variants of M synemin are expressed early in pluripotent ES cells, prior to nestin expression, and persist after neural differentiation. On the other hand, H synemin is only expressed during the first stages of the neural differentiation of ES cells. Thus, H/M synemin acts as an indicator of development stage, under T3 control.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AKAP:** proteína de ancoragem de proteína cinase A, do inglês *A-kinase anchoring protein*
- AR:** ácido retinóico
- bFGF:** fator de crescimento básico de fibroblasto, do inglês *basic fibroblast growth factor*
- BLBP:** proteína de ligação a lipídio de encéfalo, do inglês *brain lipid binding protein*
- BMP:** proteína morfogenética de osso, do inglês *bone morphogenetic protein*
- CD133:** grupamento de diferenciação/designação 133, do inglês *clusters of differentiation* ou *designation*
- CNPase:** proteína de mielina 2',3'- nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase
- CTEs:** células-tronco embrionárias
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DNET:** tumor neuroepitelial dysembrioplástico, do inglês *desembryoplastic neuroepithelial tumor*
- E15,5:** estágio de 15,5 dias embrionários
- EB:** corpo embrióide, do inglês *embryoid bodies*
- EGF:** fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor*
- FGF-2:** fator de crescimento de fibroblasto-2, do inglês *fibroblast growth factor-2*
- FI:** filamento intermediário
- Gbm:** glioblastoma
- GFAP:** proteína acídica fibrilar glial, do inglês *glial fibrillary acidic protein*
- GLAST:** transportador de glutamato específico de astrócito, do inglês *astrocyte-specific glutamate transporter*
- HT:** hormônio tireoideano
- HUVEC:** células endoteliais primárias humanas, do inglês *human umbilical vein endothelial cells*
- IL-6:** interleucina-6
- LIF:** fator inibitório de leucemia, do inglês *leukemia inhibitory factor*

<b>MCI:</b>	Massa celular interna
<b>MEF:</b>	fibroblastos embrionários murinos, do inglês <i>mouse embryonic fibroblast</i>
<b>MOG:</b>	glicoproteína da mielina de oligodendrócitos, do inglês <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
<b>NF:</b>	neurofilamento
<b>Ng1</b>	Neurogenesteína1
<b>SGZ:</b>	zona subgranular, do inglês <i>subgranular zone</i>
<b>SN:</b>	sistema nervoso
<b>SNC:</b>	sistema nervoso central
<b>SNP:</b>	sistema nervoso periférico
<b>SVZ:</b>	zona subventricular, do inglês <i>subventricular zone</i>
<b>TGF-<math>\alpha</math>:</b>	fator de crescimento transformante- $\alpha$ , do inglês <i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	fator de crescimento transformante- $\beta$ ; do inglês <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
<b>TGNM:</b>	tumor glio-neuronal maligno
<b>TNT:</b>	nanotubos, do inglês <i>tunneling nanotubes</i>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da teoria de células-tronco oncogênicas.
- Figura 2:** Esquema da teoria de desdiferenciação.
- Figura 3:** Diagrama esquemático mostrando as sinemina H, M e L de camundongo.
- Figura 4:** Distribuição de sinemina H/M em embrião de camundongo E15,5.
- Figura 5:** Esquema temporal representativo dos ensaios de proliferação.
- Figura 6:** Caracterização da distribuição de sinemina H/M no SNC.
- Figura 7:** Análise da expressão gênica das isoformas de sinemina e dos marcadores de diferenciação neural em astrócitos.
- Figura 8:** Análise da expressão gênica das isoformas de sinemina e dos marcadores de diferenciação neural em células de Schwann.
- Figura 9:** Distribuição de sinemina H/M no SNC.
- Figura 10:** Distribuição de sinemina H/M em células endoteliais.
- Figura 11:** Presença de sinemina H/M em TNT de astrócitos corticais.
- Figura 12:** Presença de sinemina H/M e vimentina em astrócitos corticais.
- Figura 13:** Análise da distribuição de sinemina H/M em tumores do SN humano.
- Figura 14:** Caracterização *in vitro* de sinemina em gliomas.
- Figura 15:** Análise morfológica de glioblastoma humano tratado com T3.
- Figura 16:** Análise da distribuição de sinemina H/M em glioblastoma humano após tratamento com T3.
- Figura 17:** Análise da síntese de sinemina H e M por T3 em glioblastoma humano.
- Figura 18:** Efeito do hormônio tireoideano sobre a distribuição de vimentina em glioblastoma humano.
- Figura 19:** Efeito de T3 sobre o ciclo celular do glioblastoma humano.
- Figura 20:** Efeito de T3 sobre a proliferação de glioblastoma humano.
- Figura 21:** Análise da expressão gênica de sinemina H e M em CTEs murinas.
- Figura 22:** Análise da expressão gênica de nestina em CTEs murinas.
- Figura 23:** Análise da distribuição de Oct-4 em CTEs murinas.
- Figura 24:** Análise da distribuição de sinemina H e M em CTEs murinas.

- Figura 25:** Análise da distribuição de sinemina H/M em colônia de ES-USP.
- Figura 26:** Análise da distribuição de sinemina H e M durante a diferenciação neural de CTEs murinas.
- Figura 27:** Caracterização da distribuição de sinemina H e M após indução neural de CTEs murinas por AR.
- Figura 28:** Caracterização da distribuição de marcadores neurais após indução neural de CTEs murinas por AR.
- Figura 29:** Análise da imunoreatividade dos marcadores neurais durante a diferenciação neural de CTEs murinas.
- Figura 30:** Caracterização da distribuição de sinemina H/M após indução da diferenciação neuronal terminal.
- Figura 31:** Perfil eletroforético da sinemina M presente em CTEs murinas em gel bidimensional.
- Figura 32:** Modelo hipotético da distribuição seqüencial das isoformas de sinemina durante a diferenciação neural.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Lista dos marcadores de diferenciação neural.

**Tabela 2:** Classificações dos gliomas baseadas na OMS e em Sainte-Anne/Mayo.

**Tabela 3:** Distribuição das sinemina H /M e L no sistema nervoso

**Tabela 4:** Descrição do ponto isoelétrico e peso molecular teóricos da sinemina H e M de camundongos.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>p.17</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	p.17
1.2. AS CÉLULAS NEURAIS.....	p.18
1.3. CÉLULAS-TRONCO.....	p.20
<b>1.3.1. Diferenciação neural a partir de células-tronco embrionárias.....</b>	<b>p.22</b>
1.4. GLIOMAS.....	p.25
1.5. O CITOESQUELETO.....	p.29
1.6. A SINEMINA.....	p.33
<b>1.6.1. Expressão de Sinemina e diferenciação celular.....</b>	<b>p.36</b>
1.7. OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS.....	p.38
<b>1.7.1. Os Astrócitos e hormônio tireoideano.....</b>	<b>p.39</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>p.42</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>p.43</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	p.43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	p.43
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>p.44</b>
4.1. ANIMAIS.....	p.44
4.2. CULTIVO CELULAR.....	p.44
<b>4.2.1. Cultura de neurônios, astrócitos e células da microglia.....</b>	<b>p.44</b>
<b>4.2.2. Cultivo de linhagens celulares.....</b>	<b>p.46</b>
<b>4.2.3. Cultura de células endoteliais humanas.....</b>	<b>p.47</b>
<b>4.2.4. Cultivo de células-tronco embrionárias e diferenciação neural.....</b>	<b>p.47</b>
4.3. TRATAMENTO DAS CÉLULAS GBM02 EM CULTURA COM HORMÔNIO TIREOIDEANO, T3.....	p.49
4.4. ENSAIOS DE INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA.....	p.49
4.5. ANÁLISE DO CITOESQUELETO NEURAL.....	p.50
<b>4.5.1. Imunomarcção <i>in toto</i>.....</b>	<b>p.50</b>

4.5.2. Imunocitoquímica.....	p.51
4.5.3. Imunocitoquímica dos corpos embrióides, EBs.....	p.52
4.5.4. Imunohistoquímica.....	p.53
4.6. MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E WESTERN BLOT.....	p.54
4.6.1. Preparo do extrato total de proteínas das células mantidas em cultura.....	p.54
4.6.2. Eletroforese bidimensional (isoeletrofocalização, IEF).....	p.54
4.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	p.56
4.6.4. Transferência de proteínas.....	p.56
4.6.5. Revelação imunológica.....	p.57
4.7. ANÁLISE POR RT-PCR.....	p.58
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	p.59
<b>5. RESULTADOS.....</b>	p.60
5.1. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA NO SISTEMA NERVOSO.....	p.60
5.2. PRESENÇA DE SINEMINA EM TUMORES NEURAIS.....	p.68
5.3. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE SINEMINA H E M PELO HORMÔNIO TIREOIDEANO, T3, EM GLIOBLASTOMA HUMANO.....	p.72
5.4. PRESENÇA DE SINEMINA M EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS.....	p.78
5.5. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS.....	p.83
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	p.90
6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	p.90
6.2. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA NO SISTEMA NERVOSO.....	p.90
6.3. PRESENÇA DE SINEMINA EM TUMORES NEURAIS.....	p.93
6.4. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE SINEMINA H E M PELO	

HORMÔNIO TIREOIDEANO, T3, EM GLIOBLASTOMA HUMANO.....	p.95
6.5. PRESENÇA DE SINEMINA M EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS.....	p.98
6.6. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS.....	p.100
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>p.105</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>p.106</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>p.115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento dos seres vivos, em geral, se reflete através da expressão sucessiva de proteínas marcadoras precoces de diferenciação, seguidas pela expressão de marcadores tardios. Proteínas de citoesqueleto, como as de filamentos intermediários (FI) são marcadores precoces de diferenciação, particularmente a nestina e, um pouco mais tardiamente, a vimentina ou as citoqueratinas. Uma isoforma de tubulina, a isoforma III, conhecida como  $\beta$ -tubulina III, também é uma marcadora de estágios precoces da diferenciação neuronal. Nesta tese, Sinemina, uma nova proteína de filamentos intermediários, é apresentada em um conjunto de experimentos apontando, eventualmente, para seu papel como um marcador precoce da diferenciação celular.

Nosso laboratório vem ao longo dos últimos anos demonstrando que o desenvolvimento biológico, compreendido pela proliferação, diferenciação e maturação das células do sistema nervoso (neurônio e glia) é regulado pelo hormônio tireoideano, triiodotironina (T3). T3 também mantém a capacidade de regular a atividade biológica da glia tumoral, os gliomas.

O efeito de T3 no desenvolvimento biológico pode, então, ser refletido via modulação da distribuição das proteínas de proliferação ou diferenciação, aquelas de definição topográfica de órgãos ou sistemas, implicadas diretamente no desenvolvimento, como nestina e vimentina, por exemplo.

Neste trabalho estudamos estes dois processos em etapas do desenvolvimento: a diferenciação celular neural como um modelo da

progressão do desenvolvimento biológico através de um marcador que sugerimos ser precoce, a sinemina; e a sua regulação por T3. Para tal, investigamos a expressão de sinemina durante a diferenciação neural a partir de células-tronco embrionárias murinas e em glioma humano exposto ao T3.

Para melhor compreensão deste trabalho serão abordados nesta introdução: o hormônio da tireóide que regula o desenvolvimento do sistema nervoso; as células neurais e células-tronco que o constituem; os gliomas humanos que também podem ser gerados pelas células-tronco; além das proteínas do seu citoesqueleto e, mais especificamente, a própria sinemina.

## 1.2. AS CÉLULAS NEURAIIS

Neurônios e células da família glial são os constituintes unitários básicos do sistema nervoso (SN). Enquanto neurônios podem atuar principalmente na transmissão de informações a outras células nervosas e musculares, via liberação de moléculas de neurotransmissores, as células da família glial têm, além das funções comuns de interação entre si e com neurônios, funções particulares a cada um de seus tipos gliais.

As células gliais constituem a maior população celular do SN. De maneira simplificada, elas podem ser divididas em macroglia, que compreende os endotélio, oligodendrócitos, glia radial e astrócitos, e microglia.

A microglia corresponde aos macrófagos cerebrais que invadem o SN na vida embrionária, tornam-se residentes e são recrutados pelo SN durante respostas a processos agressivos ou inflamatórios (Kim & De Vellis, 2005;

Mallat *et al.*, 2002). Diferentemente da maioria das células macrogliais, a microglia têm origem mesodérmica, a partir de monócitos (Vilhardt, 2005).

Os endotélioцитos são células de revestimento interno dos ventrículos encefálicos e do canal central da medula espinhal e em algumas regiões, como o terceiro ventrículo, participam da formação do plexo coróide. Ele é responsável, em conjunto com as células epitelióides do plexo, pela produção de líquido (Bruni, 1998).

Os oligodendróцитos são células pequenas com poucos prolongamentos constituindo a bainha de mielina que envolve os axônios do SN central (SNC) em um processo denominado de mielinização (Doyle & Colman, 1993; Meyer-Franke *et al.*, 1999). No SNC, um oligodendrócito pode gerar a bainha de mielina que envolve vários axônios enquanto que, no SN periférico (SNP), cada célula de Schwann responsável pela formação da bainha de mielina, envolve apenas um axônio.

A glia radial é encontrada transitoriamente no SN durante o desenvolvimento de estruturas laminadas, como o neocórtex, cerebelo, medula espinhal e retina (Ramon Y Cajal, 1911). Porém, apesar de ser considerada “transitória”, ela possui representantes que persistem após o desenvolvimento, como a glia de Bergmann no cerebelo (Misson *et al.*, 1988) ou ainda a glia limitante presente no córtex cerebral (Mercier *et al.*, 2004).

A glia radial tem um papel crucial na construção do SN, onde foi inicialmente, identificada por dar suporte à migração e posicionamento neuronal nas camadas corticais (Rakic, 1971). A glia radial deve ser considerada como uma célula precursora ou progenitor neural com características gliais e potencial para gerar linhagens de células neuronais e

gliais (Anthony *et al.*, 2004; Bentivoglio & Mazzarello; 1999; Levitt & Rakic, 1980; Miyata *et al.*, 2001; Nadarajah & Parnavelas, 2001; Noctor *et al.*, 2001 e 2002; Schmechel & Rakic, 1979).

Os astrócitos, descritos inicialmente por Santiago Ramon y Cajal (1852-1934) desenvolvem um importante papel na fisiologia do SN, controlando o nível extracelular de  $K^+$  e favorecendo assim a sinalização intercelular (Haydon, 2001; Walz & Hertz, 1983). Eles também ajudam a regular a atividade sináptica, através da remoção dos neurotransmissores das zonas sinápticas após sua liberação pelos neurônios pré-sinápticos.

### 1.3. CÉLULAS-TRONCO

As células do SN, bem como as demais células do organismo, derivam das células-tronco embrionárias (CTEs). As CTEs ou células da massa celular interna (MCI) presentes no interior do blastocisto (estágio de 2,5 a 3,5 dias embrionários; E2,5-E3,5), capazes de gerar os tipos celulares dos três folhetos germinativos (ectoderma, endoderma e mesoderma) e os gametas sexuais, são classificadas como células pluripotentes (revisto por Wobus & Boheler, 2005). Células-tronco comprometidas com a geração de uma linhagem celular tecido-específica, como as células-tronco neurais que se diferenciam apenas em neurônios e células gliais, são caracterizadas como células-tronco unipotentes (Preston *et al.*, 2003). Apenas o ovo fertilizado tem a capacidade de gerar um organismo inteiro e a placenta, sendo designado então como totipotente.

Na década de 1980 foram estabelecidas as primeiras linhagens de CTEs murinas (Axelrod, 1984; Doetschman *et al.*, 1985; Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Wobus *et al.*, 1984). Estas células eram isoladas de blastocistos murinos e cultivadas sobre MEF inativada. Atualmente sabe-se que a MEF secreta o fator inibitório de leucemia (LIF), uma glicoproteína solúvel membro da família de citocina interleucina-6 (IL-6; Friel *et al.*, 2005). O LIF age via um complexo de sinalização gp130 ligado à membrana, inibindo a diferenciação das CTEs (Burdon *et al.*, 1999a; 1999b; Niwa *et al.*, 1998).

Em 1998 foi isolada a primeira CTE humana derivada de blastocisto com capacidade de auto-renovação e capacidade de se diferenciar em alguns tipos celulares (Thomson *et al.*, 1998).

A propriedade de auto-renovação e pluripotencialidade das CTEs (qualidade de célula-tronco) dependem do balanço estequiométrico entre várias moléculas sinalizadoras e o desequilíbrio em uma delas pode provocar a perda de sua identidade (capacidade de auto-renovação e/ou pluripotência).

Octâmero-4 (Oct-4), também denominado Oct 3/4, é um fator de transcrição gênica restrito às células totipotentes e pluripotentes. *In vivo*, ele estabelece a natureza pluripotente das células da MCI (Friel *et al.*, 2005) e com LIF mantém a qualidade de célula-tronco (Friel *et al.*, 2005; Wobus & Boheler, 2005).

De fato, Grinell *et al.* (2007) demonstraram que Oct-4 isoladamente é capaz de garantir a qualidade de célula-tronco. Eles observaram que a transfecção de Oct-4 em queratinócitos orquestra a expressão gênica de fatores característicos da qualidade de célula-tronco, como *Sox-2*, *Utf1*, *Rex-1* e *Nanog*.



Células-tronco também são encontradas em alguns órgãos de indivíduos adultos, onde são reconhecidas como células-tronco adultas multipotentes. Elas estão presentes em tecidos com alta taxa de regeneração, como epiderme (Pellegrini *et al.*, 2008), trato respiratório (Zhang *et al.*, 2008), gônada masculina (Richardson *et al.*, 2004), parede intestinal (van der Flier & Clever, 2008), medula ossea (Moore & Lemischka, 2006) e ligamento periodontal (Arthur *et al.*, 2008; Coura *et al.*, 2008).

No tecido neural, há evidências de neurogênese constitutiva em algumas regiões do SN adulto, incluindo substância negra (Zhao *et al.*, 2003) e hipotálamo (Kokoeva *et al.*, 2005), entre outros. Porém, apenas a zona subventricular (SVZ) presente na parede do ventrículo lateral e a zona subgranular (SGZ) do giro dentado hipocampal foram reconhecidas sem controvérsias como sítios neurogênicos no adulto (Dang & Tropepe, 2008; Doetsch, 2003; Lledo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2008; Tavazoie *et al.*, 2008; Vescovi *et al.*, 2006).

### **1.3.1. Diferenciação neural a partir de células-tronco embrionárias, CTEs**

CTEs mantidas em cultura podem diferenciar-se em linhagens específicas, de acordo com os agentes químicos utilizados. Assim, o tratamento com ácido retinóico (AR), um metabólito da vitamina A essencial para a definição do eixo ântero-posterior do SNC (Duester, 2007), deriva as CTEs para linhagem neural (Martinez-Ceballos & Gudas, 2008; Nonaka *et al.*, 2008; Wichterle & Peljto, 2008).

No núcleo, o AR liga-se aos seus receptores, o receptor de AR propriamente dito (RAR) e o receptor X retinóico (RXR), pertencentes à superfamília de receptores de hormônios tireoideano e esteróides. O RXR é capaz de formar heterodímeros com o receptor do hormônio tireoideano (Bugge *et al.*, 1992; Mangelsdorf *et al.*, 1995) e a vitamina D (Mangelsdorf *et al.*, 1995). O RAR forma dímeros com o RXR, cuja ligação ao DNA resulta na modulação da transcrição gênica (Blamer & Blomhoff, 2002), mas também pode atuar como fator de transcrição independente de ligante (Gaub *et al.* 1998; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

De fato, a adição de AR à cultura de CTEs leva à geração de uma população uniforme de progenitores neurais semelhantes à glia radial (Bibel *et al.*, 2004), além de induzir a geração de neurônios excitatórios e inibitórios a partir de CTEs murinas (Strübing *et al.*, 1995).

A indução do fenótipo neural induzido pelo tratamento das CTEs com AR pode ser observada através da regulação da expressão de diversas proteínas marcadoras de diferenciação neural, incluindo a nestina (Kumar *et al.*, 2007; Tabela 1).

A diferenciação neuronal a partir de CTEs também é regulada pelos astrócitos. De fato, o tratamento de CTEs com meio condicionado de astrócitos murinos embrionários induziu a formação de células-tronco neurais que, ainda na presença deste meio condicionado, derivaram neurônios dopaminérgicos, entre outros subtipos neuronais (Nakayama *et al.*, 2003). O tratamento destas células-tronco neurais plaqueadas sobre substrato adesivo (laminina) com fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2) e fator de crescimento epidermal (EGF) favorece a migração de neurônios a partir destas células aderidas

(Nakayama *et al.*, 2006). Porém, a remoção destes mitógenos da cultura leva à diferenciação glial (Nakayama *et al.*, 2006; Nakayama & Ivonoe, 2006). Os astrócitos também secretam Neurogenesteína1 (Ng1), um fator pró-neuronal, promovendo a diferenciação neuronal de células-tronco neurais ao antagonizar a sinalização de BMP (Ueki *et al.*, 2003). Já o co-cultivo de neurônios provenientes de células-tronco neurais humanas e astrócitos favorecem a maturação destes neurônios, que pode ser avaliada por uma maior atividade sináptica (Johnson *et al.*, 2007). CTEs murinas tratadas com meio condicionado do gânglio da raiz dorsal também diferenciam-se em neurônios (Kitazawa & Shimizu, 2005).

**Tabela 1: Lista dos marcadores de diferenciação neural**

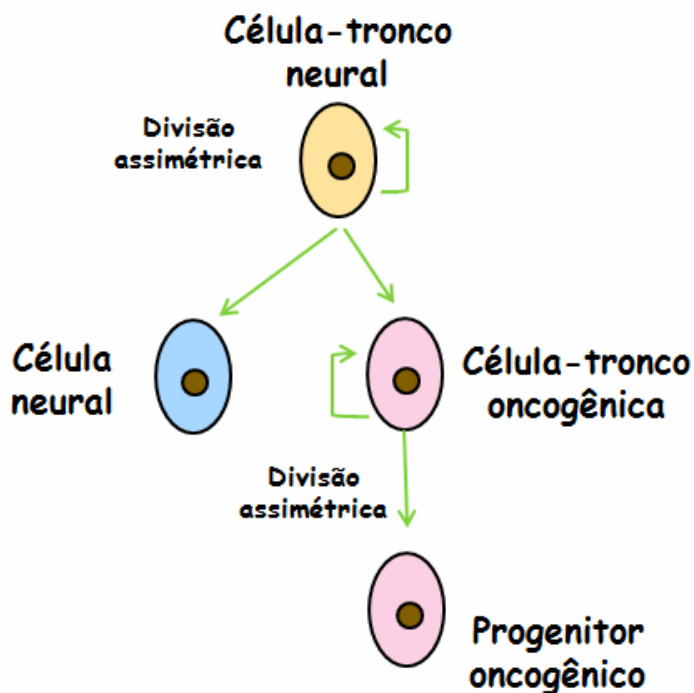
<b>Marcador de diferenciação neural</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Referências</b>
<b>BLBP, proteína de ligação a lipídio de encéfalo</b>	Progenitor neural	Feng <i>et al.</i> , 1994
<b>CNPase, proteína de mielina 2'3'-nucleotídeo 3' fosfodiesterase</b>	Oligodendrócito Célula de Schwann	Keristead & Blakemore, 1999 Toma <i>et al.</i> , 2007
<b>GFAP, proteína acídica fibrilar glial</b>	Astrócito	Lazarides <i>et al.</i> , 1982
<b>GLAST, transportador de glutamato específico de astrócito*</b>	Progenitor neural	Hartfuss <i>et al.</i> , 2001
<b>MBP, proteína básica de mielina</b>	Oligodendrócito e Célula de Schwann	Keristead & Blakemore, 1999 Simons & Troter, 2007
<b>Nestina</b>	Progenitor neural	Götz <i>et al.</i> , 2002
<b>NeuN, proteína de antígeno nuclear específica de neurônios</b>	Neurônios	Kumar & Buckmaster, 2007; Mullen <i>et al.</i> , 1992
<b>Sinemina H/M</b>	Astrócitos, células de Schwann e neurônios do SNP	Izmyrian <i>et al.</i> , 2006

<b>Sinemina L</b>	Neurônios pós-mitóticos	Izmyrian <i>et al.</i> , 2006
<b>Vimentina</b>	Progenitor neural	Götz <i>et al.</i> , 2002
<b><math>\beta</math>-Tubulina III</b>	Neurônios	Lledo <i>et al.</i> , 2006

#### 1.4. GLIOMAS

A glia tumoral ou glioma é um dos principais tumores do SNC, sendo uma importante causa de redução da capacidade mental e morte. Estes gliomas podem derivar de progenitores oncogênicos e/ou da dediferenciação glial, que são os modelos hipotéticos discutidos atualmente.

Na teoria dos progenitores oncogênicos, os gliomas são originários de células-tronco. De fato, vários tumores têm em sua população células-tronco auto-renováveis capazes de originar um câncer. Berger *et al.* (2004) formularam um modelo especulativo onde os gliomas, entre os demais tumores, teriam origem na divisão assimétrica de células-tronco neurais. A cada divisão assimétrica da célula-tronco neural, capaz de gerar neurônio ou glia, poderia ser gerada uma nova célula-tronco oncogênica (Berger *et al.*, 2004; Vescovi *et al.*, 2006). Esta permaneceria nesta zona germinal assintomática e derivaria uma célula **progenitora** oncogênica que migraria e proliferaria, dando formação ao glioma (figura 1). A célula-tronco oncogênica expressa o CD133 além da nestina (Bao *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2003; 2004).



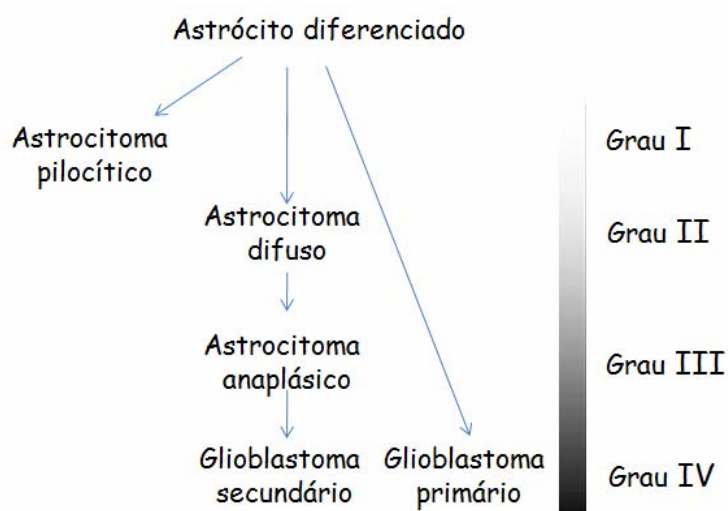
**Figura 1: Esquema da teoria de células-tronco oncogênicas.** Adaptado de Berger *et al.* (2004).

As células-tronco também podem ser encontradas em linhagens celulares e não somente nos tumores primários. Mesmo após anos em cultura, a linhagem de glioma de rato C6 possui células que podem gerar neurônios ou glia, as quais talvez estejam envolvidas com a multiplicação indefinida do C6 e sua capacidade tumorigênica observada após sua injeção em cérebro de camundongo *nude* (Kondo *et al.*, 2004). Piccirillo *et al.* (2006) identificaram uma subpopulação celular em glioblastomas com qualidade de célula-tronco, expressando CD133, nestina e  $\beta$ -tubulina III, que foi capaz de colonizar o SN e desenvolver glioblastomas após microinjeção intracraniana em ratos.

A massa tumoral é, então, mantida pelas células-tronco oncogênicas com gênese constante dos progenitores tumorais provenientes da região clinicamente silenciosa, a zona germinal. Assim, estas células progenitoras podem migrar e proliferar para sítios distantes da zona germinal. As células-

tronco oncogênicas, células progenitoras e de glioma apresentam uma predileção pelo mesmo substrato, a substância branca e membranas basais dos vasos sanguíneos, um substrato perfeito para uma transformação neoplásica (Sanai *et al.*, 2005).

Quanto ao modelo da dediferenciação, os gliomas parecem originarem-se de astrócitos saudáveis que, sob condições críticas, dediferenciam-se em gliomas de baixa malignidade, os quais vão progredindo até gliomas malignos (Kleihues *et al.*, 1995; 2002). De fato, Sharif *et al.* (2007) demonstraram *in vitro* que astrócitos maduros são capazes de se dediferenciar seqüencialmente em progenitores e células-tronco neurais após tratamento com fator de crescimento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). Os gliomas passam a apresentarem *de novo* marcadores que não são mais expressos em células maduras, como nestina (Dahlstrand *et al.*, 1992; Ikota *et al.*, 2005) e sinemina (Jing *et al.*, 2005; 2007). A presença de nestina vem mesmo sendo utilizada como um prognóstico de malignidade destes tumores, quanto maior sua presença maior a malignidade do tumor (Strojnik *et al.*, 2007). Veja a figura 2.



**Figura 2: Esquema da teoria de dediferenciação.** Progressão maligna de astrocitoma humano (do grau I ao grau IV) segundo classificação da OMS (Kleihues *et al.*, 1995). A

gradação dos tons de cinza no retângulo à direita representa a progressão da malignidade dos tumores.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os gliomas em quatro graus de malignidade de acordo com características histopatológicas (celularidade, atipia nuclear, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose; Kleihues *et al.* 1995; 2002). Veja a tabela 2.

Os tumores de grau IV, glioblastoma, são gliomas malignos e letais com grande capacidade invasiva e infiltrativa, mas não fazem metástase. Os pacientes acometidos por eles falecem entre 9 a 12 meses após o diagnóstico, respectivamente, a despeito do uso de estratégias agressivas como cirurgia, radioterapia e quimioterapia.

Dra. Catherine DAUMAS-DUPORT e sua equipe do Hôpital Sainte-Anne, desenvolveram outra classificação dos gliomas, denominada classificação Sainte-Anne/Mayo (Daumas-Duport *et al.*, 2000). Embora não reconhecido pela OMS, esta classificação vem apontando dificuldades de precisão no sistema atual de identificação dos gliomas. O diagnóstico da classificação Sainte-Anne/Mayo é baseado na análise das biópsias em associação às técnicas de imagem (ressonância magnética ou *scanner*). Dra. Daumas-Duport propõe uma reformulação da classificação de oligodendrogliomas, deixando-os em duas categorias em função da migração e de sinais do parênquima. Foi ela também quem classificou o tumor neuroepitelial disembrionário (DNET), uma entidade tumoral nova, presente sobretudo no cérebro de jovens (Daumas-Duport *et al.*, 1988). Mais recentemente a Dra. Daumas-Duport propôs uma variante de glioblastomas apresentando a presença constante de proteínas de

Neurofilamentos (NF) nas suas células, podendo co-existir, NF, em algumas delas com a presença de GFAP, sinalizando um possível potencial de células pluripotentes nestes tumores, que são denominados de tumor glioneuronal maligno (TGNM; Varlet *et al.*, 2004). Naturalmente que uma revisão da classificação de glioblastomas seria importante de refazer para quem sabe mostrar maior número de TGNM, nos grupos de gliomas.

**Tabela 2: Classificações dos gliomas baseadas na OMS e em Sainte-Anne/Mayo**

OMS	Sainte-Anne/Mayo
<p><b>Gliomas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumores astrocitários: <i>Astroцитomas graus I – IV</i></li> <li>• Tumores oligodendrogliais</li> <li>• Gliomas mistos: <i>Oligoastrocitomas</i></li> </ul> <p>Outros tumores:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumores ependimários</li> <li>• Tumores mistos: <i>ganglioglioma, gangliocitoma, DNET</i></li> </ul>	<p><b>Gliomas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligodendroglioma A ou B</li> <li>• Oligoastrocitomas A ou B</li> <li>• Glioblastomas</li> <li>• TGNM</li> </ul>

DNET: tumor neuroepitelial disembrionário; TGNM: tumor glio-neuronal maligno.

### 1.5. O CITOESQUELETO

A organização espacial e provavelmente funcional das células é assegurada pelo citoesqueleto, uma rede de filamentos protéicos comprometida com diversos mecanismos celulares como transporte de organelas, segregação de cromossomos durante a mitose, morfogênese e movimentos celulares. O citoesqueleto é constituído por três tipos de



filamentos: os filamentos de actina ou microfilamentos (~6 nm de diâmetro), os microtúbulos (~25 nm de diâmetro), ambos filamentos constituídos de proteínas globulares, enquanto que uma terceira categoria, os filamentos intermediários (~10 nm de diâmetro), é constituída de proteínas fibrosas. A actina e as tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$ , que polimerizam para formar os microtúbulos, são ubiquitárias em eucariotos (Bear *et al.*, 2001; Cooper & Schafer, 2000; Desai & Mitchison, 1997). Já os filamentos intermediários variam de acordo com o tipo celular e têm sua expressão modulada ao longo do desenvolvimento (Dahl, 1981; Galou *et al.*, 1996; Pixley & De Vellis, 1984; Sultana *et al.*, 2000). São eles que receberam maior atenção nesta tese.

**Microtúbulos:** No encéfalo, os microtúbulos (MT) apresentam uma grande heterogeneidade temporal e espacial, em parte, resultante de modificações pós-traducionais e do polimorfismo gênico. Há diversas isoformas de tubulina distribuídas diferencialmente em neurônios e células gliais (Moura Neto *et al.*, 1983; 1985). Os MT desempenham diversas funções na célula ligando-se às proteínas acessórias que regulam seu estado de polimerização, podendo mediar sua interação com outros componentes celulares. Essas proteínas, denominadas de MAPs (proteínas associadas a microtúbulos), encontram-se amplamente distribuídas no encéfalo e parecem ter papel fundamental na determinação da polaridade de precursores neuronais. As MAPs são divididas em duas classes: as proteínas de alto peso molecular (MAP1 e MAP2), e proteínas de baixo peso molecular (proteínas *Tau*). A regulação, por fosforilação das MAPs é fundamental para a dinâmica da tubulina e formação de microtúbulos nas células (Araújo *et al.*, 1994).

**Microfilamentos:** Os Microfilamentos (MF) são encontrados, em todas as células de eucariotos e abundantemente presentes no SN, tanto em astrócitos quanto em neurônios. Além de sua distribuição citoplasmática, eles se organizam na face interna da membrana celular, formando o córtex celular. Esta região tem a capacidade de emitir distensões que permitem a migração da célula sobre determinado substrato. Essa é a base dos cones de crescimento dos neurônios, estrutura extremamente móvel responsável pelo padrão de crescimento de neuritos e formação das conexões do SN (Da Silva & Dotti, 2002). Os MF também estão presentes nos nanotubos (TNTs) prolongamentos celulares envolvidos com a interconexão celular (Pontes *et al.*, 2008; Rustom *et al.*, 2004). Estes TNTs permitem a transferência seletiva de moléculas e vesículas entre as células conectadas e apesar de se estenderem por longos trajetos sobre o substrato não se ligam a ele. (Rustom *et al.*, 2004). Reconhece-se que os TNTs podem ser formados pelas protusões baseadas em actina que se estendem de uma célula à outra (Rustom *et al.*, 2004) e também através da separação de duas células inicialmente ligadas (Önfelt *et al.*, 2004)

**Filamentos intermediários:** A família dos filamentos intermediários (FI) é constituída por proteínas fibrosas extremamente resistentes que conferem estabilidade mecânica às células. As proteínas dos FI compartilham várias propriedades estruturais, incluindo um domínio bastão central em  $\alpha$ -hélice que é responsável pela formação da estrutura destes filamentos nas células. Os FIs possuem grande heterogeneidade e complexidade, sendo compostos por diferentes proteínas, na dependência do tipo celular, da fase do

desenvolvimento, e em alguns casos do estado funcional de uma célula (Fuchs & Cleveland, 1998; Herrmann & Aebi, 2000).

Os principais representantes dos FIs no SN são nestina, proteína encontrada em células imaturas de origem neuroepitelial (progenitor neural) (Hockfield & McKay, 1985); vimentina, característica de células mesenquimais, células de Schwann e glia radial (Götz *et al.*, 2002; Pixeley & De Vellis, 1984) e GFAP, encontrada em astrócitos maduros (Lazarides *et al.*, 1982). Já nos neurônios, são encontrados especificamente os três peptídeos que formam os filamentos de neurônios ou neurofilamentos, NF 60kDa, NF 160kDa e NF 200kDa (Witte & Bradke, 2008).

Durante o desenvolvimento do SNC em vertebrados, transições na distribuição das proteínas dos FIs ocorrem em neurônios e glia. As células-tronco pluripotentes apresentam nestina e, ao se diferenciarem em neurônios, passam a apresentarem os NFs que modulam o calibre axonal, sendo necessária uma co-expressão de diferentes proteínas de NF para a formação dos FIs (Lee *et al.*, 1993; Witte & Bradke, 2008).

Já em astrócitos imaturos e glia radial, nestina e vimentina são as principais proteínas dos FIs, mas com o desenvolvimento elas são suprimidas na maioria dos astrócitos e substituídas pelo GFAP nas células maduras, que é considerado um marcador da diferenciação astrocitária (Landry *et al.*, 1990). A fase de transição da glia radial contendo vimentina para o astrócito maduro contendo GFAP é decisiva no desenvolvimento astrocitário (Eliasson *et al.*, 1999). A expressão de GFAP tem um aumento exacerbado acompanhado de hipertrofia e hiperplasia astrocitárias em algumas condições patológicas do SN, como por exemplo, neurotrauma, resultando no preenchimento do sítio da

lesão e formação de uma cicatriz glial, processo este denominado de astrogliose ou gliose reativa (Aschner *et al.*, 1998; Eng *et al.*, 1992), que é caracterizada por uma grande expressão de BMP (Fuller *et al.*, 2007).

A sinemina é outro FI que parece sofrer modulação temporal no SN em desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do córtex de rato ela é encontrada em uma subpopulação de células astrocitárias expressando GFAP, vimentina e nestina (Sultana *et al.*, 2000), ou seja, células que estão se diferenciando em astrócitos, possivelmente glia radial.

#### 1.6. A SINEMINA

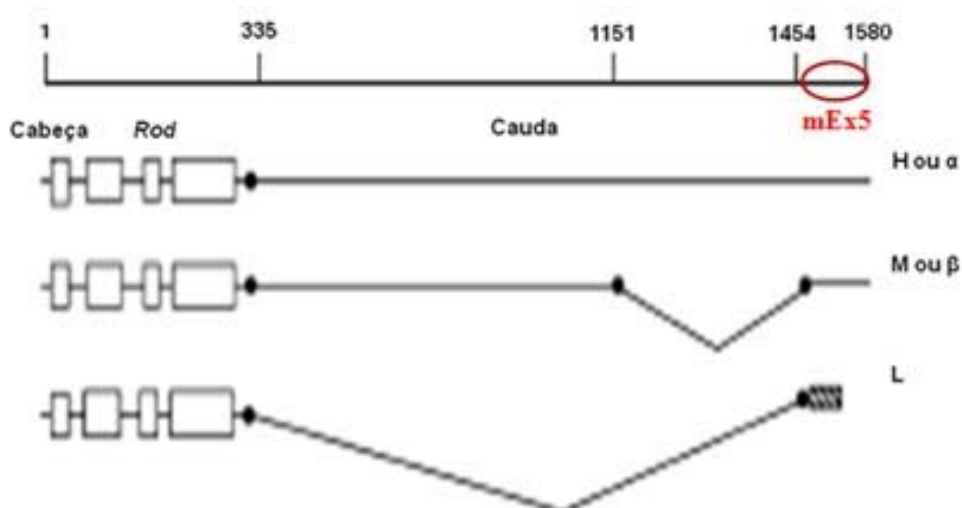
Sinemina é uma proteína do citoesqueleto que foi inicialmente identificada em células musculares como uma proteína associada aos filamentos de desmina e vimentina (Granger & Lazarides, 1980). Posteriormente, ela foi caracterizada como um membro da família de FIs (Becker *et al.*, 1995; Bellin *et al.*, 1999).

A equipe do Dr. Zhenlin LI descreveu o gene que codifica a sinemina humana e murina presentes nos cromossomos 15 e 7, respectivamente. Eles também mostraram que este gene sofre processamento alternativo gerando três isoformas distintas, as sineminas grande ou H (*high*), média ou M e pequena ou L (*low*) com 180, 150 e 41kDa, respectivamente (Titeux *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2004), veja a figura 3.

As sineminas H e M estão presentes nos músculos, particularmente no músculo liso, desde etapas iniciais da vida embrionária. A sinemina M é predominantemente presente no músculo estriado (Titeux *et al.*, 2001). Já a

sinemina L está presente nos músculos estriado, cardíaco e liso de camundongos adultos (Xue *et al.*, 2004).

As isoformas de sinemina requerem a presença de outra proteína de FI para sua polimerização. Bellin *et al.* (1999) demonstraram que a sinemina interage com desmina através de seu domínio *rod*. *In vitro*, foi demonstrada a formação de um heteropolímero com vimentina e desmina (Bellin *et al.*, 2001; Moon & Lazarides, 1983; Schweitzer *et al.*, 2001; Titeux *et al.*, 2001), no qual são necessários no mínimo o domínio de cabeça semelhante ao da vimentina e os domínios *rod* 2A e B da sinemina (Khanamiryan *et al.*, 2008).



**Figura 3: Diagrama esquemático mostrando as sinemina H, M e L de camundongo.** Os domínios de cabeça, *rod* e cauda estão indicados. Os pontos pretos no domínio de cauda representam as posições do processamento alternativo dos exons e íntrons. Os números indicam a posição dos aminoácidos correspondente à sinemina H. A caixa listrada mostra a nova seqüência no domínio de cauda da sinemina L. A posição do exon 5 de camundongo (mEx5), utilizado para geração do anticorpo anti-sinemina H/M, assim denominado por reconhecer ambas isoformas (H e M), usado neste trabalho, está assinalada em vermelho. Adaptado de Xue *et al.* (2004).

Xue *et al.* (2004) também demonstraram, através de estudos com camundongos nocaute para desmina e vimentina, que a sinemina está

especificamente associada à desmina nos músculos esquelético e cardíaco. Na ausência de desmina, a sinemina também desaparece destes tecidos. Porém, no músculo liso, a sinemina está associada à desmina e vimentina. Interessantemente, a presença de sinemina no músculo liso de camundongos nocaute para desmina persiste em associação à vimentina. No entanto, essa presença é diminuída nos camundongos nocaute para vimentina, onde a sinemina está associada à desmina. Em camundongos nocaute para desmina e vimentina a sinemina é ausente em ambos os tipos musculares.

Além da desmina, a sinemina interage com outros constituintes celulares presentes no citoplasma (mitocôndria e sarcolema) ou na membrana plasmática via diferentes elementos do citoesqueleto.

As sineminas são de fato proteínas-chave na ligação cruzada de diferentes estruturas do citoesqueleto. Além da interação das três isoformas com os domínios *rod* da desmina e vimentina, elas também participam da ponte entre o citoesqueleto de actina e as proteínas de ancoragem  $\alpha$ -actinina (Bellin *et al.*, 1999; 2001), vinculina (Bellin *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2008a), metavinculina (Sun *et al.*, 2008a), distrofina (Bhosle *et al.*, 2006), utrofina (Bhosle *et al.*, 2006), talina (Sun *et al.*, 2008b) e plectina 1 (Hijikata *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a sinemina H/M interage com  $\alpha$ -actinina através de seu domínio de cauda (Bellin *et al.*, 1999) e que este mesmo domínio é responsável pela interação da sinemina H com vinculina e talina (Sun *et al.*, 2008). Já a sinemina L liga-se essencialmente a neurofilamentos associados com compartimentos de membrana (Izmyrian *et al.*, 2006). Estas interações sinalizam para a participação destas isoformas nos eventos de adesão celular.

Russel *et al.* (2006) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que a sinemina participa dos mecanismos de sinalização intracelular, atuando como uma proteína de ancoragem de proteína cinase A (AKAP) em músculo cardíaco. Assim, a sinemina determina a localização subcelular de PKA, deixando-a próxima de seus alvos.

De um modo geral tem sido descritas diversas funções intracelulares para as AKAPs via ancoragem de PKA, como transcrição gênica induzida por CREB fosforilada (Felicciello *et al.*, 1997), secreção de insulina (Stenn *et al.*, 2000), sinalização via receptor  $\beta$ -adrenérgico (Shih *et al.*, 1999), entre outras.

#### **1.6.1. Expressão de Sinemina e diferenciação celular**

Além do músculo, a sinemina, é principalmente encontrada, de uma maneira dinâmica e variável, no SN, dependendo do estágio de desenvolvimento. Enquanto a sinemina M é encontrada precocemente a partir do quinto dia do desenvolvimento embriológico de camundongos (E5), a sinemina H só começa a ser encontrada em E9,5 e a sinemina L a partir de E13 (Izmyrian *et al.*, 2008).

A sinemina parece realmente apresentar um padrão de distribuição com regulação temporal. Ela foi encontrada em uma sub-população glial, expressando nestina, vimentina e GFAP, correspondendo possivelmente ao período de transição da glia radial a astrócitos diferenciados (Sultana *et al.*, 2000).

Esta regulação temporal da distribuição de sinemina também foi reportada durante o desenvolvimento da retina humana, parecendo justificar

sua presença na glia de Müller em retina embrionária humana sob diferentes condições patológicas (Tawk *et al.*, 2003). Mais ainda, pacientes com anormalidades visuais (síndrome de Walker–Warburg, Meckel e trissomia do 13) apresentaram uma diminuição da distribuição de sinemina concomitantemente à de vimentina (Tawk *et al.*, 2003).

A sinemina também apresenta um padrão de regulação tecido-específico. No SNC, a sinemina H/M é encontrada unicamente em células gliais. Já no SNP, ela é encontrada em neurônios e células de Schwann do gânglio sensorial E11. Ao contrário, a sinemina L é encontrada especificamente em neurônios pós-mitóticos possuindo NFs e  $\beta$ -tubulina III em todo SN (Izmyrian *et al.*, 2006). Possivelmente mecanismos específicos a neurônios e glia controlam o processamento alternativo do RNAm comum e a síntese de cada isoforma de sinemina. A tabela 3 mostra a distribuição de sinemina no SN.

**Tabela 3: Distribuição das sineminas H/M e L no Sistema Nervoso**

SN	H/M	L
<b>Encéfalo</b>		
Células endoteliais	+	
Medula oblonga	+	+
Pia mãe	+	
Glia limitante	+	
Neurônios		+
Células de Purkinje	+	
Lente e retina	+	
<b>SNP</b>		
Neurônios	+	+
Glia	+	
Célula de Schwann	+	

H/M: sinemina H/M, L: sinemina L; SN: sistema nervoso. Adaptado de Izmyrian *et al.*, 2006.



Sinemina H/M também está presente em gliomas (Jing *et al.*, 2005) e astrócitos reativos após neurotrauma (Jing *et al.*, 2007). Nos gliomas a sinemina é co-localizada com outras proteínas de filamento intermediário, GFAP e vimentina. A sinemina foi encontrada nos domínios de membrana em co-localização com  $\alpha$ -actinina, proteína que interage com a actina nos contatos focais, sugerindo a participação da sinemina na motilidade destes gliomas. De fato, quando a expressão de sinemina H/M é silenciada nestas células observa-se uma redução das interações entre actina-F e  $\alpha$ -actinina, e da capacidade migratória (Pan *et al.*, 2008).

### 1.7. OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

A glândula tireóide sintetiza e secreta os hormônios tireoideanos (HTs), tiroxina ou T4 (em maior quantidade) e triiodotironina ou T3 (Griffin *et al.*, 1996). Os HTs são carreados no sangue por proteínas específicas, globulina ligante de tiroxina, transtirretina e albumina (Zoeller *et al.*, 2007).

Nos tecidos, T4 é convertido em T3 e no composto inativo T3 reverso pelas enzimas iodotironina desiodases (Bianco & Kim, 2006). Há três iodotironinas desiodases identificadas, as desiodases tipo I (D1), tipo II (D2) e tipo III (D3), as quais diferem na distribuição tissular, perfil catalítico, especificidade de substrato, funções fisiológicas e regulação (Bianco & Kim, 2006; Henneman & Visser, 1997; St Germain & Galton, 1997).

Os efeitos dos HTs sobre a diferenciação e desenvolvimento celular decorrem da ligação destes hormônios a receptores nucleares (TRs) que agem como fatores transcrpcionais, modificando a expressão de diversos genes

(Forrest *et al.*, 1991; Oppenheimer & Schwartz, 1997). Estes receptores são codificados por dois genes distintos, *c-erb-A $\alpha$*  e *c-erb-A $\beta$* . Os TRs podem formar dímeros com os receptores de ácido retinóico (RXRs), o que pode interferir com o efeito biológico de T3 (Puzianowaska-Kuznicka *et al.*, 2008).

### **1.7.1. Os Astrócitos e hormônio tireoideano**

A princípio acreditava-se que os astrócitos após converterem T4 a T3 liberavam o hormônio bioativo para ser usado pelos neurônios. Isto porque os astrócitos expressam a D2, que parece ser de grande importância no encéfalo durante o período embrionário e pós-natal precoce (Obregón *et al.*, 1991, Trentin, 2006), quando T4 é a principal fonte hormonal. Contudo, assim como neurônios e oligodendrócitos, os astrócitos também são células-alvo para os HTs durante o desenvolvimento do encéfalo (Gould *et al.*, 1990). T3 regula o número de astrócitos e a maturação das células gliais de Bergmann no cerebelo de rato (Clos *et al.*, 1980). Mais ainda, Sharlin *et al.* (2008) demonstraram que o HT favorece a geração de astrócitos em detrimento de oligodendrócitos. Quanto maior o nível de T4 no sangue, maior o número de astrócitos e menor o número de oligodendrócitos (Sharlin *et al.*, 2008).

Nosso laboratório vem ao longo dos anos demonstrando a importância do T3 na regulação do crescimento e diferenciação astrocitária. Trentin & Moura Neto (1995) demonstraram que T3 e meio condicionado, produzido após tratamento dos astrócitos com este hormônio, induzem a proliferação de astrócitos cerebelares com aumento substancial da expressão de vimentina, proteína expressa nos estados proliferativos, além de alterar a distribuição de

GFAP, que se organiza ao redor do núcleo celular, e de fibronectina, que se torna difusa na matriz extracelular. Os meios condicionados com astrócitos de hemisfério cerebral de ratos normais ou hipotireóideos são capazes de induzir rápida mudança morfológica em astrócitos, que passam de protoplasmáticos à fibrosos (Trentin *et al.*, 1995). Este meio condicionado contém fatores que sensibilizam mais profundamente os astrócitos obtidos de animais hipotireóideos do que as células normais (Trentin *et al.*, 1995, 2001).

O HT induz a diferenciação de astrócitos corticais e proliferação de astrócitos cerebelares na dependência do estágio de desenvolvimento encefálico. Enquanto estruturas mais jovens respondem ao HT com proliferação, como é o caso do cerebelo recém-nascido, as estruturas mais maduras se diferenciam, como observado com o cerebelo pós-natal de 10 dias. Este efeito do HT é autócrino e se caracteriza principalmente pela indução da síntese de fatores de crescimento e citocinas pelas suas células-alvo. Assim, T3 leva os astrócitos corticais que diferenciam a secretarem provavelmente um fator IGF-símile, enquanto que o cerebelo é capaz de secretar EGF, TNF $\beta$  e fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF). Este último, que parece estar envolvido com a proliferação no cerebelo, também aumenta a proliferação de células tumorais, como o glioma C6 de rato (Trentin *et al.*, 2002). No entanto, o HT também apresenta um efeito parácrino, fazendo com que os astrócitos cerebelares liberem fatores de crescimento como EGF e TNF $\beta$  que aumentam em cerca de 80% a proliferação de neurônios granulares do cerebelo (Gomes *et al.*, 1999; Martinez & Gomes, 2005).

Os efeitos de T3 sobre os astrócitos também incluem um aumento significativo da síntese protéica, que é melhor observado nos astrócitos de

hemisfério cerebral (Lima *et al.*, 1998). T3 também induz a síntese de GFAP nos primeiros passos da diferenciação astrocitária, ou seja, favorece a maturação destas células (Lima *et al.*, 1998). Já na microglia, T3 favorece o crescimento e diferenciação morfológica durante o desenvolvimento via receptores nucleares  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  (Lima *et al.*, 2001).

A capacidade dos astrócitos de responderem ao HT é mantida durante a transformação tumoral. A célula U373, uma linhagem de astrocitoma humano, mantém a capacidade de responder ao HT e expressar miosina Va, um motor molecular baseado em actina de reconhecida presença no SN, sob controle positivo de T3 (Martins *et al.*, 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

A análise do desenvolvimento de camundongos entre 5 e 15 dias embrionários (E5 a E15) mostrou que sinemina H/M é produzida tão precocemente quanto à nestina e vimentina. Ela é encontrada no futuro ectoderma neural em E6,5, quando poderia estar correlacionada com a migração das células da crista neural e células endoteliais (Izmirlyan *et al.*, 2008).

Até o presente momento nada se sabe a cerca da distribuição das isoformas de sinemina durante o programa de diferenciação celular, menos ainda sobre sua possível modulação por T3, hormônio responsável por orquestrar o desenvolvimento biológico, através também da determinação do estado celular, proliferação, diferenciação e maturação celular. Este efeito de T3 na atividade celular que ocorre via regulação de diversas proteínas, incluindo os marcadores dos diferentes estágios celulares, como nestina e vimentina, as quais surgem precocemente durante o desenvolvimento embriológico, assim como a sinemina H/M.

Face estas assertivas nos perguntamos quão precoce seria o surgimento das isoformas de sinemina; se elas já estariam presentes nas células-tronco embrionárias pluripotentes; se sinemina seria um efetivo sinalizador do ganho morfo genético e funcional durante o desenvolvimento de tecidos e órgãos, no curso da diferenciação celular; e mais ainda, se o HT, T3, que é considerado um hormônio relógio do desenvolvimento, modularia a síntese de suas isoformas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o nível de sinemina H/M durante o programa de diferenciação celular a partir de CTEs, e se o hormônio tireoideano, T3, regularia sua síntese, como uma representação de uma maior maturidade celular.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a distribuição de sinemina H/M em embrião de camundongo.
- Avaliar a presença de sinemina H/M em células neurais saudáveis e sob condições patológicas, tumores gliais.
- Analisar a presença de sinemina H/M em CTEs pluripotentes.
- Analisar a distribuição das isoformas de sinemina durante a diferenciação neural de CTEs induzida por AR.
- Correlacionar a distribuição de sinemina H/M com outros marcadores de diferenciação neural, nestina vimentina e GFAP.
- Avaliar a modulação da síntese de sinemina H/M por T3 em glioblastoma humano.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Ratos da linhagem Wistar e, por vezes, camundongos suíços foram utilizados neste trabalho para as culturas primárias de neurônios, astrócitos corticais e microglia. Os animais foram criados no biotério do Departamento de Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas, no Centro de Ciências da Saúde, UFRJ. Foram utilizados ratos recém nascidos (P0 = dia do nascimento) para os experimentos *in vitro*, respeitando as normas do Comitê do Centro de Ciências da Saúde (Protocolo DAHEICBo15).

### 4.2. CULTIVO CELULAR

#### 4.2.1. Cultura de neurônios, astrócitos e células da microglia

As culturas de neurônios, astrócitos e células da microglia foram feitas a partir de córtex cerebral de ratos P0, de acordo com procedimentos previamente descritos (Lima *et al.*, 2001; Moura Neto *et al.*, 1983; They *et al.*, 1991; Trentin & Moura Neto, 1995). Resumidamente, após remoção da meninge e dissecação dos hemisférios cerebrais, mantidos em PBS-glicose (tampão salina fosfato com 0,6% de glicose), as células foram dissociadas com pipeta *Pasteur* e os fragmentos não dissociados sofreram decantação. Após centrifugação do sobrenadante (1500 rpm por 5 minutos), o precipitado foi ressuspensionado e plaqueado em garrafas de cultura contendo meio sem soro (MSS) consistindo de DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) (Gibco; Carlsbad, CA, EUA), acrescentado de 33mM de glicose,

2mM de glutamina, 3mM de bicarbonato de sódio, 0,5mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5µg/ml de fungizona. Para o cultivo de neurônios estas células foram plaqueadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (TPP) e cultivadas por 24h em MSS. Já para a cultura de astrócitos, foi adicionado 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) ao meio, que passa a ser denominado de meio com soro (MCS).

Os astrócitos foram plaqueados em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> ou em poços de 16,2 mm (placa de 24 poços) (TPP). Após 48 horas, as células foram lavadas com uma pipeta *Pasteur* para a retirada dos neurônios ainda remanescentes. O meio de cultura foi trocado em dias alternados. Após 7-10 dias, quando a cultura alcançou aproximadamente 70% de confluência, realizamos a extração de proteínas ou imunocitoquímica.

Para o cultivo da microglia, foi inicialmente realizado o cultivo de astrócitos em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (TPP) com troca do meio de cultura apenas 6 dias após o plaqueamento e após mais 6 dias após 2 ml de meio foi trocado. No dia seguinte, as células da microglia foram isoladas. Após agitação de 45-60 min, as células microgлияis dispersas no meio foram recolhidas e centrifugadas à 4°C e 800 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido. 3x10<sup>6</sup> células foram plaqueadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (TPP) com MCS. Após 24h elas foram processadas para imunocitoquímica.



#### **4.2.2. Cultivo de linhagens celulares**

Foram utilizadas linhagens celulares de astrócitos murinos produzidas pela equipe do Dr. LI (CNRS UMR 7079, França), de célula de Schwann (MSC80), de glioma humano A172 (ATCC, USA), de glioma de rato C6 (doadas por Dra. Mary SOGAIAR, USP, Brasil), além de células de glioblastoma humano obtidas a partir da intervenção cirúrgica de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF, UFRJ, Brasil) realizada pela equipe do Dr. Jorge MARCONDES e denominadas Gbm02 e Gbm03. As biópsias destes pacientes foram analisadas pela equipe da Dra. Leila CHIMELLI (Serviço de Anatomia Patológica, HUCFF, UFRJ, Brasil) que as classificaram como glioblastoma de acordo com os critérios da OMS. Fragmentos destas biópsias foram cultivados com MCS renovado a cada dois dias. Após atingirem a confluência as células tumorais foram repicadas com tripsina para expansão das linhagens estabelecidas. Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa registrado no CONEP número 2340 do Ministério da Saúde que autoriza o uso destas linhagens humanas.

Estas linhagens foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> ou em poços de 16,2 mm (placa de 24 poços) (TPP) com MCS. O meio foi trocado a cada 2 dias e após atingirem a confluência realizamos a extração de proteínas ou imunocitoquímica.

#### **4.2.3. Cultura de células endoteliais humanas**

Células endoteliais primárias humanas (HUVECs) foram doadas pela Dra. Tércia ALVES (FIOCRUZ, Brasil). Elas foram obtidas através do tratamento de veias umbilicais humanas com uma solução estéril de colagenase IV 0,1% (Sigma) em PBS rico em glicose (Merck), conforme método descrito originalmente por Jaffe *et al.* (1973). Com exceção do soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, BR) e do M199/HEPES (M199, Sigma), todos os suplementos da cultura de células foram da Life Technologies do Brasil. As células primárias foram cultivadas em M199/HEPES suplementadas com 20% de SFB 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de penicilina, 2,5µg/ml anfotericina e 100µg/ml gentamicina. As HUVECs foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência.

#### **4.2.4. Cultivo de células-tronco embrionárias e diferenciação neural**

Foram utilizadas CTEs murinas ES-UMR7079 do laboratório do Dr. LI (CNRS-UMR 7079, França), ES-CGR8, gentilmente doadas pelo Dr. PUCÉAT (INSERM-UMR861, França), ES-CK35, gentilmente doadas pelo Dr. MOULY (UMR S 787, França) e ES-USP, gentilmente cedidas pela Dra. Lygia PEREIRA (USP, Brasil). Assim, pudemos analisar a expressão das isoformas de sinemina sem a interferência de um possível comprometimento fenotípico específico, já que em seus laboratórios de origem estas células são usadas pra diferenciação de tipos celulares distintos.

As colônias de CTEs foram cultivadas com DMEM/F12, 180mM de glutamina (Gibco), 0,1mM de aminoácidos não essenciais (Gibco), 50µg/ml de gentamicina, 110µM de β-mercaptoetanol (Gibco), 15% de *knockout serum replacement* (KSR, Invitrogen), e 1µg/ml de LIF. Com exceção das células ES-CGR8, as colônias de CTEs foram plaqueadas na presença de fibroblastos murinos (MEF) inativados com 10µg/ml de mitomicina C (Sigma) por 3 ou 4 horas.

Células ES-USP foram diferenciadas em neurônios. Inicialmente suas colônias foram cultivadas por 2 dias sobre MEF e em seguida transferidas para placas de cultura não aderentes, em meio sem LIF e com o KSR substituído por SFB. Após dois dias os corpos embrióides (EBs) formados foram repicados e a diferenciação neural foi induzida pelo tratamento com 2µM de ácido retinóico (AR; Sigma) por quatro dias.

Para cultivo das MEFs, embriões de camundongo E12-E14 tiveram sua cabeça, vísceras e coração removidos. O restante do corpo foi dissociado com 0,02% de tripsina e homogeneizado com pipeta *Pasteur*. Após no máximo 25min a 37°C a tripsina foi inativada com SFB e a suspensão celular centrifugada a 1000rpm. O precipitado celular foi plaqueado nas garrafas de 25cm<sup>2</sup> e as células mantidas em MCS adicionado de 110µM de β-mercaptoetanol (Gibco).

Todas as células utilizadas neste trabalho foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até serem analisadas por RT-PCR, gel bidimensional, Western blot ou imunocitoquímica.

#### 4.3. TRATAMENTO DAS CÉLULAS GBM02 EM CULTURA COM HORMÔNIO TIREOIDEANO, T3

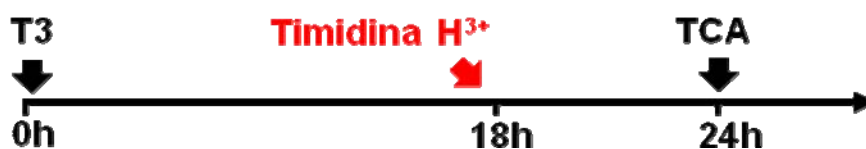
Para o tratamento hormonal com T3  $30 \times 10^4$  células de Gbm02 foram plaqueadas em poço de 34,5 mm (placa de 6 poços, TPP) e cultivadas com MCS livre de HT. Após 24h o meio foi trocado e o SFB livre de HT foi reduzido para 0,5%. No dia seguinte as células foram lavadas com MSS e mantidas neste meio por 4 horas. Em seguida as células foram incubadas com 50 nM de T3 (Sigma) por 24 horas. Culturas controle foram obtidas mantendo as células em MSS.

Para obtenção do SFB livre de HT foi realizada a depleção de T3 e T4 como descrito por Samuels e *et al.* (1979). Para tal, 100 ml de SFB foi incubado com 5g de resina AG 2-X8 (Bio-Rad) por 5 horas à temperatura ambiente em agitação. Após a decantação da resina o soro foi incubado com nova resina AG 2-X8 (5g) por 18 horas em agitação a 4°C. Ao término deste período o soro foi centrifugado a 10.000rpm por 20 minutos. O SFB livre de HT foi então cuidadosamente recolhido e armazenado até o uso a -20°C.

#### 4.4. ENSAIOS DE INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA

As células tumorais Gbm02 foram plaqueadas na densidade de  $7,5 \times 10^4$  células/16,2 mm (placas de 24 poços, TPP). Após 18 horas do início do tratamento hormonal, células controle e tratadas com T3 foram incubadas com 1µCi de timidina-[<sup>3</sup>H], produzida por IPEN/CNEN (São Paulo, SP, Brasil). Após mais 6 horas de incubação, perfazendo um total de 24 horas de tratamento, o meio dos poços foi cuidadosamente retirado e 250µl de ácido tricloroacético

(TCA) foi adicionado, de acordo com procedimentos previamente descritos (Erlich *et al.*, 2007). As placas foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente descongeladas à temperatura ambiente. A medida da incorporação de timidina radioativa pelas células foi feita em um cintilador beta (Packard 1600 TR). Foram realizados três experimentos independentes, cada um em triplicata.



**Figura 4:** Esquema temporal representativo dos ensaios de proliferação.

#### 4.5. ANÁLISE DO CITOESQUELETO NEURAL

##### 4.5.1. Imunomarcação *in toto*

Camundongos de 15 dias embrionários (E15) foram fixados pernoite com formaldeído 4%-PBS-Triton 1% (Riedel de Haen-Alemanha). Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio durante 5h. Os sítios não específicos foram inativados com solução PBS acrescida de 3% de leite e 1% de Triton X-100 (PBSMT) durante 2 horas. Em seguida os embriões foram incubados com anticorpo policlonal anti-sinemina H/M<sup>1</sup> (1:400) pernoite. Após lavagens com PBSMT, os embriões foram incubados com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado à

<sup>1</sup> Anticorpo anti-exon 5 de sinemina de camundongo produzido no laboratório do Dr Z. LI, capaz de reconhecer as isoformas H e M.

peroxidase (1:300; Amersham Biosciences) pernoite. Após lavagens com PBSMT a detecção imunológica foi realizada com solução DAB.

#### **4.5.2. Imunocitoquímica**

As células aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas com metanol gelado por 5 minutos e, depois de serem lavadas com PBS, foram permeabilizadas com PBS-Triton (0,1% de Triton X-100) por 5 min. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-BSA-5% durante 1 hora. Após novas lavagens com PBS, as células foram incubadas por 12 horas, a 4°C, com o anticorpo primário policlonal anti-sineminaH/M (1:5000) e monoclonal anti-vimentina (1:500; DAKO) ou Ki67 (1:300; DAKO).

A incubação com anticorpo secundário foi realizada à temperatura ambiente, por 1 hora. Foram usadas imunoglobulinas anti-IgG de coelho conjugadas ao fluorocromo rodamina (1:400; Alexa Fluor 546, Molecular Probes) e anti-IgG de camundongo conjugada à fluoresceína (1:300; Alexa Fluor 488, Molecular Probes). Controles negativos foram obtidos com a omissão de anticorpos primários e nestes casos não foram observadas imunoreações inespecíficas. Os núcleos foram marcados por DAPI (40,6-Diamidino-2-phenylindole dilactato; Sigma Chemical). Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas com N-Propil-galacto/PBS (0,2M). As células foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Nikon), equipado com câmera digital (CoolSNAP-Procf color, ROPER SCIENTIFIC/TM Photometrics) para captura de imagem.

A expressão de vimentina foi presumida a partir da quantificação da densidade óptica (O.D.) de sua imunomarcação. As imagens foram sempre obtidas com 50 segundos de exposição em no máximo 48 horas após o término da imuno. Elas foram analisadas no programa Adobe Photoshop 7.0, que fornece um histograma da luminosidade da foto e quantifica sua O.D. como quantidade de *pixels* presente. Estes dados foram normalizados pelo número de células (contagem da marcação nuclear por DAPI) e expressos como relação de O.D. da vimentina pelo número total de células. Foram analisadas 10 fotos das imunocitoqu micas de cada condição (controle e tratada com T3) realizadas a partir de três culturas feitas independentemente (n=3).

#### **4.5.3. Imunocitoquímica dos corpos embrióides, EBs**

Os EBs controles e diferenciados fixados com formaldeído e passados em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) foram congelados e cortados no criostato. Cortes de 5 m foram incubados com tampão citrato (10mM) pH 6,0 por 10 minutos a 98 C para exposição dos sítios antigênicos. Após lavagens com PBS os cortes foram permeabilizados com solução 0,1% de Triton X-100 e 50nM de NH<sub>4</sub>Cl. A partir deste ponto o bloqueio dos sítios inespecíficos e incubações com anticorpos primários e secundários ocorreram como descrito em 4.5.2.

Como anticorpos primários foram utilizados os policlonais anti-sinemina H/M (1:500) e anti-GFAP (1:400; Dako Cytomation) e os monoclonais anti-BLBP (1:100; Chemicon International), anti-nestina (1:200; Chemicon International), e anti- -tubulina III (1:1000; Promega Corporation).

As células positivas para cada FI e o número total de células constituindo o EB foram contados. Os resultados foram expressos como percentual de células IF positivas por EB. Foram analisadas 10 fotos de cada experimento realizado independentemente (n=3).

#### **4.5.4. Imunohistoquímica**

Tumores neurais obtidos através de biópsia de pacientes do Hôpital Sainte Anne (Paris, França) e Hospital Clementino Fraga Filho (UFRJ, Brasil) foram fixados com formol e emblocados em parafina em seus respectivos laboratórios de anatomia patológica. A imunohistoquímica destes tumores foi feita de acordo com Faria *et al.* (2006). Resumidamente, cortes histológicos de 5µm foram desparafinizados com xilol e incubados com tampão citrato (10 mM) pH 6,0 por 45 minutos à 98°C para exposição dos sítios antigênicos. A peroxidase endógena foi inativada com 3% de peróxido de hidrogênio durante 5 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio do kit Immunotech Universal HRP Immunostaining System (Beckman Coulter PN IM 1476) durante 5 minutos. Em seguida os cortes foram incubados nos anticorpos primários anti-sinemina-H/M (1:300) ou GFAP (1:500) por 1 hora. O anticorpo secundário biotinilado (kit Immunotech) foi incubado por 30 minutos. Após lavagens com PBS a estreptoavidina-peroxidase foi incubada por 45 minutos. As imunomarcações foram reveladas com DAB. Os núcleos foram contra-corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com PERMOUNT. O anticorpo primário foi omitido para obtenção do controle negativo. A análise imunohistoquímica foi realizada em microscópio de luz TE 300 (Nikon, Japão) e



documentada em uma câmera CoolSNAP-Procf (ROPER Scientific Photometrics; Japão).

#### 4.6. MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E WESTERN BLOT

##### **4.6.1. Preparo do extrato total de proteínas das células mantidas em cultura**

O extrato total das células foi obtido após a lavagem das monocamadas confluentes com PBS gelado. As células foram raspadas com tampão de lise consistindo de 10mM de Tris, 2mM de EDTA e 1mM de benzamidina. Os extratos celulares foram sonicados e tratados com tampão de amostra [2,5mM de ditioneitol (DTT), 1,7mM de SDS, 400mM de Tris pH 6.8 e 50% de Glicerol], fervidos por 5 minutos e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso em SDS-PAGE. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A dosagem pelo método de Bradford consiste da quantificação dos complexos formados entre o corante azul de *Coomassie* G-250 e as proteínas da amostra. A ligação da proteína ao corante desloca a absorção máxima do corante de 465 nm para 595 nm, permitindo que sua concentração possa ser estimada dentro de uma curva padrão de proteína de referência com concentração previamente conhecida.

##### **4.6.2. Eletroforese bidimensional (isoeletrofocalização, IEF)**

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico na primeira dimensão eletroforética

(isoeletrofocalização, IEF) e seu peso molecular na segunda dimensão eletroforética (SDS-PAGE); o que confere uma melhor e mais eficiente separação protéica das amostras biológicas.

A análise por isoeletrofocalização (IEF) da sinemina H/M foi realizada como descrito por O'Farrell (1975). Resumidamente, para o IEF foi feito um gel de acrilamida contendo uma mistura de anfólitos na faixa de pH de 3,5 a 10 enriquecida na faixa de 5 a 8. Este gel foi pré-focalizado por 15 minutos à 200V; 30 minutos à 300V e 30 minutos à 400V. Posteriormente foram aplicados 200 µg de proteína das células ES-UMR7079, ES-CGR8 e ES-CK35, as quais migraram à 400V durante 16h e posteriormente 800V durante 2h. Foram utilizadas como soluções catódica o NaOH (20mM) e anódica o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10mM). Em seguida o gel foi equilibrado durante 20 minutos com tampão SDS-O'Farrell, que continha 10% de glicerol, 2,3% de β-mercaptoetanol, 62,5mM em Tris pH 6,8. Assim, este gel de primeira dimensão ou IEF ficou pronto para ser aplicado sobre o gel de segunda dimensão ou SDS-PAGE.

A tabela 4 apresenta as diferenças dos pIs e pesos moleculares teóricos das sineminas H e M presentes em camundongos obtidos a partir da análise de suas seqüências aminoacídicas.

**Tabela 4: Descrição do ponto isoeletrico e peso molecular teóricos da sinemina H e M de camundongos.**

	<b>Sinemina H</b>	<b>Sinemina M</b>
<b>pI teórico</b>	5,3	5,31
<b>PM (kDa)</b>	160	130

Ponto isoeletrico: PI; peso molecular: PM.

#### **4.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

Os extratos celulares (20 $\mu$ g de proteína total) ou a primeira dimensão do IEEF foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método de Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida consiste de gel concentrador (*stacking gel*, 25Mm de Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% de SDS, 5% de acrilamida e 0,13% de bisacrilamida) e um gel de corrida (*running gel*, 0,4mM de Tris/HCl pH8.8, 0,1% SDS, 7% de acrilamida e 0,13% de bisacrilamida). A corrida eletroforética foi realizada a 25mA, em tampão Tris-Glicina, pH 8.8 com 0,1% de SDS. Após a corrida eletroforética, os géis foram transferidos para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) para posterior detecção imunológica de sinemina H/M, Oct 3/4, NeuN,  $\alpha$ -tubulina e ciclofilina B.

#### **4.6.4. Transferência de proteínas**

Após a migração eletroforética, as proteínas foram transferidas eletricamente para membranas de PVDF, de acordo com o método de Towbin *et al.* (1979). O gel foi embebido no tampão de transferência (0,025 M Tris/HCl, 0,192 mM glicina, 10% metanol) juntamente com a membrana de PVDF. O gel foi posto em contato com a membrana e a transferência foi feita em cuba apropriada, com o mesmo tampão de transferência descrito acima, a 4°C, 100V, por 90 minutos. Após a transferência, as membranas de PVDF foram coloridas com Vermelho de Ponceau (Pharmacia), para visualização das

proteínas transferidas e então incubadas numa solução bloqueadora de sítios inespecíficos consistindo de TBST [20mM de Tris-HCl pH 7,6 e 137mM de cloreto de sódio com 0,1% Tween 20 (Merck)] acrescido de 5% de leite em pó desnatado, durante 1h, lavadas com TBST e incubadas com anticorpos como descrito a seguir.

#### **4.6.5. Revelação imunológica**

As membranas de PVDF foram incubadas com anticorpos primários policlonais anti sinemina H/M ou anti-ciclofilina B (1:5000; Affinity BioReagents), monoclonais anti-Oct 3/4 (1:100; Santa Cruz), anti-NeuN (clone A60; 1:1000; Chemicon) ou anti- $\alpha$ -tubulina (1:5000; Dako) durante toda a noite a 4°C. A seguir, foram realizadas novas lavagens em TBST seguidas por uma segunda incubação, por uma hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase (1:5000; Amersham Biosciences). Mais lavagens em TBST foram feitas. Por fim, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado através do método de intensificação da quimioluminescência pelo luminol (Super Signal WestPico, Synapse). O método ECL consiste basicamente na oxidação do luminol, reação catalisada pela peroxidase, em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol, que imprime as bandas correspondentes às proteínas imunodetectadas em filmes radiográficos. Esses filmes, então, foram revelados com HC-110 (Kodak) e fixados (fixador para raio X Dental/ Kodak).

Os filmes radiográficos dos Western blots para sinemina H/M e ciclofilina B foram escaneados para análise densitométrica, a qual foi realizada através do programa Scion Image (National Institute of Health). As bandas das isoformas H e M de sinemina e de Ciclofilina B foram mensuradas, o peso molecular determinado e a intensidade do sinal apresentada como unidades arbitrárias da densidade óptica (O.D.). O Western blot da Ciclofilina B foi utilizado para corrigir as bandas imunodetectadas das isoformas de sinemina. Os resultados foram expressos como a relação da O.D. das duas proteínas (isoformas de sinemina por Ciclofilina B). Foram analisados os filmes radiográficos de 3 ensaios feitos independentemente (n=3).

#### 4.7. ANÁLISE POR RT-PCR

O RNA total das células e embrião E9,5 foi isolado em Trizol Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 1µg de RNA total foram amplificadas usando os seguintes primers descritos na Tabela 5. O PCR foi realizado como descrito por Xue *et al.* (2004). Os produtos do RT foram amplificados em um volume total de 50µl contendo 200ng de cada primer, 200µM de dNTP, 1x tampão de PCR e 1µl de Taq polymerase II (Clonetech). Foram realizados 25 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (62°C por 1 min) e alongação (72°C por 3 min).

**Tabela 5: Descrição dos primers usados no PCR**

<b>IF</b>	<b>Primer</b>
<b>GFAP</b>	5'-TGGATTTGGAGAGAAAGGTTGAAT-3' 5'-CGATAGTCGTTAGCTTCGTGTTTG-3'
<b>Nestina</b>	5'-AGGCTTCTCTTGGCTTTCCT-3'

	5'-TGGATCATCAGGGAAGTGGT-3'
<b>Sinemina H</b>	5'-GAG AGT GAT TGA CAG CCT GGA GGA-3'
<b>Sinemina M</b>	5'-AGA AGA GCC ACT TTC TTC TCA T-3'
<b>Sinemina L</b>	5'-ACACGGTGTGCTACCACCGTCTGC-3' 5'-AGA AGA GCC ACT TTC TTC TCA T-3'
<b>Vimentina</b>	5'-GATTTCTCTGCCTCTGCCAAC-3' 5'-GTGATGCTGAGAAGTCTCAT-3'

#### 4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todos os resultados foi realizada utilizando-se o teste-*t* de Student ou ANOVA seguido do teste Dukey no GraphPad Prism 5. Para todos os testes, o nível de confiança escolhido foi de 95% ( $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  DP de 3 experimentos diferentes para cada condição.

## 5. RESULTADOS

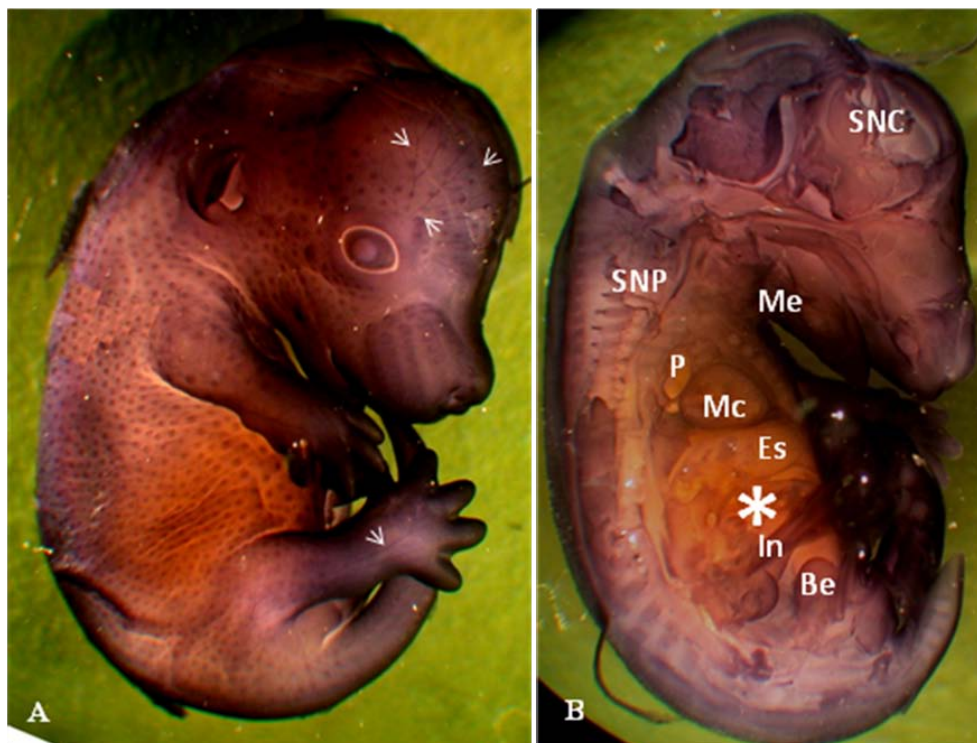
### 5.1. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA NO SISTEMA NERVOSO

A sinemina está presente no sistema nervoso normal (Izmyrian *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2000) e sob condições patológicas como a síndrome de Walker –Warburg, (Tawk *et al.* 2003) e gliomas (Jing *et al.*, 2005; 2007). Ela está presente ainda na vida embriológica, em diferentes tecidos (Izmyrian *et al.*, 2008).

Na expectativa de melhor compreender o perfil de distribuição de sinemina H/M nos tecidos embrionários realizamos sua imunomarcagem *in toto* em embrião de camundongo E15,5, período em que ambas as isoformas encontram-se presentes (Izmyrian *et al.* 2008). Sinemina H/M está presente na epiderme e nos capilares que fazem sua nutrição (figura 5A), assim como no sistema nervoso central e periférico, onde foi encontrada na saída dos nervos espinhais (figura 5B). No sistema muscular pudemos observar esta proteína tanto em músculos esqueléticos e cardíacos, quanto na musculatura lisa, ilustrada pela marcação na parede pulmonar e também nas vísceras deste embrião, sobretudo no intestino, estômago e bexiga (figura 5B).

Para analisar o perfil de distribuição das sineminas H e M, discriminadamente, no SNC nós inicialmente avaliamos suas sínteses por Western blot. A figura 6 mostra que apenas a sinemina M, migrando com um peso molecular aparente de 150kDa, é encontrada em astrócitos corticais neonatos. Já em neurônios corticais P0, ambas as isoformas são ausentes

(6A). Da mesma maneira, no SNC adulto apenas a sinemina M está presente. Porém no músculo liso do pulmão de camundongo adulto, utilizado como controle positivo, encontramos as sineminas H e M (6B).

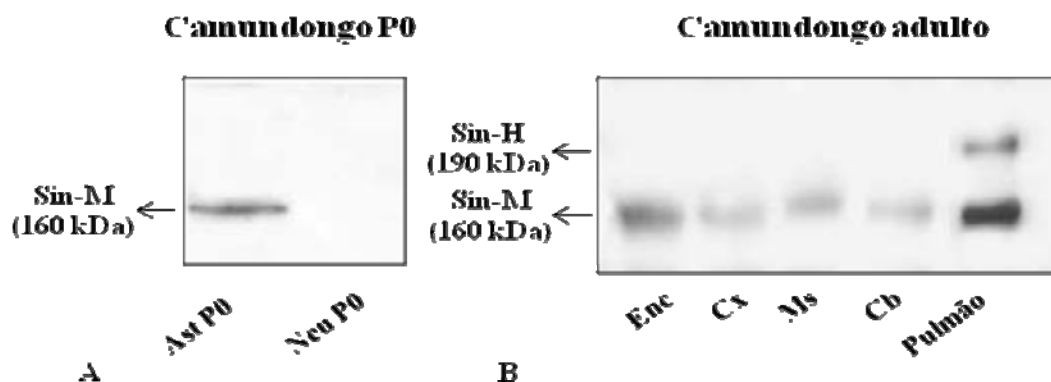


**Figura 5: Distribuição de sinemina H/M em embrião de camundongo E15,5.** Imunomarcação *in toto* para sinemina H/M em camundongo E15,5 vista externamente (A) e internamente (B). Sinemina H/M foi detectada na epiderme e nos capilares que a irrigam (setas). Ela também foi encontrada no sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP), em músculos estriados (Me), cardíaco (Mc) e liso, como parede pulmonar (P), além das região visceral (\*), com destaque para os intestinos (In), estômago (Es) e bexiga (Be).

Como a sinemina H/M necessita de outro FI para formar o filamento (Bellin *et al.*, 2001; Khanamiryan *et al.*, 2008; Moon & Lazarides, 1983; Schweitzer *et al.*, 2001; Titeux *et al.* 2001), nós investigamos a expressão de seus possíveis parceiros nas células gliais, maior população celular do SN. Assim, realizamos a caracterização gênica da expressão das isoformas de

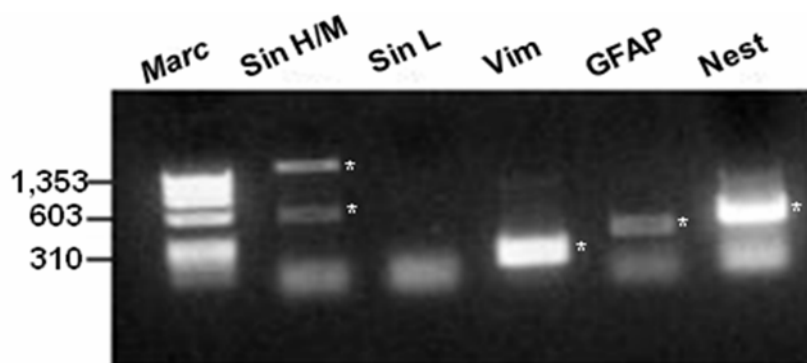


sinemina (H, M e L), vimentina, GFAP e nestina em astrócitos e células de Schwann.

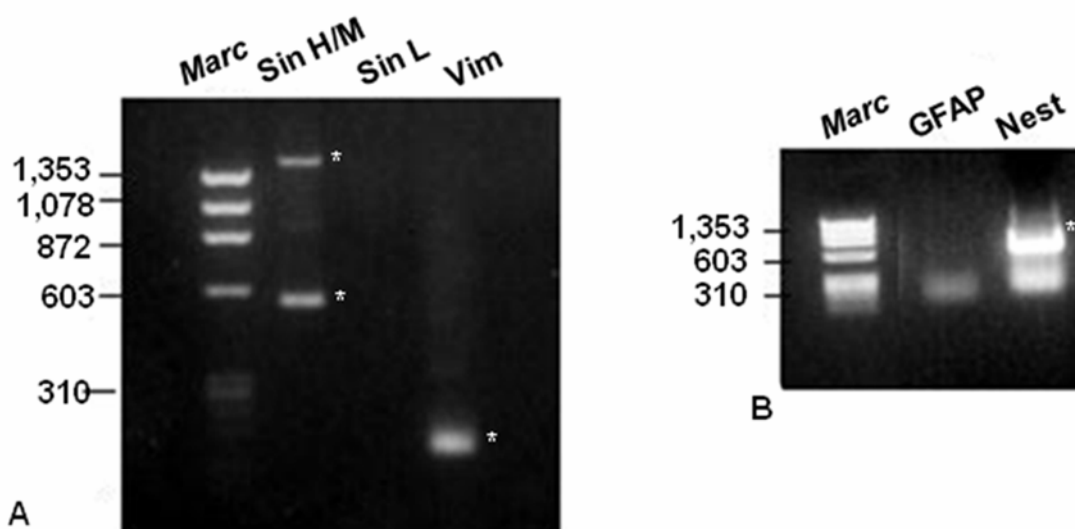


**Figura 6: Caracterização da distribuição de sinemina H/M no SNC.** A- Western blot para sinemina H/M da cultura de astrócitos (Ast) e neurônios (Neu) obtidos do córtex de camundongo P0. B- Western blot para extratos totais de encéfalo (Enc), e de suas regiões, córtex (Cx), mesencéfalo (Ms) e cerebelo (Cb), além de pulmão, obtidos de camundongos adultos. Apenas a sinemina M foi detectada em astrócitos neonato, encéfalo e regiões encefálicas de camundongos adultos, ao contrário do pulmão que também apresenta a sinemina H. Foram usados para este ensaio gel fracionador com 7% de acrilamida.

Pudemos observar a partir de RT-PCR de RNAm obtido de astrócitos (Fig. 7) e células de Schwann (Fig. 8A) a expressão do RNAm das sineminas H e M, mas não da sinemina L. Então, para avaliar o estágio de desenvolvimento em que a sinemina é expressa, realizamos a RT-PCR para vimentina, GFAP e nestina em ambos tipos celulares (Figs. 7, 8A e B). Desta forma, pudemos verificar que ambos os tipos celulares também expressavam RNAm de vimentina e nestina. Porém, só conseguimos detectar, ainda que em menor grau, o RNAm de GFAP nos astrócitos (Fig. 7).



**Figura 7: Análise da expressão gênica das isoformas de sinemina e dos marcadores de diferenciação neural em astrócitos.** RT-PCR para sinemina H/M (Sin H/M) e L (Sin L), vimentina (Vim), GFAP e nestina (Nest). Foram detectados os RNAm codificantes de sinemina H e M, vimentina, GFAP e nestina (\*). Marc: marcador de peso molecular em pares de base.

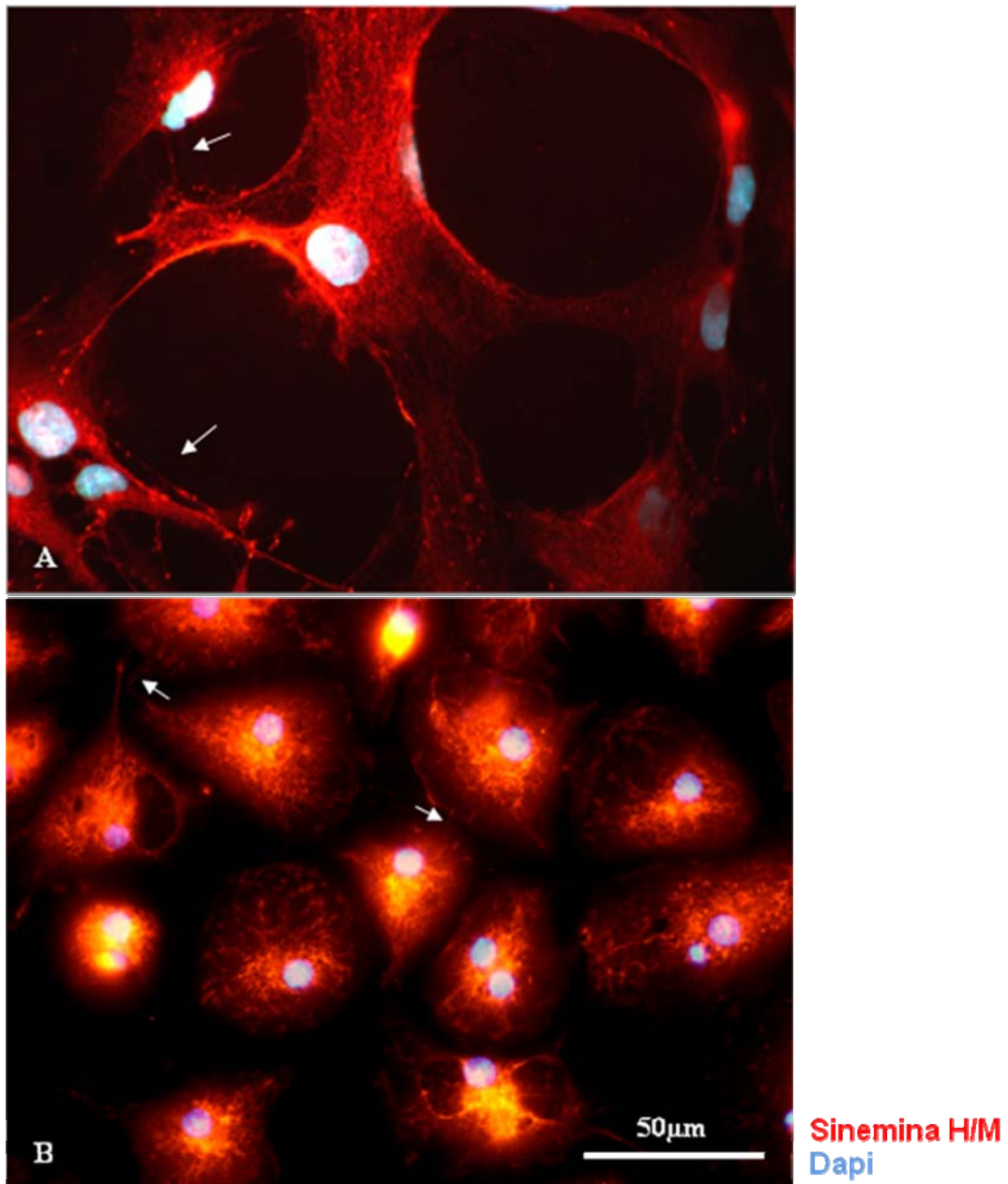


**Figura 8: Análise da expressão gênica das isoformas de sinemina e dos marcadores de diferenciação neural em células de Schwann.** RT-PCR para sinemina H/M (Sin H/M) e L (Sin L), vimentina (Vim), GFAP e nestina (Nest). Foram detectados os RNAm codificantes de sinemina H e M, vimentina e nestina (\*). Marc: marcador de peso molecular em pares de base.

Quando observamos a distribuição de sinemina H/M em astrócitos, verificamos que ela obedece ao padrão filamentar dos FIs, estendendo-se por toda célula a partir do núcleo (Fig. 9A). Na periferia há uma concentração desta

proteína nos TNTs, canais membranares responsáveis por interações célula-célula (Baluska *et al.*, 2004; Rustom *et al.*, 2004), detectados pela primeira vez em astrócitos por Pontes *et al.* (2008). A sinemina H/M também é expressa na microglia, célula envolvida nos mecanismos de defesa do SN (Fig. 9B), e nas células endoteliais de cordão umbilical humano, HUVEC (Fig. 10), o que poderia representar sua presença no endotélio em geral. Nestas células sua distribuição também correspondeu a de um típico FI e, assim como nos astrócitos, também verificamos a sinemina H/M nos TNTs.

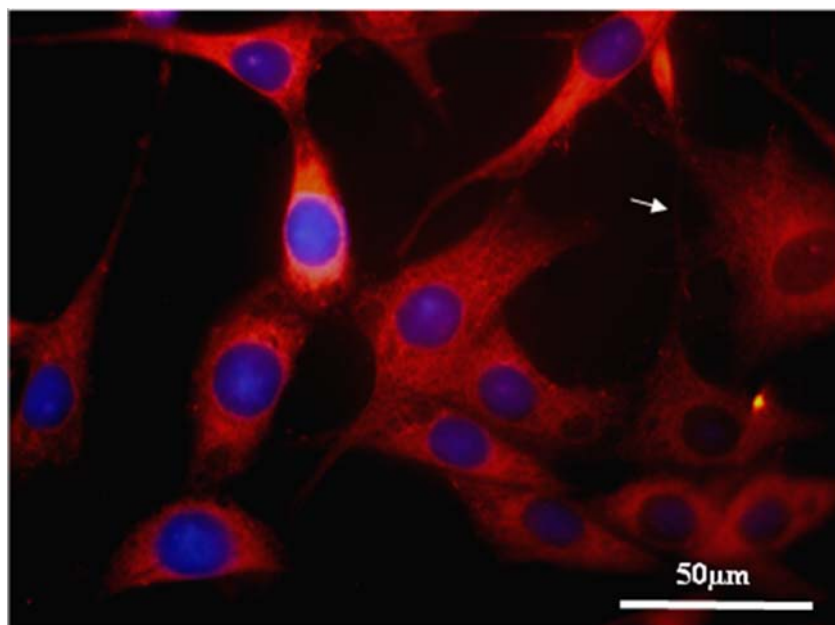
Para confirmar a presença de sinemina H/M nos TNTs fizemos sua imunomarcação concomitantemente à da actina, que está reconhecidamente presente nestas regiões (Pontes *et al.*, 2008; Rustom *et al.*, 2004). A figura 11 (A-C) mostra que a sinemina H/M presente em astrócitos corticais acompanha a distribuição de actina, sendo igualmente rica nos TNTs e região do córtex celular. Contudo, a sinemina H/M é intensamente marcada no centro da célula, sobretudo na região nuclear, onde não se encontra a actina.



**Figura 9: Distribuição de sinemina H/M no SNC.** Imunocitoquímica para sinemina H/M em culturas de astrócitos corticais (A) e microglia (B). Os núcleos estão marcados por DAPI (azul). É possível verificar a distribuição filamentar da sinemina H/M por toda célula e se estendendo aos TNT (setas).

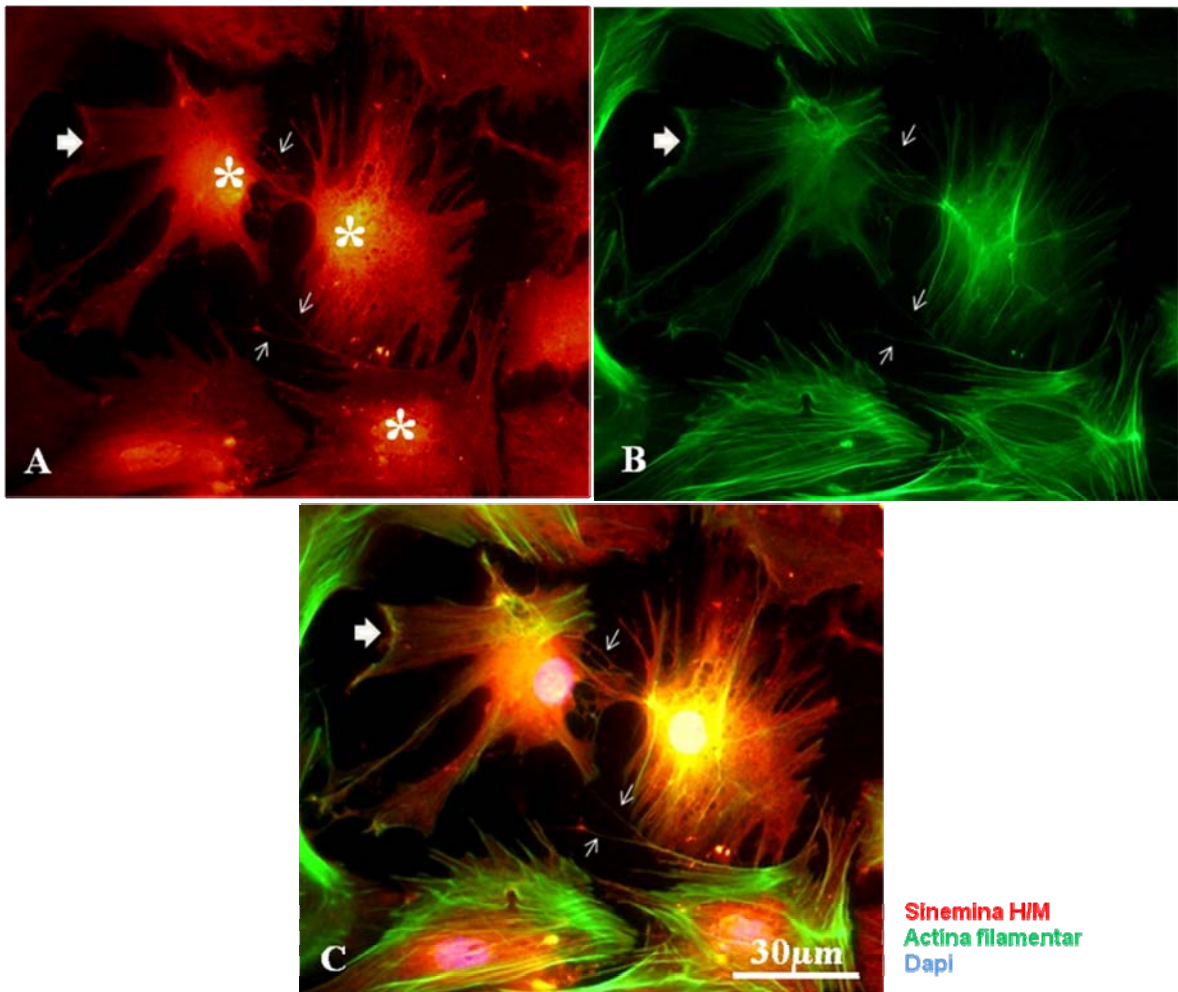
Como, em astrócitos a distribuição de sinemina H/M está intimamente associada à de vimentina (Xue *et al.*, 2004). Pudemos constatar que a distribuição de vimentina é acompanhada pela de sinemina apenas na região

central da célula, a partir do núcleo. Interessante foi verificar que apenas a sinemina H/M foi detectada nos TNTs e periferia celular (Fig. 12A-C).

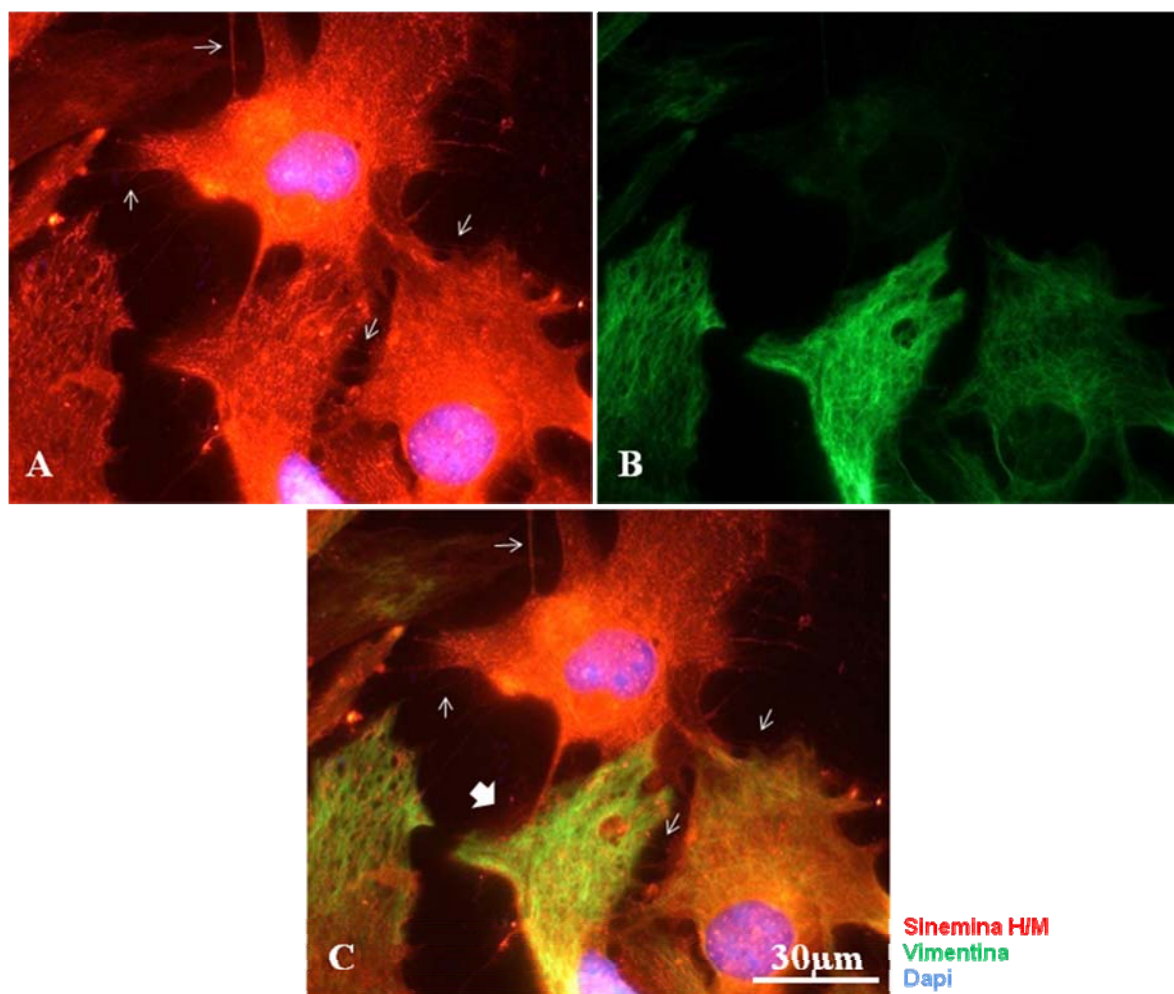


**Sinemina H/M**  
**Dapi**

**Figura 10: Distribuição de sinemina H/M em células endoteliais.** Imunocitoquímica para sinemina H/M em células endoteliais, HUVEC. Os núcleos estão marcados por Dapi (azul). É possível verificar a distribuição filamentar da sinemina H/M por toda célula e se estendendo aos TNTs (setas).



**Figura 11: Presença de sinemina H/M em TNT de astrócitos corticais.** Imunocitoquímica para sinemina H/M (A) e actina (B) em astrócitos corticais secundários. C: sobreposição de A e B. A distribuição de sinemina H/M acompanha a de actina, estendendo-se ao córtex celular (seta larga) e, sobretudo, aos TNTs (setas). Há uma forte marcação da sinemina H/M na região nuclear (\*), área onde a actina não está presente.



**Figura 12: Presença de sinemina H/M e vimentina em astrócitos corticais.** Imunocitoquímica para sinemina H/M (A) e vimentina (B) em astrócitos corticais secundários. C: sobreposição de A e B. Vimentina foi distribuída de maneira filamentar a partir do núcleo celular, acompanhando parcialmente a distribuição de sinemina H/M. Porém, apenas sinemina H/M foi encontrada nos TNTs (setas).

## 5.2. PRESENÇA DE SINEMINA EM TUMORES

Além da sua presença em células gliais saudáveis, a sinemina H/M foi recentemente reportada em gliomas humanos, onde parece estar envolvida com a migração destas células (Jing *et al.*, 2005; 2007; Pan *et al.*, 2008).

Neste trabalho de tese, caracterizamos a distribuição de sinemina H/M em tumores do SN. Em colaboração com o Departamento de Anatomia

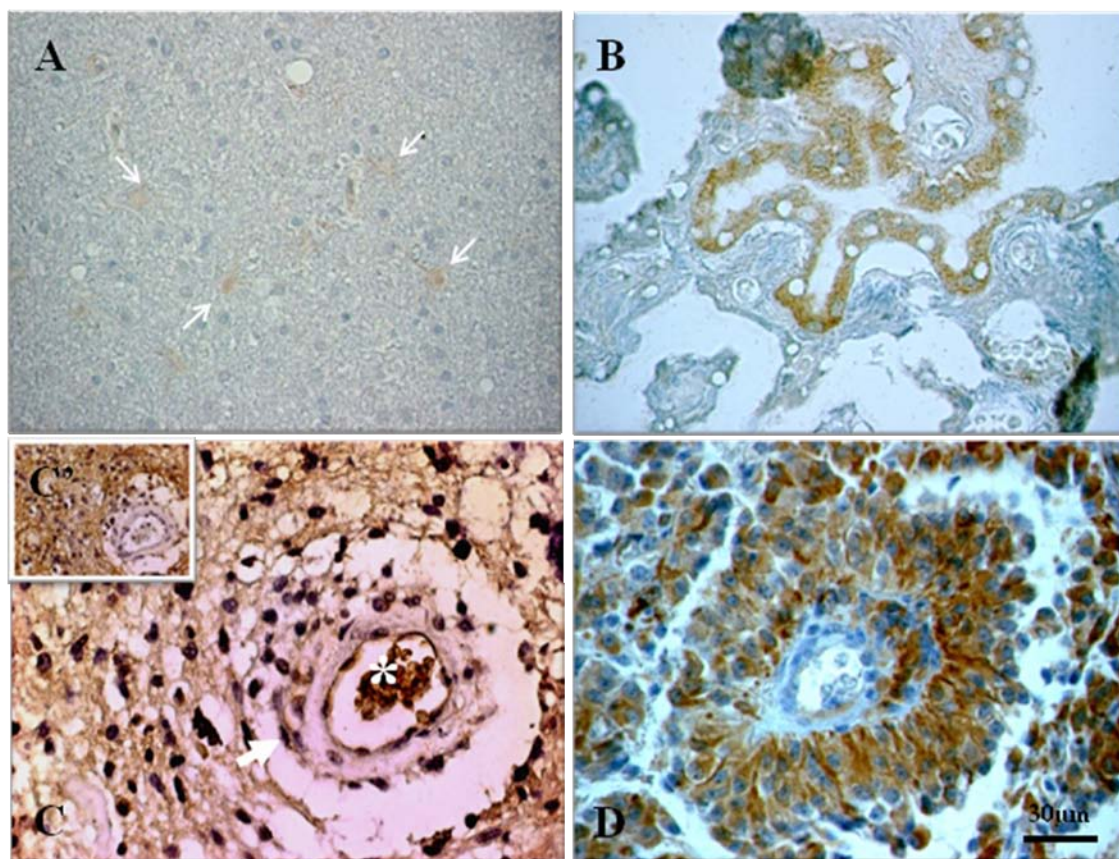
Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HCFF), UFRJ e Hôpital Saint Anne, Paris, realizamos a imunohistoquímica para sinemina H/M em cortes histológicos de biópsia de pacientes acometidos com glioblastoma (HUCFF) e ependimoma, o terceiro mais freqüente tumor glial em crianças (Hôpital Saint Anne).

No SN adulto sadio, a sinemina H/M foi detectada, como de fraca presença na substância branca adulta (Fig. 13A), ao contrário, o plexo coróide apresentou uma significativa imunoreatividade para sinemina H/M (Fig. 13B). Em células de glioblastoma, que também continham GFAP, além das células endoteliais do vaso sangüíneo que irrigava o tumor, e em eritrócitos (Figs. 13C e C') a imunoreatividade de sinemina H/M foi nitidamente superior à encontrada na substância branca saudável.

Porém, foi nos ependimomas que encontramos a mais exuberante imunodeteccção de sinemina H/M, a qual estava presente nas rosetas ependimárias, arranjo típico de células neoplásicas em torno de pequenas luzes lembrando estrutura granular (Fig. 13D).

Como mostrado na figura 14A, a linhagem de glioblastoma humano, A172, foi imunomarcada para sinemina H/M. A distribuição desta proteína ocorre de maneira semelhante a das células sadias (veja figura 9).

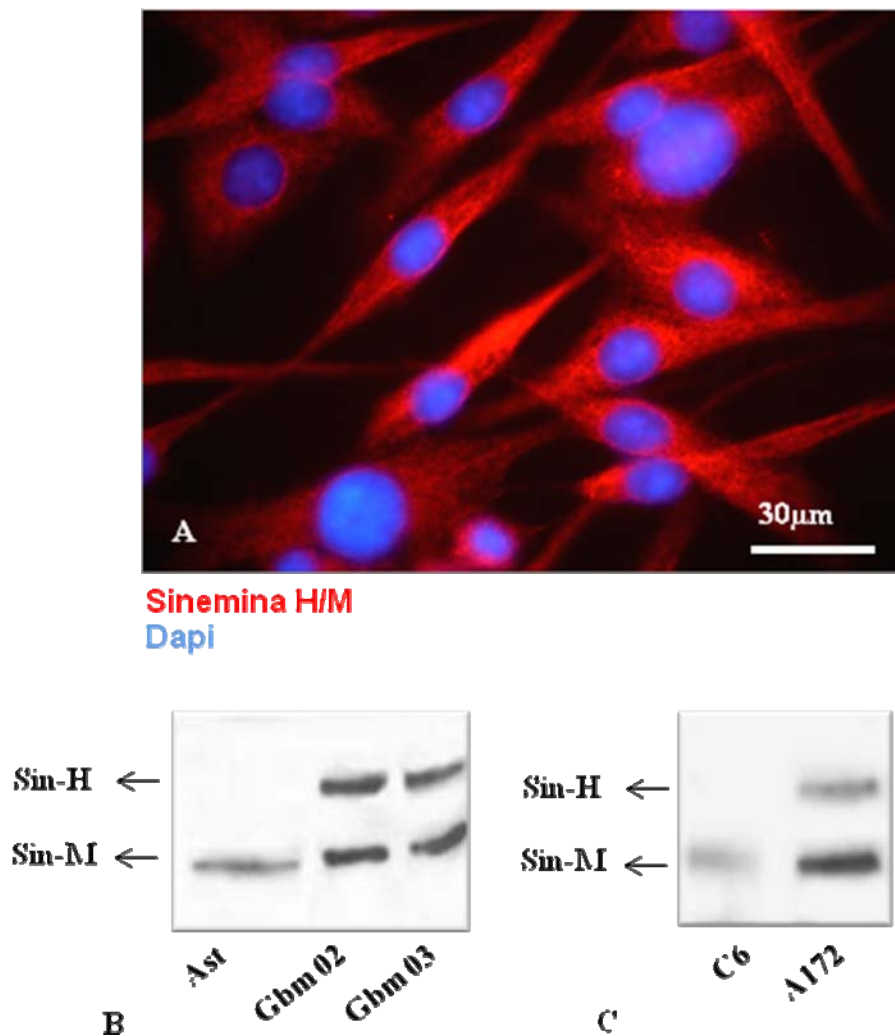




**Figura 13: Análise da distribuição de sinemina H/M em tumores do SN humano.** Imunohistoquímica para sinemina H/M em SN adulto humano saudável, substância branca (A) e plexo coróide (B) e em tumores gliais humanos, glioblastoma (Gbm02; C) e ependimoma (D). Inseto: Imunohistoquímica para GFAP em Gbm02 (C'). A imunoreatividade para sinemina H/M é quase imperceptível na substância branca (setas) e intensa no plexo coróide. Sinemina H/M está presente nas células de Gbm02, as quais também apresentam GFAP, além das células endoteliais do capilar (seta larga) e eritrócitos (\*). Ependimoma possui uma grande imunoreatividade para sinemina H/M, que também está presente nas células ependimárias do plexo coróide.

Analizamos a distribuição protéica das isoformas de sinemina H/M nas linhagens de glioblastomas humanos produzidas em nosso laboratório a partir da biópsia de pacientes do HUCFF, Gbms 02 e 03, e A172, além do glioma de rato C6 por Western blot. A sinemina M foi detectada M em todos os tumores, apresentando o mesmo padrão de migração observado na glia normal

(astrócitos corticais de rato), com 150kDa (Fig. 14B e C). Interessante que a sinemina H foi detectada apenas nos gliomas, com exceção de C6 (Fig. 14B).



**Figura 14: Caracterização *in vitro* de sinemina em gliomas.** (A) Imunocitoquímica para sinemina H/M na linhagem de glioma humano A172. Os núcleos são marcados por DAPI (azul). Foi observada a distribuição filamentar da sinemina H/M nesta célula. (B e C) Western blot para sinemina H e M em extratos de proteína total de astrócitos corticais de rato (Ast), glioblastomas humanos (Gbm02, 03 e A172) e na linhagem de glioma de rato, C6. Enquanto os astrócitos corticais apresentaram apenas a sinemina M, os gliomas também apresentaram a sinemina H, com exceção de C6.

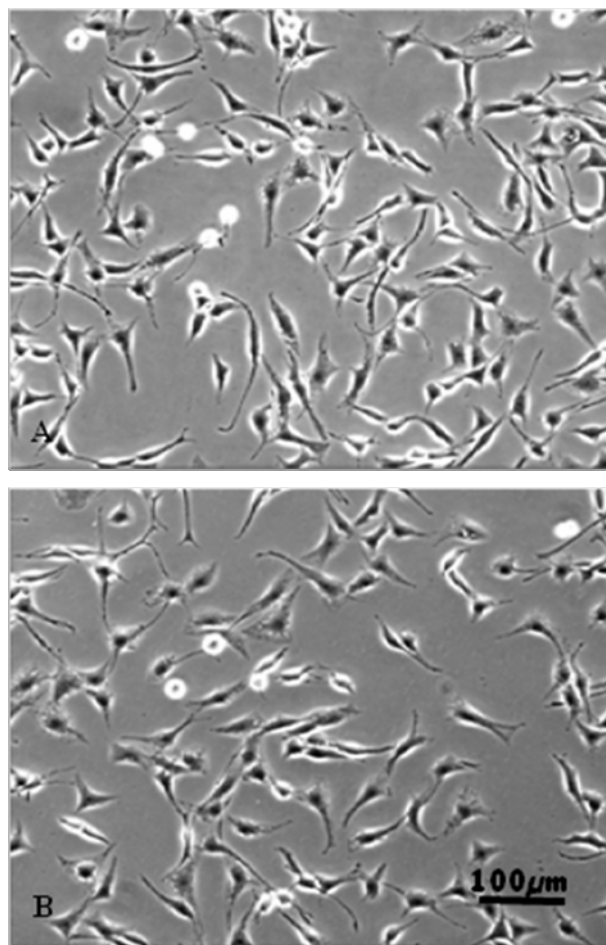
### 5.3. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE SINEMINA H E M PELO HORMÔNIO TIREOIDEANO, T3, EM GLIOBLASTOMA HUMANO

No decorrer dos anos tem sido demonstrada a importância dos HTs na regulação do desenvolvimento normal do SN, onde atua via modulação da expressão de proteínas (Ahmed *et al.*, 2008; de Escobar *et al.*, 2007; Dussault & Ruel, 1987; König & Moura Neto, 2002; Zoeller & Rovet, 2004). Neste contexto, nos perguntamos se a expressão das isoformas de sinemina também estaria sob controle do HT, T3.

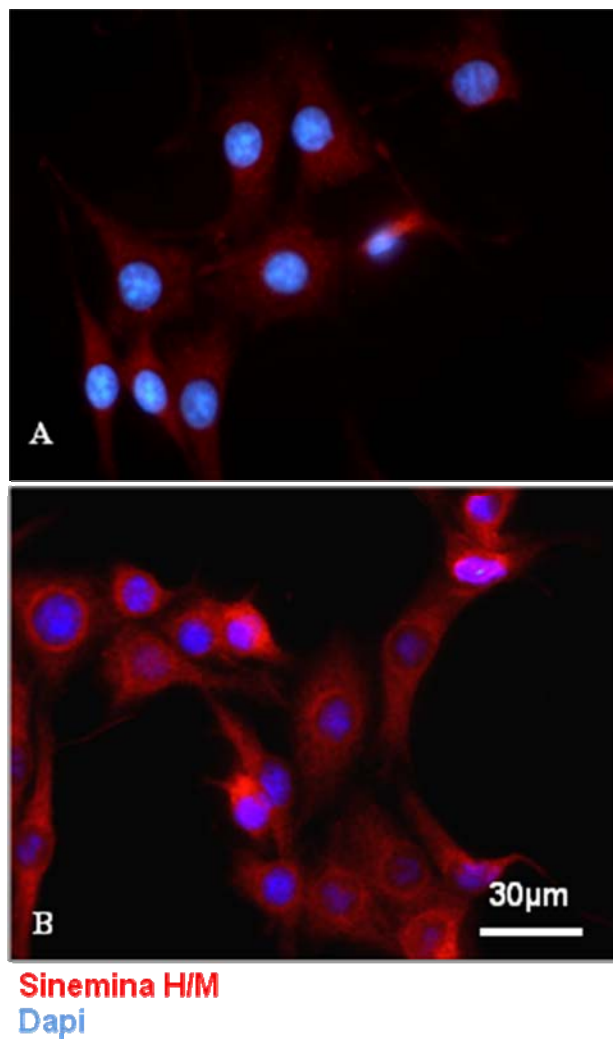
Como o nível da expressão de sinemina varia de acordo com a heterogeneidade dos gliomas e estas células mantêm a propriedade de responder ao HT (Martins *et al.*, 2009), o glioblastoma humano, Gbm02, foi escolhido como nosso modelo de estudo. Sabe-se ainda que o Gbm02, assim como outros glioblastomas, guarda propriedades da glia normal, como a promoção do crescimento neuronal (Faria *et al.*, 2006).

Quando o Gbm02 foi tratado com T3 por 24h, não observamos alteração da morfologia poligonal destas células, comparativamente às células controle mantidas em meio sem soro por igual período (Figs. 15A e B). No entanto, imunocitoquímica para sinemina H/M revelou uma distribuição pontilhada desta proteína, que foi bem mais intensa após o tratamento com T3 (Figs. 16A e B).

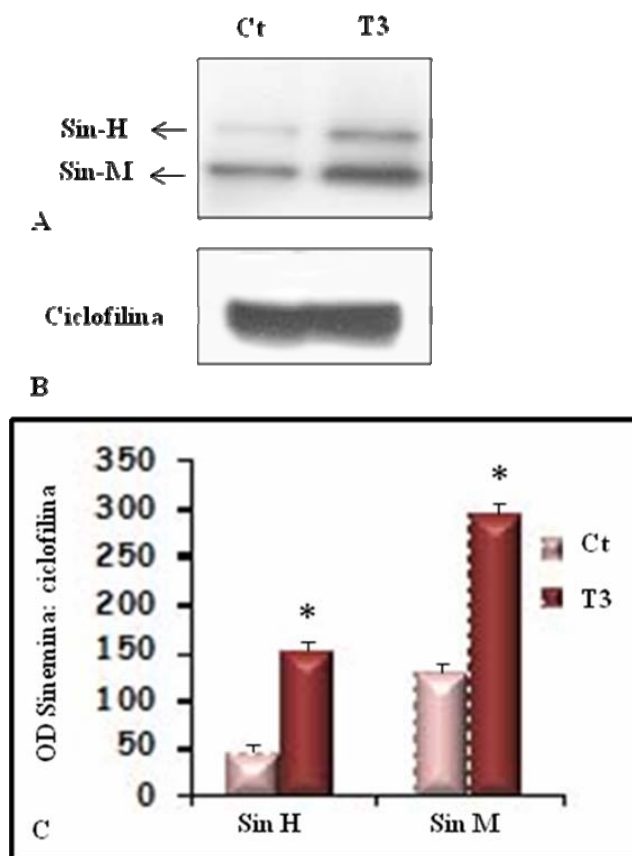
O aumento da imunodeteção de sinemina H/M em Gbm02 foi confirmado por Western blot. T3 aumentou as sínteses de sinemina H e M, em 3 e 2,5x, respectivamente. Para controle de carregamento foi utilizado ciclofilina, um receptor citossólico ligante de ciclosporina A (Figs. 17A-C).



**Figura 15: Análise morfológica de glioblastoma humano tratado com T3.** Microfotografia em contraste de fase de Gbm02 controle (A) e tratado com T3 por 24 horas (B). O tratamento com T3 não alterou o padrão morfológico das células.

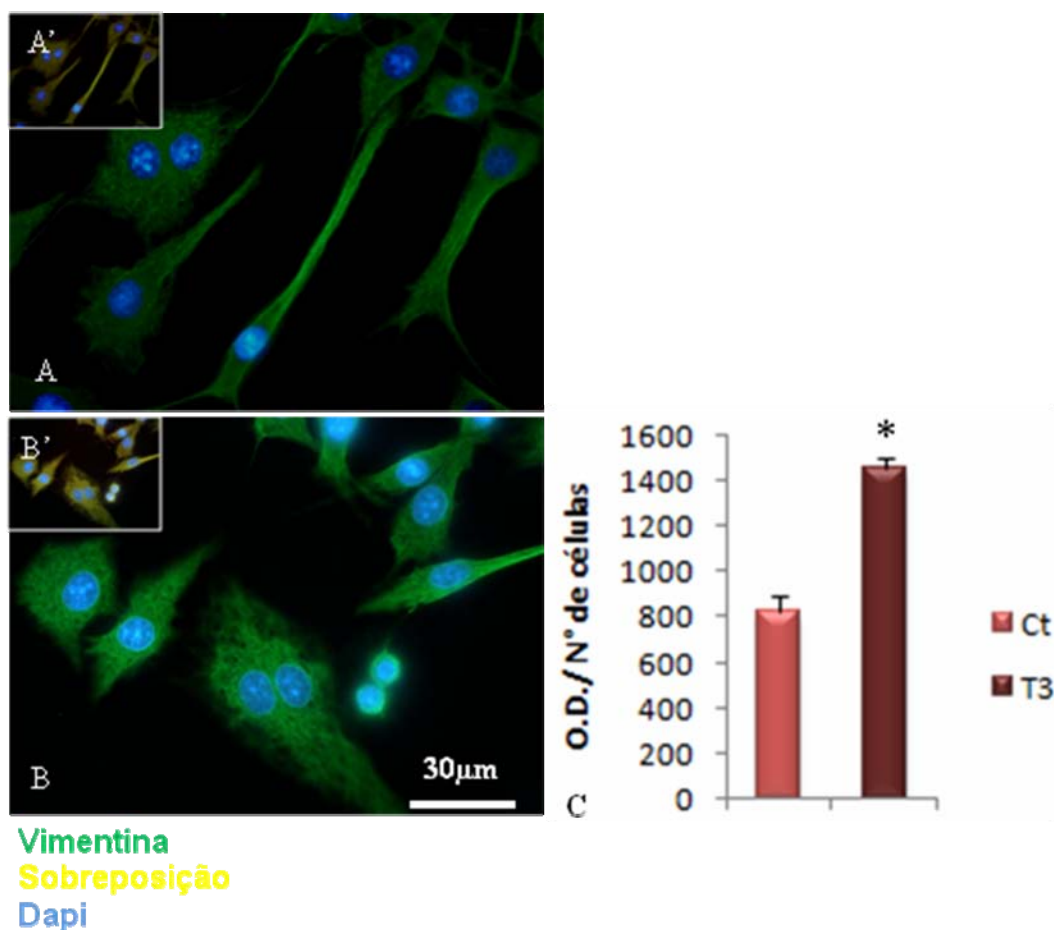


**Figura 16: Análise da distribuição de sinemina H/M em glioblastoma humano após tratamento com T3.** Imunocitoquímica para sinemina H/M em Gbm02 controle (A) e tratado com T3 (B) por 24 horas. T3 aumentou a imunoreatividade de sinemina, que foi encontrada com uma distribuição pontilhada por toda célula.



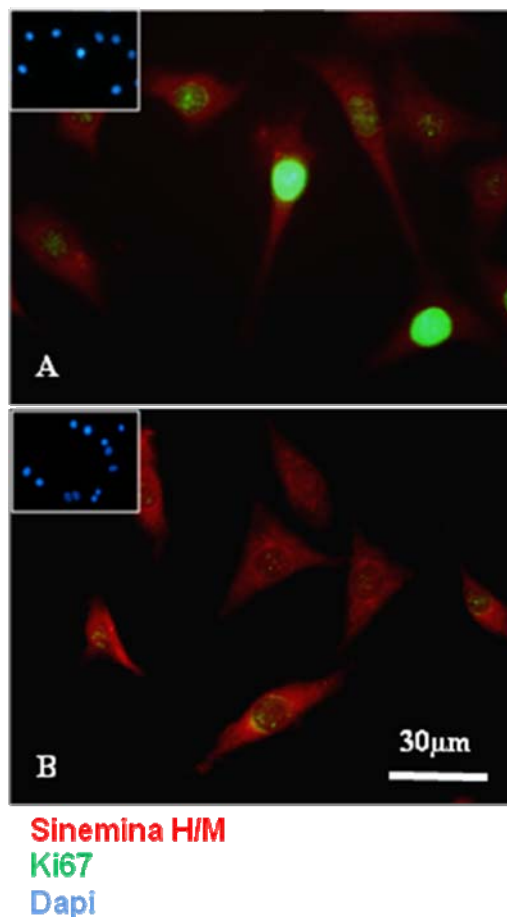
**Figura 17: Análise da modulação da síntese de sinemina H e M por T3 em glioblastoma humano.** Western blot representativo de sinemina H e M (A) e ciclofilina (B), usada como controle de carregamento, contra 20 $\mu$ g de proteína total de Gbm02 controle (Ct) e tratado com T3 por 24 horas. (C) Análise densitométrica das imunodeteccões das isoformas de sinemina e Ciclofilina. T3 induziu a síntese de ambas isoformas de sinemina nestas células. DO: densidade óptica. Média  $\pm$  DP ( $P < 0,05$ ;  $n=3$ ).

A presença concomitante de sinemina H/M e vimentina, além desta ser um reconhecido alvo do HT (Trentin & Moura Neto, 1995), nos levou a investigar a modulação de sua expressão em nosso sistema. De fato, assim como para sinemina H/M, T3 não alterou a distribuição filamentar da vimentina (Figs. 18A e B). Porém, comparativamente ao controle, T3 aumentou em quase 2x a intensidade de marcação da vimentina (Fig. 18C).



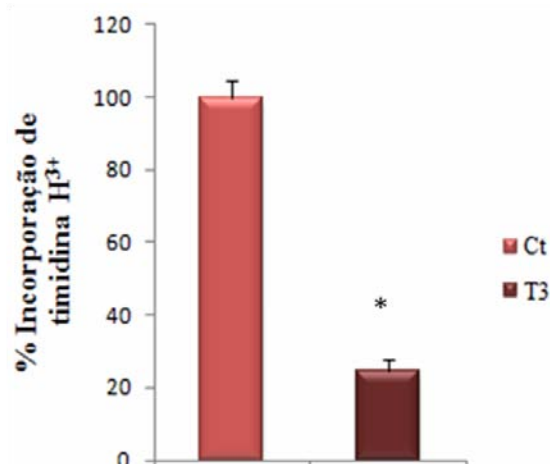
**Figura 18: Efeito do hormônio tireoideano sobre a distribuição de vimentina em glioblastoma humano.** Imunocitoquímica para vimentina em células controle (A) e tratadas com hormônio tireoideano (B). Insetos: (A' e B'): sobreposição das imunomarcações de sinemina H/M e vimentina. (C) Gráfico representando a indução da expressão de vimentina por T3 nestas células. D.O.: densidade óptica. Média  $\pm$ DP (n=3).

Além da diferenciação, T3 também modula a proliferação celular e, portanto, nós avaliamos seu efeito sobre o ciclo celular do Gbm02. Células expostas ao hormônio apresentaram uma redução da imunomarcação de Ki67, um marcador de células em mitose, concomitante ao aumento da reatividade antigênica para sinemina H/M (Figs. 19A e B). A diminui o da taxa proliferativa destas células tratadas com T3 foi confirmada pela redu o de 40% na incorpora o de timidina  $H^{3+}$  (Fig. 20).



**Figura 19: Efeito de T3 sobre o ciclo celular do glioblastoma humano.** Imunocitoquímica para sinemina H/M (vermelho) e Ki67 (verde) em Gbm02 controle (A) e tratados com T3 (B). Inseto: Marcação dos núcleos com Dapi (azul). O tratamento com T3 reduz a proliferação do Gbm02 enquanto aumenta a expressão de sinemina H/M.





**Figura 20: Efeito de T3 sobre a proliferação de glioblastoma humano.** Gráfico representando a redução da incorporação de timidina H<sup>3+</sup> após tratamento de Gbm02 com T3. Ct: controle. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Média  $\pm$  DP ( $p < 0,05$ ).

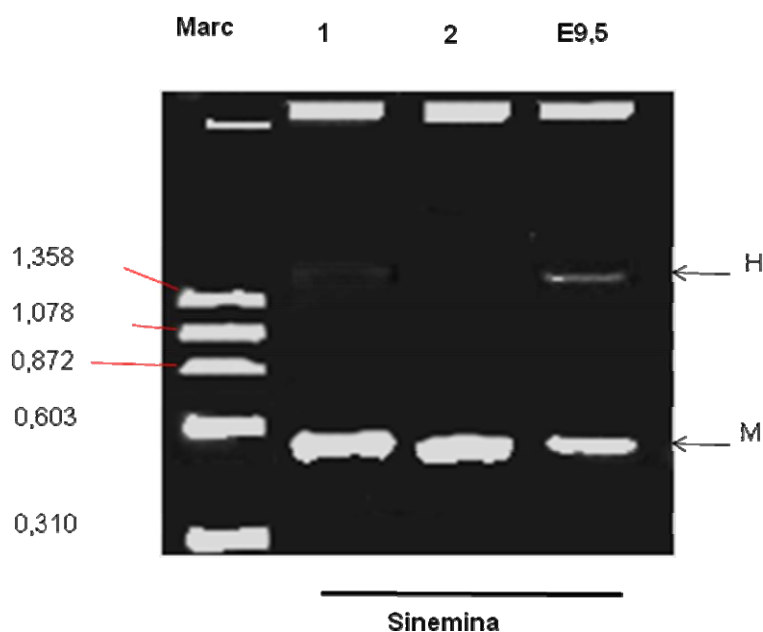
#### 5.4. PRESENÇA DE SINEMINA M EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS

A distribuição de sinemina H/M tem uma grande complexidade durante o curso do desenvolvimento embrionário de camundongo, quando é produzida tão precocemente quanto nestina e vimentina (Izmyrian *et al.*, 2008). Como demonstrado neste trabalho as sínteses das isoformas de sinemina são moduladas por T3 ao passo em que as células deixam de proliferar. Sabidamente T3 também regula o desenvolvimento biológico a partir das decisões entre proliferação e diferenciação celular. Face a estas assertivas nos perguntamos o quão precoce seria o surgimento de sinemina e se ela poderia ser um marcador do desenvolvimento.

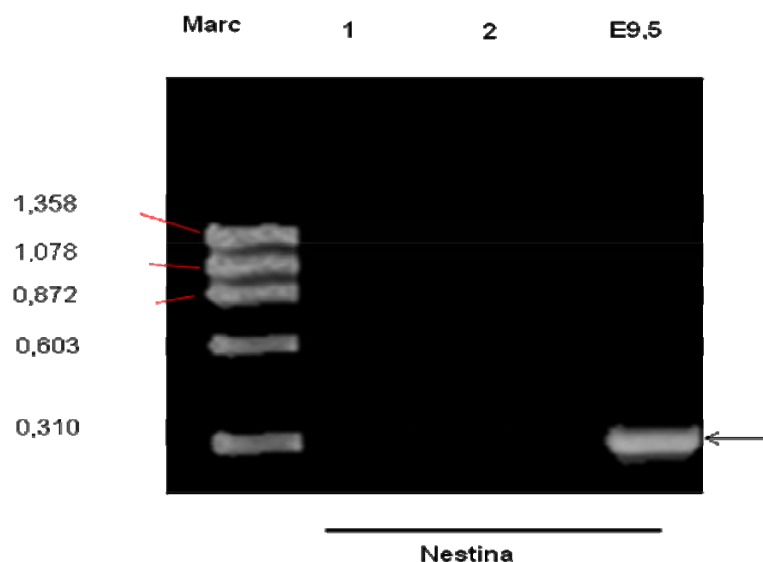
Para responder estas questões usamos como modelo de estudo as células-tronco embrionárias murinas, que diante da capacidade de gerar um

embrião completo torna-se uma excelente ferramenta para o estudo do desenvolvimento biológico.

Assim, analisamos a expressão de sinemina H/M nas linhagens ES-UMR7079 e ES-CGR8 através de RT-PCR. Em ambas as células encontramos precocemente o RNAm da sinemina M (Fig. 21), anterior mesmo à expressão de nestina (Fig. 22). Nas células ES-UMR, pudemos verificar uma expressão muito discreta expressão do RNAm de sinemina H (Fig. 21). Nestes ensaios utilizamos como controle positivo embrião de camundongo com 9,5 dias (E9,5), o qual expressava os RNAm codificantes das sineminas H e M e nestina (Figs. 21 e 22).



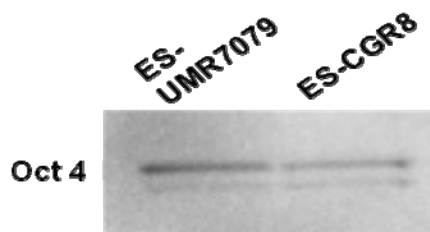
**Figura 21: Análise da expressão gênica de sinemina H e M em CTEs murinas.** RT-PCR para sinemina H e M em ES-UMR7079 (1), ES-CGR8 (2) e embrião de camundongo E9,5,5; usado como controle positivo. Foram detectados os RNAm codificantes para sinemina M nas três condições. A célula ES-UMR7079 apresenta uma discreta expressão do RNAm da sinemina H, também presente no coração. Marc: marcador de peso molecular em pares de base.



**Figura 22: Análise da expressão gênica de nestina em CTEs murinas.** RT-PCR para nestina em ES-UMR7079 (1), ES-CGR8 (2) e embrião de camundongo E9,5; usado como controle positivo. O RNAm da nestina foi detectado apenas no coração. Marc: marcador de peso molecular em pares de base.

Para confirmar a precocidade do surgimento de sinemina M investigamos sua possível imunodeteção nas células expressando Oct 3/4, marcador de pluripotência. De fato, através de imunocitoquímica realizada em colônias de células-USP, pudemos observar a co-presença de sinemina M e Oct 3/4 nestas células (Figs. 23A, B e C).

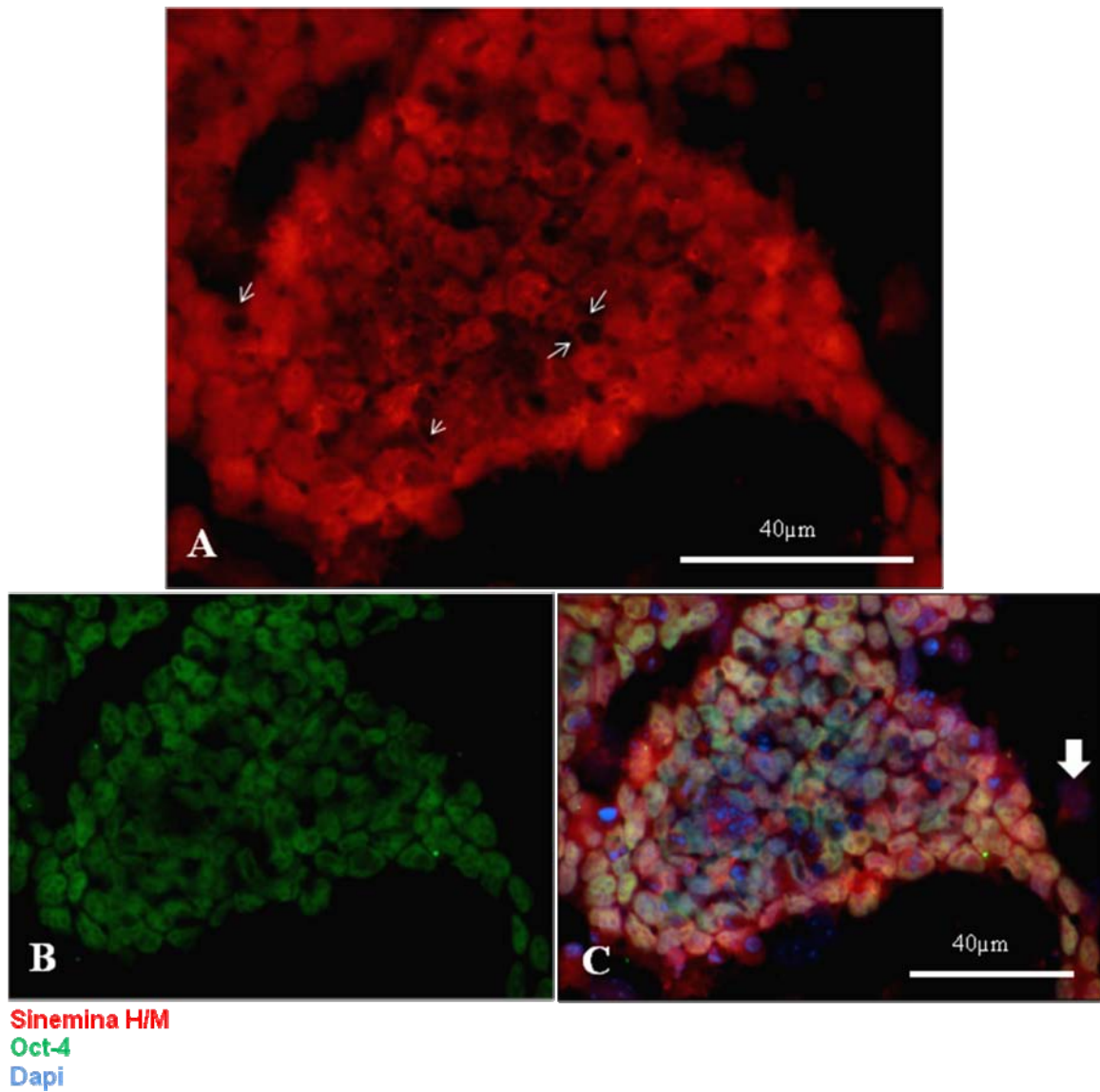
A pluripotencialidade das células ES-UMR7079 e ES-CGR8 foi confirmada por Western blot para Oct4. Na figura 24 pudemos detectar este marcador de pluripotencialidade em ambos os tipos celulares.



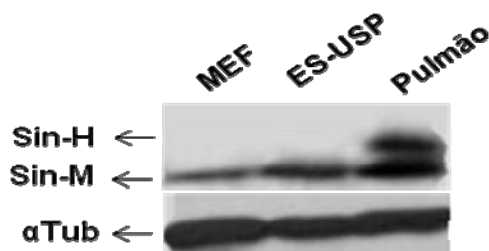
**Figura 23: Análise da distribuição de Oct 4 em CTEs murinas.** Western blot para Oct 3/4 em células ES-UMR7079 e ES-CGR8. A imunodeteccção de Oct4 confirma a pluripotencialidade destas células.

Para confirmar a precocidade da presença de sinemina M investigamos sua possível imunodeteccção nas células expressando Oct 3/4, marcador de pluripotência. De fato, através de imunocitoquímica realizada em colônias de células-USP, observamos a co-presença de sinemina M e Oct 3/4 nestas células (Figs. 24A-C) A sinemina também estava presente nos TNTs destas células (Fig. 24A). Algumas células fora da colônia Oct4 negativas também apresentavam a sinemina H/M (veja fig. 24C).

Western blot designado contra a monocamada de fibroblastos embrionários murinos (MEF) e colônias de ES-USP revelaram apenas a presença de sinemina M (Fig. 25A). Extrato de proteína total de pulmão foi utilizado como controle positivo, onde encontramos as sinemina H e M, e  $\alpha$ -tubulina como controle de carregamento (Fig. 25B).



**Figura 24: Análise da presença de sinemina H/M em CTEs murinas.** Imunocitoquímica para sinemina H/M (A) e Oct 3/4 em (B) colônia de ES-USP. (C) Sobreposição das imunomarcações. Os núcleos estão marcados por DAPI (azul). A sinemina H/M presente em células Oct 3/4 positivas também pode ser vista nos TNTs (setas). Algumas células fora da colônia apresentam apenas sinemina H/M (seta larga).

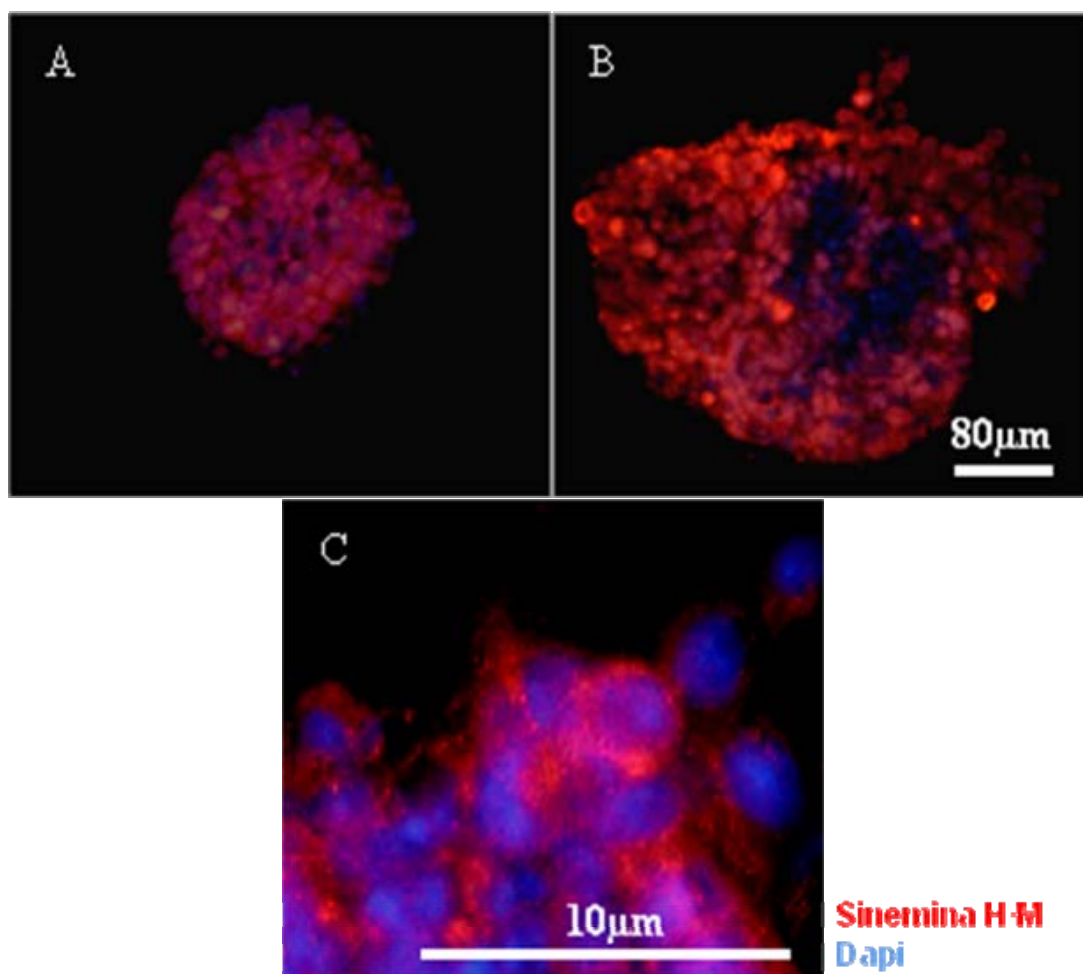


**Figura 25: Análise da distribuição de sinemina H/M em colônia de ES-USP.** Western blot para sinemina H e M e  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ Tub), usada como controle de carregamento, em fibroblasto murinos (MEF), colônia de ES-USP e pulmão (controle positivo).

#### 5.5. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS

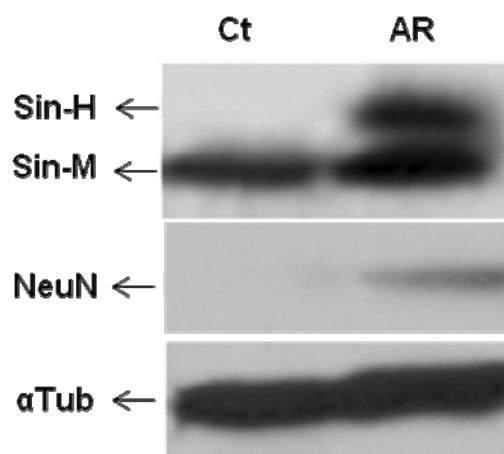
A precoce presença de sinemina M em células-tronco embrionárias fez com que nos perguntássemos como seria a distribuição das isoformas de sinemina no programa de diferenciação celular neural. Respondemos esta pergunta avaliando a distribuição destas proteínas em corpos embrióides, representação dos três folhetos embrionários *in vitro*.

Através de imunocitoquímica para sinemina H/M conseguimos detectá-la em corpos embrióides indiferenciados (controle; Fig. 26A) e em maior intensidade após tratamento com AR, indutor do fenótipo neural (Fig. 26B). Observando com mais cuidado a distribuição de sinemina H/M nestas estruturas verificamos que ela se apresenta pontilhada no interior das células (Fig. 26C).



**Figura 26: Análise da distribuição de sinemina H/M durante a diferenciação neural de CTEs murinas.** Imunocitoquímica para sinemina H/M em corpos embrióides controle (A) e tratados com AR (B e C em maior aumento). Os núcleos estão marcados por DAPI (azul). O tratamento com AR aumentou a imunoreatividade para sinemina H/M que se distribuiu da região perinuclear à periferia celular.

Através de Western blot pudemos observar que enquanto os corpos embrióides controle apresentam unicamente a sinemina M, os corpos embrióides tratados com AR além de a possuírem em maior quantidade a sinemina M, também passaram a apresentar a sinemina H e NeuN, antígeno nuclear neuronal. O controle de carregamento foi feito com  $\alpha$ -tubulina (Fig. 27).



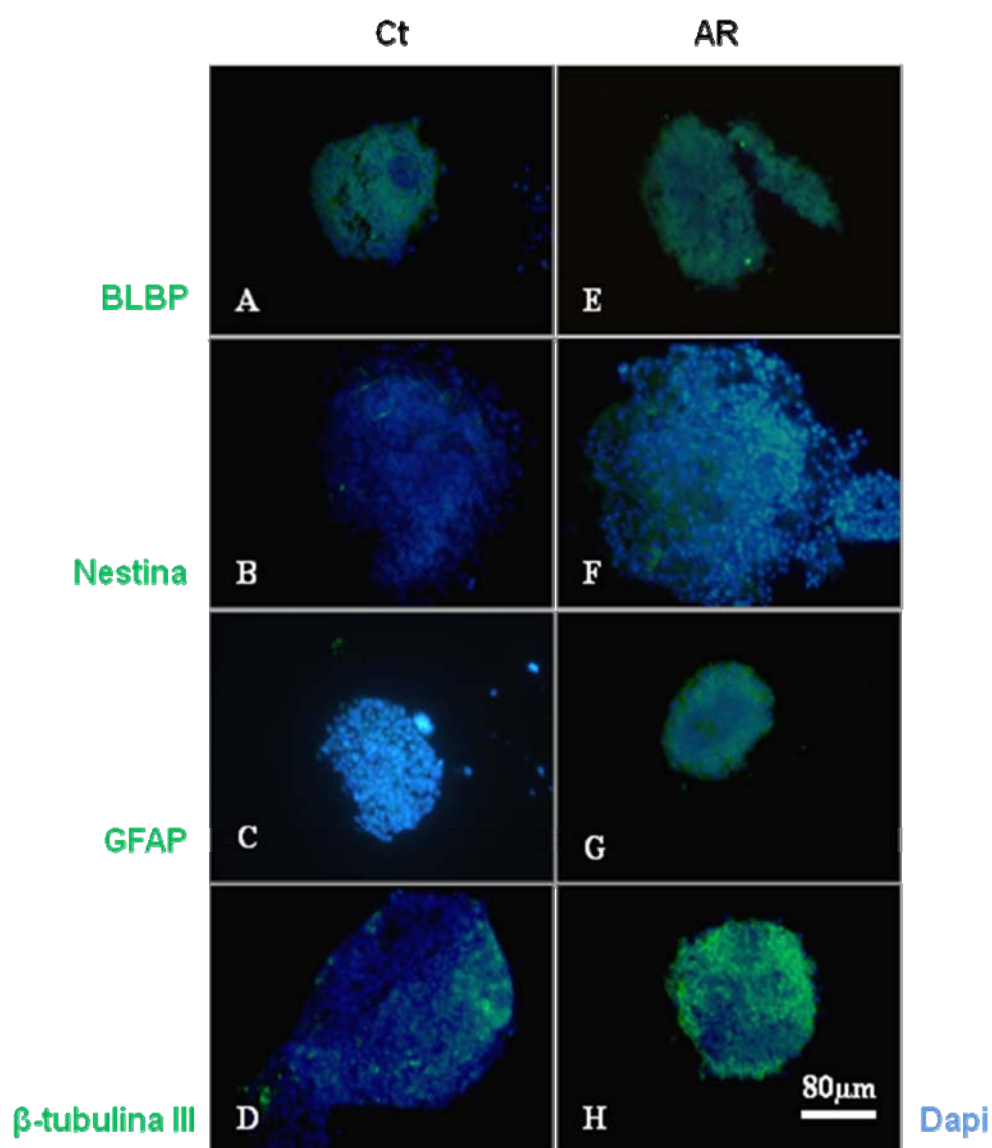
**Figura 27: Caracterização da distribuição de sinemina H e M após indução neural de CTEs murinas por AR.** Western blot representativo para sinemina H e M, NeuN e  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ Tub), usada como controle de carregamento, em corpos embriões controle (Ct) e tratados com AR. A indução da diferenciação neural foi acompanhada por um aumento na imunodeteção de sinemina M e indução de sinemina H e NeuN.

A distribuição dos marcadores neurais clássicos foi investigada por imunocitoquímica dos corpos embriões e pela análise da sua intensidade de fluorescência. Assim, pudemos verificar que os controles apresentavam os marcadores de progenitores neurais BLBP, proteína de ligação a lipídio de encéfalo e em menor grau nestina, além GFAP (marcador astrocitário) e  $\beta$ -tubulina III (marcador neuronal) que tiveram suas imunoreatividades  $\sim 2$  vezes aumentadas por AR. Este tratamento não alterou significativamente a imunoreatividade de BLBP (Figs. 28 e 29).

Como  $\beta$ -tubulina III estava presente em EBs controle decidimos realizar a diferenciação terminal de neurônios a partir de CTEs para avaliar uma possível expressão de sinemina nestas células. Para tal, EBs previamente tratados com AR foram cultivados sobre laminina na presença de fator de crescimento de fibroblasto, FGF (EBs plaqueados).

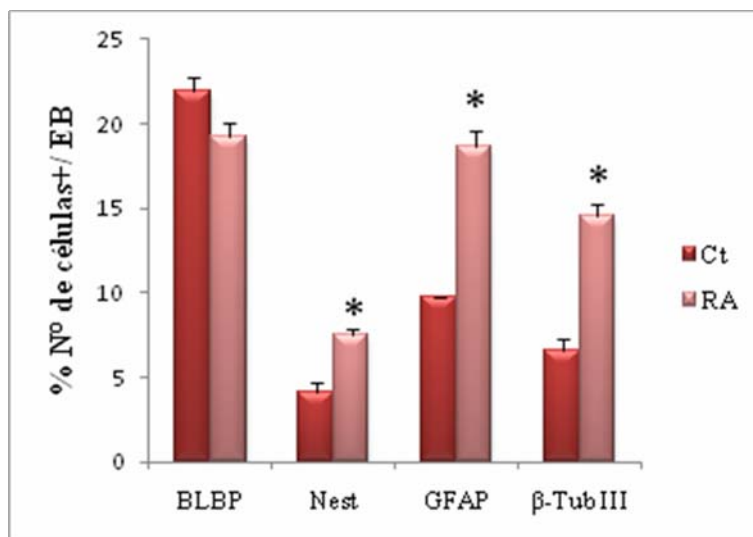


Imunocitoquímica para sinemina H/M e  $\beta$ -tubulina III foi realizada nesses EBs plaqueados e analisada em microscópio confocal. Detectamos a presença de sinemina H/M nas células restritas ao EB e em algumas células que migraram a partir deste, mas que não continham  $\beta$ -tubulina III, possivelmente glia radial. Também foi possível observar neurônios  $\beta$ -tubulina III positivos migrando (Fig. 30).



**Figura 28: Caracterização da distribuição de marcadores neurais após indução neural de CTEs murinas por AR.** Imunocitoquímica para os marcadores neurais BLBP (A e E), nestina (B e F), GFAP (C e G) e  $\beta$ -tubulina III ( $\beta$ -Tub III; D e H) em corpos embriões controle (A-D) e tratados com AR (E-H). Os núcleos estão marcados por Dapi (azul). Corpos embriões

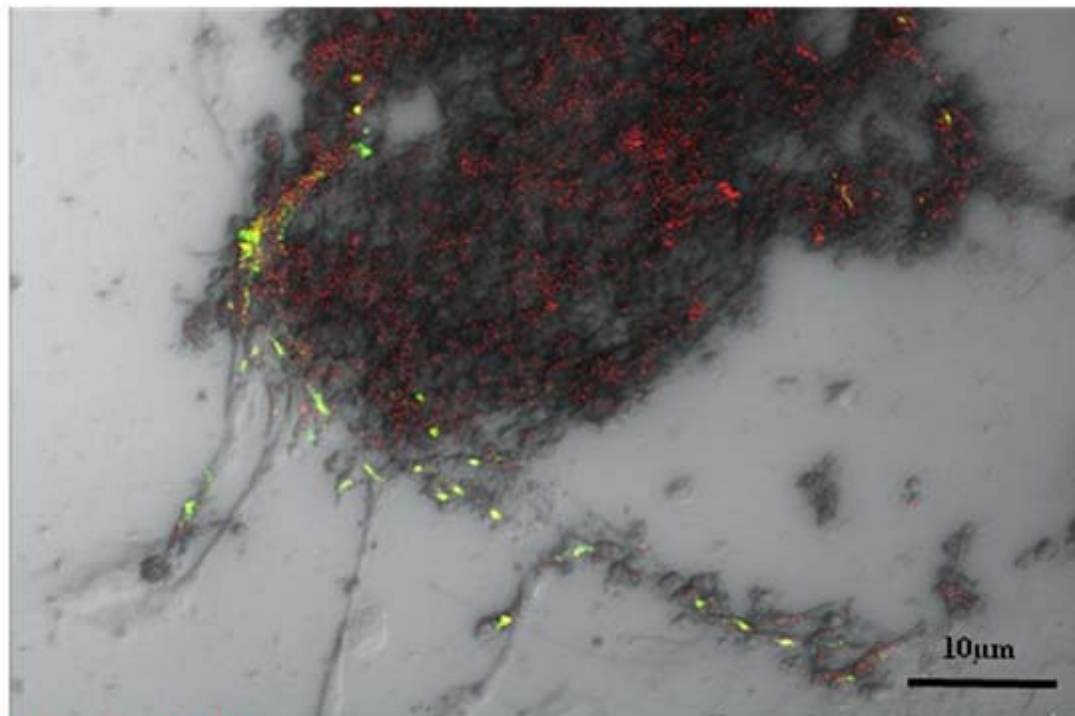
controle apresentam BLBP e em menor grau nestina, GFAP e  $\beta$ -tubulina III. O tratamento com AR aumentou a imunoreatividade de nestina, GFAP e  $\beta$ -tubulina III.



**Figura 29: Análise da imunoreatividade dos marcadores neurais durante a diferenciação neural de CTEs murinas.** Gráfico representando o número de células expressando BLBP, nestina (Nest), GFAP e  $\beta$ -tubulina III ( $\beta$ -Tub III) em corpos embriões controle (Ct) e tratados com AR. Média  $\pm$  DP \* Diferença significativa de cada marcador em relação ao controle ( $P < 0,05$ ;  $n=3$ ).

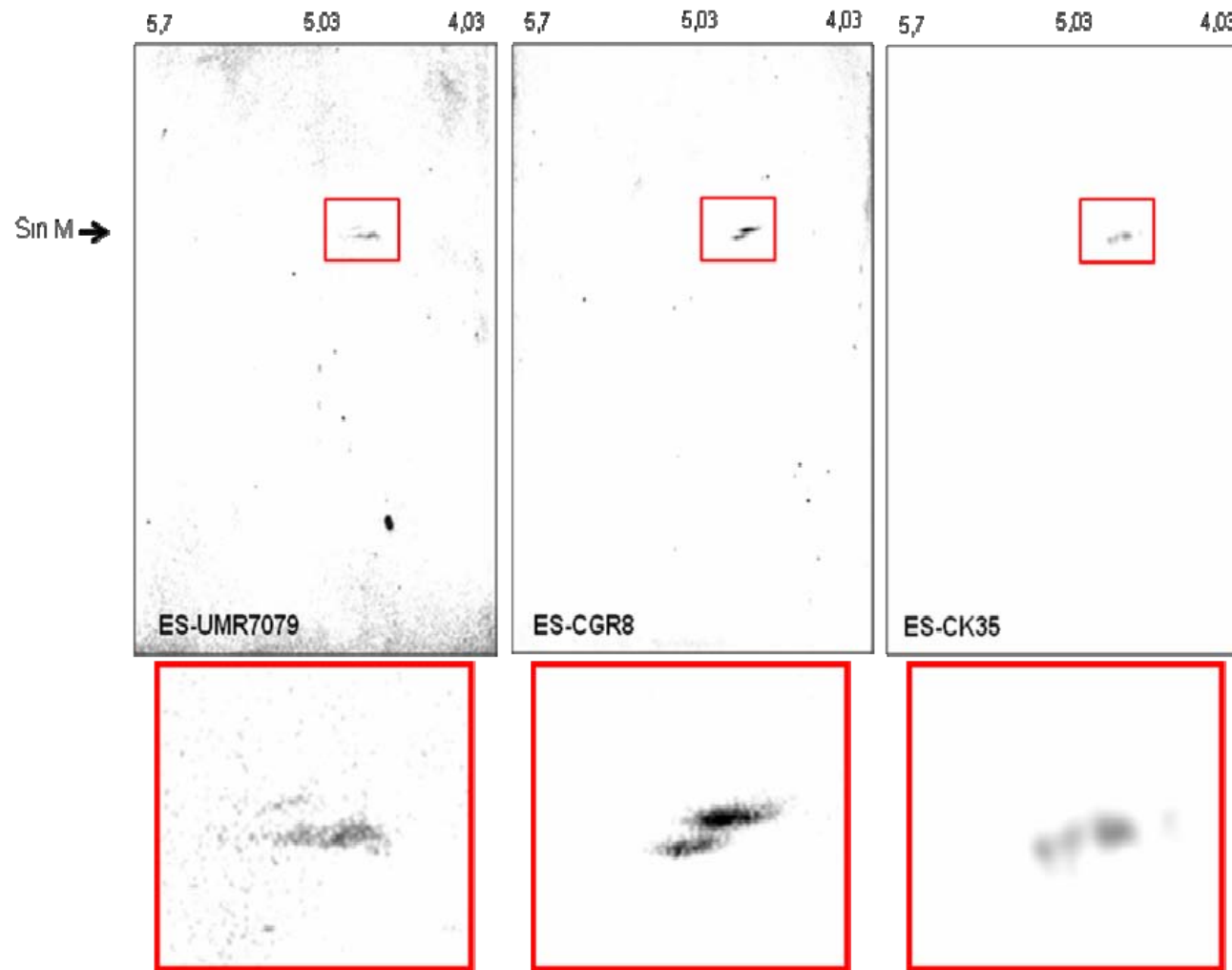
A distribuição das isoformas de sinemina durante o desenvolvimento embrionário de camundongos (Izmyrian *et al.*, 2008) e a diferenciação das células neurais demonstrada neste trabalho sugere um alto grau de complexidade na expressão destas proteínas. Para melhor inferir esta hipótese analisamos o perfil eletroforético da sinemina M em CTEs pluripotentes através de eletroforese bidimensional (isoeletrofocalização, então SDS-PAGE) seguida de Western blot dos extratos de proteína total das células ES-UMR7079, ES-CGR8 e ES-CK35 (Fig. 31). De fato, encontramos a imunomarcagem da sinemina M nestas três células com um PI de aproximadamente 5,03, muito

próximo de seu PI teórico (5,31). Porém, em cada tipo celular pudemos observar variações isoeletricas na sinemina M encontrada.



Sinemina H/M  
 $\beta$ -Tubulina III  
Dapi

**Figura 30: Caracterização da distribuição de sinemina H/M após indução da diferenciação neuronal terminal.** Imunocitoquímica para sinemina H/M (vermelho) e  $\beta$ -tubulina III (verde) em corpos embriões plaqueados visto em contraste de fase. A distribuição de sinemina H/M fica essencialmente restrita ao EB. Algumas células que migraram do EB também apresentam sinemina H/M, mas são negativas para  $\beta$ -tubulina III, possivelmente glia radial. Os neurônios que migraram do EB apresentam unicamente  $\beta$ -tubulina III.



**Figura 31: Perfil eletroforético da sinemina M presente nas CTEs murinas em gel bidimensional.** Extrato total de proteína das células ES-UMR70-79 (A), ES-CGR8 (B) e ES-CK35 foram submetidos à eletroforese bidimensional seguida por Western blot. Foi detectada uma forte imunomarcção de sinemina M com PI de ~5,03 (seta) nas células. PI indicado na abscissa. As caixas em vermelho mostram em maior detalhe as variantes isoelétricas da sinemina M presentes nestas CTEs.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os resultados apresentados nesta tese indicam uma grande complexidade da distribuição das isoformas de sinemina durante o desenvolvimento, analisado pelo prisma da diferenciação neural. Sinemina M é precocemente encontrada em células-tronco embrionárias murinas. A presença de sinemina H serve como um indicador do início do comprometimento fenotípico neural. A presença de sinemina H também parece ser um marcador testemunho do surgimento de gliomas no SN. Este repertório da distribuição de sinemina é regulado pelo hormônio tireoideano, o hormônio-chave do desenvolvimento dos organismos.

### 6.2. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA NO SISTEMA NERVOSO

Analizamos a distribuição *in toto* de sinemina H/M em embrião de camundongo E15,5, estágio de desenvolvimento quando todas as isoformas de sinemina e seus parceiros em músculo (vimentina e desmina) e SN (nestina, vimentina e GFAP) são encontrados (Izmyrian *et al.*, 2008). Assim, pudemos detectar a sinemina H/M na musculatura estriada, cardíaca e lisa, SNC e SNP, além da epiderme que assim como o SN deriva do ectoderme, o que talvez justifique a presença desta proteína neste tecido.

De fato, a sinemina que foi inicialmente caracterizada em células musculares (Granger & Lazarides, 1980) é precocemente encontrada nestas células (Izmyrian *et al.*, 2008; Titeux *et al.*, 2001). Em músculos, a sinemina participa da ligação dos FIs

na linha-Z através de sua ligação com  $\alpha$ -actinina e dos contatos focais via interações com vinculina,  $\alpha$ -distribrevina e  $\alpha$ -actinina (Bellin *et al.*, 1999; 2001; Mizuno *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2004). Mais interessante ainda, a sinemina H/M participa da via de sinalização em cardiomiócitos neonatal e adulto ancorando a proteína cinase A, PKA, (Russel *et al.*, 2006). Esta função provavelmente pode ser estendida ao SN e corroborar o papel fisiológico da sinemina H/M, que encontramos no SNC e SNP, representado pela imunomarcagem da saída dos nervos espinhais e talvez do plexo mioentérico, já que encontramos uma forte imunomarcagem desta proteína no intestino dos camundongos E15,5. Vale ainda salientar que nos plexos entéricos encontramos além de neurônios, uma população glial reconhecida por GFAP (Emerich *et al.*, 2004) e que poderia apresentar sinemina.

No SN conseguimos discriminar a distribuição das isoformas H e M de sinemina por Western blot ou RT-PCR. Assim, verificamos que astrócitos corticais neonato (P0) apresentam apenas a sinemina M e que a linhagem astrocitária cultivada por 13-15 dias apresentava estas duas isoformas (H e M) gliais de sinemina. Porém, o SN de camundongos adultos (encéfalo, cerebelo, córtex, e mesencéfalo) continha apenas a sinemina M. Esta distribuição progressiva das sineminas H e M também foi demonstrada *in vivo* durante o desenvolvimento embriológico de camundongos. A análise da expressão gênica das sinemina H e M por RT-PCR demonstrou que a sinemina M já é expressa em E5, junto com nestina e vimentina. Ao contrário, a sinemina H só começa a ser expressa em E9,5 (Izmyrian *et al.*, 2008).

Talvez essa distribuição progressiva das isoformas H e M de sinemina reflita um perfil transitório da distribuição de sinemina H, quando células perfazendo seu programa de diferenciação expressariam sinemina H até o momento em que

amadureceriam. Aí, a sinemina H talvez fosse substituída definitivamente por outras proteínas marcadoras de diferenciação terminal, como por exemplo, GFAP em astrócitos.

Corroborando a essa hipótese, demonstramos por RT-PCR que a expressão de sinemina H e M era concomitante à expressão de nestina, vimentina e GFAP em astrócitos e também na célula de Schwann, representante glial do SNP. De fato, transições na distribuição de proteínas marcadoras da diferenciação celular são comuns no SN (Eliasson *et al.*, 1999; Landry *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1993). Mais ainda, a presença da própria sinemina H/M foi mostrada transitoriamente em células contendo nestina, vimentina e GFAP, provavelmente glia radial. Curiosamente, após a maturação astrocitária nem mesmo a sinemina M foi encontrada (Sultana *et al.*, 2002).

Além da macroglia, a sinemina H/M está presente na microglia e HUVEC, correspondente das células endoteliais dos vasos que irrigam o SN, mais ainda marcados junto à gliomas. Nestas células a sinemina H/M apresentou a distribuição filamentar típica das proteínas de FI, da região perinuclear à periferia da célula. Porém, de maneira interessante e exclusiva, observamos que a sinemina H/M encontra-se nos domínios ricos em actina como a região do córtex celular e TNTs. Nestas regiões não encontramos a vimentina, a mais importante parceira da sinemina na formação de heteropolímeros no SN (Jing *et al.*, 2007; Khanamiryan *et al.*, 2008; Titeux *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2004).

A presença de sinemina H/M nos TNTs caracterizada neste trabalho ajuda a iluminar a função biológica desta proteína, apontando pela primeira vez que este FI é um dos facilitadores da interconexão celular. De fato, a demonstração de que a sinemina H/M regula a dinâmica do citoesqueleto de actina, polimerização de actina

e sua interação com  $\alpha$ -actinina (Pan *et al.*, 2008), nos permite pensar que ela seria crucial à formação e estabilidade dos TNTs. Obviamente, ensaios futuros com silenciamento desta proteína em astrócitos ou gliomas, onde nosso laboratório demonstrou recentemente a estrutura e propriedades elásticas dos TNTs (Pontes *et al.*, 2008), serão necessários para confirmar nossa hipótese.

### 6.3. PRESENÇA DE SINEMINA EM TUMORES NEURAIIS

Os tumores neurais passam a apresentar *de novo* marcadores que não são mais presentes em células maduras, como nestina (Dahestrand *et al.*, 1992; Ikota *et al.*, 2005) e mais recentemente vem sendo demonstrada que a sinemina H/M também é expressa em gliomas (Jing *et al.*, 2005; 2007).

Aqui, analisamos a expressão *in situ* de sinemina H/M no SN adulto humano sadio, substância branca, sítio de predileção para surgimento de gliomas, e plexo coróide, além dos tumores gliais, glioblastoma e ependimoma.

No tecido sadio, pudemos observar uma discretíssima imunomarcção de sinemina H/M na substância branca. No entanto, o plexo coróide apresentou uma distinta marcação de sinemina H/M. Esta presença de sinemina H/M é bastante interessante, pois o plexo coróide, assim como a microglia, onde também demonstramos sua presença, estão envolvidos na defesa do SNC. De fato, o plexo coróide é reconhecido como a primeira linha de defesa do SNC, chegando mesmo a apresentar o marcador de histocompatibilidade classe I, MHC I (revisado por Emerich *et al.*, 2004).

Em ependimoma há uma intensa marcação de sinemina H/M nas células que constituem as rosetas ependimárias. Neste tumor não é raro encontrar o promotor



do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) metilado, o que inativa este gene supressor de tumor (Michalowiski *et al.*, 2006). Embora, a sinemina H/M não esteja envolvida com apoptose seu silenciamento reduz a proliferação de gliomas (Pan *et al.*, 2008). A forte presença de sinemina H/M, quando associada à inativação de TRAIL em ependimomas, talvez favoreça o desenvolvimento e/ou a evolução destes tumores.

Por imunohistoquímica detectamos a sinemina H/M em glioblastomas, nas células que também continham GFAP. A análise por Western blot de diferentes glioblastomas humanos revelou que estas células expressavam a sinemina M, já vista em encéfalo adulto de camundongo, e a sinemina H, encontrada anteriormente em linhagem astrocitária com 13-15 dias de cultura.

Como discutido anteriormente, a sinemina H muito possivelmente é um marcador de células comprometidas com o fenótipo neural em estágio de diferenciação. Nos gliomas humanos ela está presente *de novo*, assim como a nestina.

Provavelmente quando analisarmos as isoformas de sinemina presentes na substância branca de humanos adultos por Western blot ou RT-PCR encontraremos apenas a sinemina M. Mais ainda, isto fortaleceria a nossa hipótese de que a sinemina H pode servir como um potencial marcador de tumores gliais, ao menos de glioblastomas, e talvez ependimomas.

A presença de sinemina H em gliomas, assim como a de nestina (Stronjnik *et al.*, 2007), talvez possa também ser usada para inferir o prognóstico de malignidade destes tumores. De fato, foi recentemente demonstrado que o silenciamento da sinemina presente em gliomas reduz a migração destas células via regulação da dinâmica dos microfilamentos e suas proteínas associadas, quando a ausência de

sinemina reduz a taxa de actina filamentar e sua interação com  $\alpha$ -actinina (Pan *et al.*, 2008). Interessante ainda, a expressão de sinemina H em camundongos E9,5 coincide com o período de migração das células da crista neural (Izmyrian *et al.*, 2008). Assim, nos permitimos pensar que como as células neurais derivadas da crista neural, a síntese *de novo* da sinemina H pelos glioblastomas talvez represente um resgate da “memória embriológica”, envolvido com a aparente “necessidade” destas células de migrarem. Sabidamente tumores mais malignos, como o glioblastoma, possuem uma grande capacidade migratória, podendo invadir grandes extensões do parênquima sadio adjacente.

#### 6.4. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE SINEMINA H E M PELO HORMÔNIO TIREOIDEANO, T3, EM GLIOBLASTOMA HUMANO

O complexo padrão de distribuição de sinemina H e M durante o desenvolvimento demonstrado por Izmyrian *et al.* (2008) e no curso da diferenciação celular, como demonstrado neste trabalho e anteriormente sugerido por Sultana *et al.* (2002) nos levou a investigar se a distribuição destas isoformas seria modulada pelo HT, o qual regula o desenvolvimento dos indivíduos via modulação da expressão de proteínas (Ahmed *et al.*, 2008; de Escobar *et al.*, 2007; Dussault & Ruel, 1987; König & Moura Neto, 2002; Zoeller & Rovet, 2004).

Nosso laboratório vem ao longo dos últimos anos mostrando o papel do T3 na diferenciação neural. Particularmente quanto ao efeito do hormônio tireoideano sobre os astrócitos, demonstramos a importância deste hormônio na regulação da proliferação (Trentin & Moura Neto, 1995) e diferenciação astrocitária (Trentin *et al.*, 1995; 2001), promovendo um significativo aumento da síntese protéica, sobretudo nos astrócitos de hemisfério cerebral de ratos recém-nascidos (Lima *et al.*, 1998),

além dos efeitos sobre as proteínas do citoesqueleto (König & Moura Neto, 2002; Trentin, 2006).

O tratamento de astrócitos corticais com 50nM de T3 durante três dias consecutivos induz alterações morfológicas nestas células, que substituem sua forma protoplasmática sem prolongamentos por uma morfologia fibrosa, com formação de longos prolongamentos acompanhada pelo rearranjo de GFAP (Trentin *et al.*, 1995). Porém, o tratamento do glioblastoma humano, Gbm02 com 50nM de T3 durante 24 horas não foi capaz de alterar o padrão morfológico destas células, o qual permaneceu poligonal, tampouco alterou a distribuição de sinemina H/M nestas células, ainda que tenha promovido um aumento na intensidade de sua marcação. É possível que ocorra primeiramente uma mudança de expressão protéica e só depois uma reorganização do citoesqueleto com alteração do padrão morfológico.

A distribuição das isoformas de sinemina H/M é claramente regulada por T3. Este hormônio aumentou em 3 vezes o nível de sinemina H e em aproximadamente 2,5 vezes o nível de sinemina M, comparativamente às células controle. Esta rápida indução das isoformas de sinemina pela curta exposição ao T3 parece realmente caracterizar um passo a diante no programa de diferenciação celular, já que este mesmo tratamento em astrócitos corticais e C6 foi capaz de rapidamente induzir a diferenciação astrocitária avaliada por sua alteração morfológica acompanhada de aumento na síntese e fosforilação de GFAP (Zamoner *et al.*, 2007).

Embora sugerindo uma distribuição seqüencial das isoformas de sinemina H e M, e a supressão de sinemina H ao fim da diferenciação astrocitária, sua indução por T3 não invalida nosso modelo hipotético. Isto porque a curta exposição do Gbm02 ao hormônio tireoideano, em nossas condições experimentais, possivelmente iniciou o programa de diferenciação celular sem, no entanto, completá-lo. Provavelmente

uma exposição hormonal prolongada culminaria na supressão desta proteína. Seria interessante analisar a cinética do efeito do tratamento prolongado com T3 sobre a síntese das sineminas. Mais ainda, observamos um aumento de quase 2 vezes na imunoreatividade para vimentina, a qual é diminuída em astrócitos corticais tratados durante 3 dias com T3 (Lima *et al.*, 1998).

Na dependência do estágio de desenvolvimento em que o encéfalo se encontra, T3 pode induzir a diferenciação ou a proliferação de astrócitos cerebelares. Enquanto estruturas mais jovens respondem aos hormônios tireoideanos com proliferação, como o cerebelo de ratos recém-nascidos, as células de estruturas encefálicas mais maduras diferenciam-se, como no caso do cerebelo pós-natal de 10 dias (Lima *et al.*, 1998). Assim, investigamos o efeito de T3 sobre a proliferação de Gbm02 avaliada a partir da incorporação de timidina  $H^{3+}$ , e constatamos que o tratamento hormonal diminuiu em 40% a proliferação destas células. De fato, foi anteriormente demonstrado que T3 também pode inibir a proliferação celular via regulação negativa da Ciclina D1, uma ciclina oncogênica que desenvolve um papel crítico na progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Natsume *et al.*, 2003).

A indução da síntese das sineminas H e M por T3 poderia contribuir para a polimerização da actina (Pan *et al.*, 2008), a qual também é diretamente influenciada por HT (De *et al.*, 1994; Leonard *et al.*, 2008; Stachelek *et al.* 2000) em um mecanismo de retroalimentação. Tal mecanismo poderia favorecer a comunicação intercelular via TNTs.

O efeito do hormônio tireoideano também é caracterizado pela indução da síntese de fatores de crescimento e citocinas por suas células-alvo (König & Moura Neto, 2002; Trentin, 2006). Dentre estes fatores solúveis, encontramos a indução de

um fator IGF-símile pelos astrócitos corticais e de EGF, TNF $\beta$  e FGFb pelos astrócitos cerebelares (Gomes *et al.*, 1999), além de TGF- $\beta$  (revisto por Puzianowska-Kuznicka *et al.*, 2006).

Fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que orchestra o desenvolvimento da glia radial, induzindo sua diferenciação em astrócitos (Stipursky *et al.*, 2007) é um bom candidato para mediar os efeitos do T3 na regulação da distribuição das isoformas de sinemina, pois suas alterações em glia radial já foram reportadas (Sultana *et al.*, 2002).

#### 6.5. PRESENÇA DE SINEMINA M EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS

A presença de sinemina H/M que verificamos no plexo coróide, sítio neurogênico mesmo em adultos, quando as células-tronco que abriga proliferam em resposta ao trauma (Emerich *et al.*, 2004) e na glia radial, reconhecido progenitor neural (Izmyrian *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2002) nos fez investigar a possível presença de alguma de suas isoformas em CTEs.

Assim, fomos investigar se as isoformas de sinemina H e/ou M estariam presentes nas células-tronco embrionárias pluripotentes murinas que representam *in vitro* o estágio precoce de blastocisto e são capazes de gerar todas as células que constituem o indivíduo (Wobus & Boheler, 2005).

Quando analisamos a expressão gênica de duas diferentes linhagens de CTEs, ES-UMR7079 e ES-CGR8 pudemos observar que ambos os tipos celulares expressavam o RNAm da sinemina M. A célula ES-UMR7079 possui ainda uma discreta expressão de sinemina H. Interessantemente, a expressão do RNAm de

sinemina não foi concomitante à expressão do RNAm da nestina, marcador de célula-tronco neural.

A expressão de sinemina M antecedendo a de nestina observada nestas células nos sugere que não há correlação entre sua expressão e o fenótipo neuroectodérmico. Mais ainda, conseguimos detectar por Western blot a expressão protéica de Oct-4 nestas células, confirmando sua pluripotência.

Por imunocitoquímica, conseguimos verificar que colônias de ES-USP co-apresentavam Oct-4 e sinemina M, isoforma confirmada por Western blot. Esta técnica também mostrou a presença de sinemina M na MEF.

A sinemina M encontrada nas células ES-USP também estava presente nos TNTs que interconectavam estas células. Isto nos sugere que a expressão precoce desta proteína nas CTEs poderia favorecer seu desenvolvimento. De fato, foi demonstrado em *Drosophila* que os contatos intercelulares favorecem a auto-renovação das células-tronco de linhagem germinativa (revisto por Doestch, 2003). Recentemente foi reportado que as junções celulares tipo *gap* também modulam a diferenciação neuroectodermal de CTEs (Parekkadan *et al.*, 2008).

A sinemina M presente em CTEs talvez esteja aí interagindo com as isoformas 1 e 2 de lamina B, Fl presente na membrana nuclear e nucleoplasma de CTEs (Constantinescu *et al.*, 2006). A confirmação da interação destas proteínas e da presença de sinemina no interior do núcleo implicaria esta proteína na transmissão de sinais da superfície celular, onde é expressivamente encontrada, como demonstramos, até o núcleo. De fato, detectamos por imunocitoquímica uma forte marcação de sinemina H/M na região nuclear de alguns astrócitos, diferentemente da marcação perinuclear típica das proteínas de Fl. Para confirmar a presença de sinemina nos núcleos será futuramente realizado o isolamento e

fracionamento desta estrutura. Assim poderemos confirmar a presença de sinemina nos núcleos e definir sua localização (no nucleoplasma ou restrita à membrana nuclear).

Se realmente presente nos núcleos, a sinemina M poderia mesmo regular o estado de pluripotência destas células via ancoragem de PKA (Russel *et al.*, 2006). De fato, PKA também atua na regulação da condensação de cromatina (Lester *et al.*, 1997), a qual tem um papel crucial na manutenção da pluripotência das CTEs (Doestch *et al.*, 2003).

A distribuição precoce de sinemina M em CTEs e a síntese *de novo* de sinemina H e M que observamos em glioblastomas nos sugere que talvez estas proteínas também sejam encontradas em células-tronco oncogênicas, assim como outros marcadores de células-tronco presentes em gliomas: CD133, nestina, SOX-2, Musashi, etc., cujas distribuições diferem de acordo com o grau de malignidade tumoral (Ma *et al.*, 2007). A favor da nossa hipótese, CD133 e nestina foram recentemente caracterizadas na linhagem de célula-tronco oncogênica WJ2, isolada de glioblastoma humano (Wang *et al.*, 2008).

#### 6.6. DISTRIBUIÇÃO DAS ISOFORMAS DE SINEMINA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS

O padrão de distribuição das isoformas H e M de sinemina nas células gliais sadias e em condições patológicas, gliomas, além de sua complexidade durante o curso do desenvolvimento embrionário de camundongo (Izmyrian *et al.*, 2008) e a presença de sinemina M em CTEs pluripotentes nos conduziu a análise da

distribuição das isoformas de sinemina durante a diferenciação neural a partir destas células.

A indução neural de CTEs foi induzida após formação de corpos embrióides (EB), que representam os três folhetos embrionários. Estes corpos embrióides foram, então, tratados com AR durante quatro dias. Pudemos observar que todas as células constituintes dos corpos embrióides controle apresentam apenas a isoforma M de sinemina. Os marcadores de progenitores neurais, BLBP e em menor grau, nestina, além de GFAP, marcador glial e  $\beta$ -tubulina III, marcador neuronal, também foram encontrados nos corpos embrióides controle, ainda que com menor intensidade.

Durante o programa de diferenciação neural disparado pelo tratamento com AR houve a indução da presença de sinemina H, a caracterizando como um marcador da diferenciação neural. A indução da expressão de sinemina H é acompanhada pela indução de NeuN, marcador de neurônios pós-mitóticos em EBs tratados com AR (Mullen *et al.*, 1992).

Assim como a sinemina M, presente ainda nas CTEs, a sinemina H também poderia participar dos mecanismos de sinalização da periferia para o núcleo destas células. A sinemina H talvez interaja com a lamina A/C que é encontrada apenas em células diferenciadas (Prather *et al.*, 1989; Rober *et al.*, 1989). De fato, a distribuição deste FI é disparada apenas quando CTEs iniciam seu programa de diferenciação (Constantinescu *et al.*, 2006). Mais ainda, durante o desenvolvimento embriológico de camundongos tanto sinemina H (Izmyrian *et al.*, 2008) quanto lamina A/C (Prather *et al.*, 19889; Rober *et al.*, 1989) começam a serem encontradas em E9,5, fortalecendo a idéia de que possivelmente possam interagir *in vivo*.



A indução de sinemina H nos primeiros passos da diferenciação neural fortalece a nossa hipótese de que o aumento de sua síntese, associado ao aumento da síntese de vimentina em astrócitos tratados com T3, reflete a progressão da diferenciação glial. De fato, assim como as isoformas de sinemina, BMP4, proteína morfogenética de osso, pertencente à família de TGF $\beta$ , é positivamente regulado por T3 durante a metamorfose de anfíbios. BMP-4 então é capaz de reprimir a proliferação celular e induzir a diferenciação do epitélio intestinal nestes organismos (Ishizuya-Oka *et al.*, 2001). Mais ainda, o tratamento das células-tronco oncogênicas de glioblastoma humano, com BMP4 induz a diferenciação destas células. Elas deixam de apresentar CD133 e perdem seu potencial tumorigênico, deixando de promover o crescimento de glioblastoma após microinjeção intracraniana em ratos (Piccirillo *et al.*, 2006).

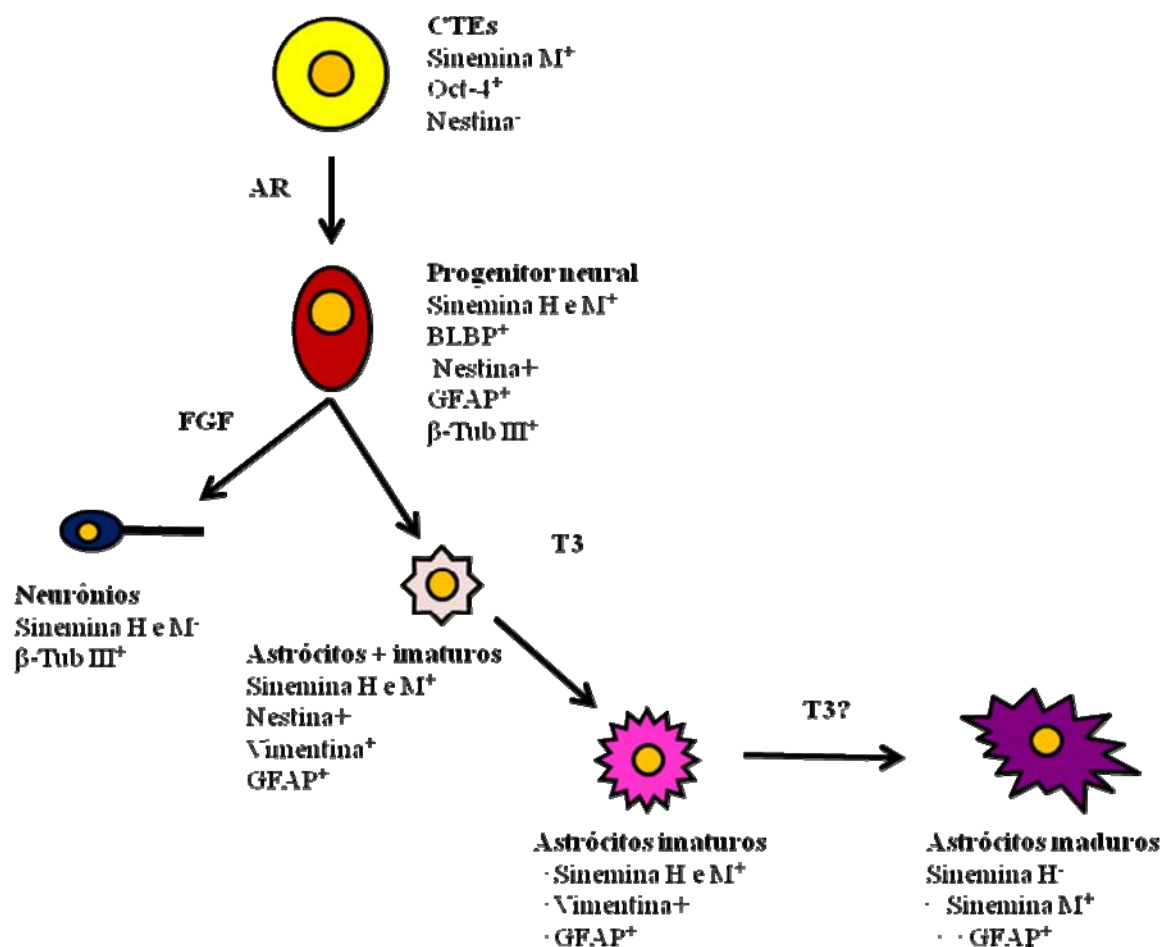
Quando a diferenciação terminal de neurônios foi induzida a partir de CTEs células constituintes do EB permaneceram apresentando sinemina H/M como analisado por microscopia confocal, enquanto neurônios sinemina H/M negativos contendo  $\beta$ -tubulina III migraram na periferia do EB. Nesta região também foram encontradas algumas células  $\beta$ -tubulina III negativas, apresentando sinemina H/M. A grande presença de células sinemina H/M positivas no interior do EB reflete a correlação desta proteína em células progenitoras neurais, as quais estão substancialmente restritas nesta região (Svendsen *et al.*, 1998). Já as células expressando sinemina H/M e  $\beta$ -tubulina III negativas na periferia do EB são muito provavelmente elementos da glia radial dando suporte à migração neuronal (Santiago *et al.*, 2005; Svendsen *et al.*, 1998).

A distribuição diferenciada das isoformas de sinemina no programa de diferenciação celular é realmente muito complexa. Nossa análise proteômica de

CTEs pluripotentes revelou a existência de no mínimo 5 variantes isoelétricas da sinemina M na dependência da linhagem murina estudada. Estas variações isoelétricas podem decorrer de diferenças no nível de fosforilação da sinemina M. Já foi mostrado que a sinemina presente em aves é fosforilada por PKA (Sandoval *et al.*, 1983). Portanto, sinemina poderia talvez regular sua própria fosforilação pela subunidade catalítica de PKA, ao ancorá-la (Russel *et al.*, 2006).

A distribuição diferenciada de componentes do citoesqueleto no programa de diferenciação neural também foi reportada pelo Prof. Vivaldo Moura Neto *et al.* (1983; 1985). Eles verificaram que diversas isoformas de tubulina são distribuídas diferencialmente em neurônios e células gliais.

O perfil da distribuição de sinemina H e M demonstrado nesta tese pode ser esquematizado dentro de um modelo de distribuição seqüencial destas isoformas durante a diferenciação neural (Fig. 32). Assim, a expressão de sinemina M em CTEs é mantida quando estas células derivam os progenitores neurais após exposição ao AR. Estes progenitores expressam concomitantemente BLBP, nestina, GFAP e  $\beta$ -tubulina III. A indução da diferenciação neuronal por FGF suprime a presença de sinemina H/M em neurônios. Porém, o tratamento com AR também induz a diferenciação astrogliar a partir de CTEs, que é representada pela distribuição de sinemina H/M, nestina, vimentina e GFAP na glia imatura. As presenças de sinemina H e M, vimentina e GFAP aumentam durante a progressão da diferenciação glial até que astrócitos maduros deixam de conter sinemina H e vimentina e continuam apresentando sinemina M, em pequeno nível, e bastante GFAP. Este programa de diferenciação glial seria a princípio regulado por T3.



**Figura 31: Modelo hipotético da distribuição sequencial das isoformas de sinemina durante a diferenciação neural.** CTEs pluripotentes apresentando apenas sinemina M tratadas com AR diferenciam-se em progenitores neurais sineminas H e M<sup>+</sup> que também apresentam BLBP, nestina, GFAP e β-tubulina III (β-Tub III). Tratamento com FGF induz a diferenciação neuronal (β-Tub III<sup>+</sup>) e as sinemina H e M desaparecem. Progenitores neurais são diferenciados em astrócitos imaturos contendo sinemina H/M, nestina, vimentina e GFAP. Tratamento com T3 induz as síntese de sinemina H e M, vimentina e GFAP. Quando os astrócitos completam sua diferenciação, amadurecem, tornam-se sinemina H<sup>-</sup> e vimentina<sup>-</sup>, sinemina M diminui e aumenta bastante GFAP.

## 7. CONCLUSÃO

A distribuição das isoformas de sinemina durante o desenvolvimento biológico representa um relevante papel no curso da diferenciação celular, quando serve de sinalizadora do estágio de desenvolvimento e até mesmo patológico, como detalhado a seguir:

1. Em camundongos E15,5 a sinemina H/M é abundantemente encontrada no SN, em músculos e epiderme.
2. Sinemina H/M está presente no SN saudável (astrócitos corticais neonatos e em muito menor grau em adultos, células de Schwann, microglia e plexo coróide) e patológico (tumores gliais, glioblastoma e ependimoma).
3. Nos glioblastomas a presença de sinemina H pode servir como um marcador testemunho do surgimento tumoral.
4. A distribuição de sinemina H e M é regulada por HT, T3, *in vitro*, a qual vai aumentando à medida que as células vão diferenciando e deixando de proliferar.
5. As isoformas de sinemina apresentam uma distribuição seqüencial durante o programa de diferenciação neural.
6. Sinemina M é precocemente encontrada em CTEs pluripotentes; em estágios anteriores mesmo à expressão de nestina.
7. Sinemina H pôde ser caracterizada como um marcador da diferenciação neural, acompanhando a expressão dos demais marcadores de diferenciação neural em CTEs.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, O.M.; EL-GAREIB, A.W.; EL-BAKRY, A.M.; ABD EL-TAWAB, S.M.; AHMED, R.G. **Thyroid hormones states and brain development interactions**. *Int J Dev Neurosci*, 26 (2):147-209. 2008.
- ANTHONY, T.E.; KLEIN, C.; FISHELL, G.; HEINTZ, N. **Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system**. *Neuron*, 41 (6):881-890. 2004.
- ARTHUR, A.; RYCHKOV, G.; SHI, S.; KOBLAR, S.A.; GRONTHOS, S. **Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues**. *Stem Cells*, 26 (7):1787-1795. 2008.
- AXELROD, H.R. **Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique**. *Dev Biol*, 101 (1):225-228. 1984.
- BALUSKA, F.; HLAVACKA, A.; VOLKMAN, D.; MENZEL, D. **Getting connected: actin-based cell-to-cell channels in plants and animals**. *Trends Cell Biol*, 14 (8):404-408. 2004.
- BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R.E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A.B.; DEWHIRST, M.W.; BIGNER, D.D.; RICH, J.N. **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response**. *Nature*, 444 (7120):756-760. 2006.
- BEAR, J.E.; KRAUSE, M.; GERTLER, F.B. **Regulating cellular actin assembly**. *Curr Opin Cell Biol*, 13 (2):158-166. 2001.
- BECKER, B.; BELLIN, R.M.; SERNETT, S.W.; HUIATT, T.W.; ROBSON, R.M. **Synemin contains the rod domain of intermediate filaments**. *Biochem Biophys Res Commun*, 213 (3):796-802. 1995.
- BELLIN, R.M.; HUIATT, T.W.; CRITCHLEY, D.R.; ROBSON, R.M. **Synemin may function to directly link muscle cell intermediate filaments to both myofibrillar Z-lines and costameres**. *J Biol Chem*, 276 (34):32330-32337. 2001.
- BELLIN, R.M.; SERNETT, S.W.; BECKER, B.; IP, W.; HUIATT, T.W.; ROBSON, R.M. **Molecular characteristics and interactions of the intermediate filament protein synemin. Interactions with alpha-actinin may anchor synemin-containing heterofilaments**. *J Biol Chem*, 274 (41):29493-29499. 1999.
- BENTIVOGLIO, M.; MAZZARELLO, P. **The history of radial glia**. *Brain Res Bull*, 49 (5):305-315. 1999.
- BERGER, F.; GAY, E.; PELLETIER, L.; TROPEL, P.; WION, D. **Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells**. *Lancet Oncol*, 5 (8):511-514. 2004.
- BIANCO, A.C.; KIM, B.W. **Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action**. *J Clin Invest*, 116 (10):2571-2579. 2006.
- BIBEL, M.; RICHTER, J.; SCHRENK, K.; TUCKER, K.L.; STAIGER, V.; KORTE, M.; GOETZ, M.; BARDE, Y.A. **Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage**. *Nat Neurosci*, 7 (9):1003-1009. 2004.
- BRUNI, J.E. **Ependymal development, proliferation, and functions: a review**. *Microsc Res Tech*, 41 (1):2-13. 1998.
- BUGGE, T.H.; POHL, J.; LONNOY, O.; STUNNENBERG, H.G. **RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors**. *EMBO J*, 11 (4):1409-1418. 1992.
- BURDON, T.; CHAMBERS, I.; STRACEY, C.; NIWA, H.; SMITH, A. **Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells**. *Cells Tissues Organs*, 165 (3-4):131-143. 1999a.
- BURDON, T.; STRACEY, C.; CHAMBERS, I.; NICHOLS, J.; SMITH, A. **Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells**. *Dev Biol*, 210 (1):30-43. 1999b.
- CHAMBERS, C.B.; PENG, Y.; NGUYEN, H.; GAIANO, N.; FISHELL, G.; NYE, J.S.

- CLOS, J.; LEGRAND, C.; LEGRAND, J. **Effects of thyroid state on the formation and early morphological development of Bergmann glia in the developing rat cerebellum.** *Dev Neurosci*, 3 (4-6):199-208. 1980.
- CONSTANTINESCU, D.; GRAY, H.L.; SAMMAK, P.J.; SCHATTEN, G.P.; CSOKA, A.B. **Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation.** *Stem Cells*, 24 (1):177-185. 2006.
- COOPER, J.A.; SCHAFER, D.A. **Control of actin assembly and disassembly at filament ends.** *Curr Opin Cell Biol*, 12: 97-103. 2000.
- COURA, G.S.; GARCEZ, R.C.; DE AGUIAR, C.B.; ALVAREZ-SILVA, M.; MAGINI, R.S.; TRENTIN, A.G. (). **Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells.** *J Periodontal Res*, 43 (5):531-536. 2008.
- DA SILVA, J.S.; DOTTI, C.G. **Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis.** *Nat Rev Neurosci*, 3 (9):694-704. 2002.
- DAHL, D.; RUEGER, D.C.; BIGNAMI, A.; WEBER, K.; OSBORN, M. **Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia.** *Eur J Cell Biol*, 24 (2):191-196. 1981.
- DAHLSTRAND, J.; COLLINS, V.P.; LENDAHL, U. **Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors.** *Cancer Res*, 52 (19):5334-5341. 1992.
- DANG, L.; TROPEPE, V. **Neural induction and neural stem cell development.** *Regen Med*, 1(5):635-652. 2007.
- DAUMAS-DUPORT, C.; BEUVON, F.; VARLET, P.; FALLET-BIANCO, C. **Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications.** *Ann Pathol*, 20 (5):413-428. 2000.
- DAUMAS-DUPORT, C. ; SCHEITHAUER, B.W. ; CHODKIEWICZ, J.P. ; LAWS, E.R. JR; VEDRENNE, C. **Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases.** *Neurosurgery*. 23(5):545-56. 1988.
- DE ESCOBAR; G.M.; OBREGON; M.J. AND DEL REY; F.E. **Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy.** *Public Health Nutr*, 10 (12A):1554-1570. 2007.
- DE, A.; DAS, S.; CHAUDHURY, S.; SARKAR, P.K. **Thyroidal stimulation of tubulin and actin in rat brain cytoskeleton.** *Int J Dev Neurosci*, 12 (1):49-56. 1994
- DESAI, A.; MITCHISON, T. **Microtubule polymerization dynamics.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 83-117. 1997.
- DOETSCH, F. **A niche for adult neural stem cells.** *Curr Opin Genet Dev*, 13 (5):543-550. 2003.
- DOETSCHMAN, T.C.; EISTETTER, H.; KATZ, M.; SCHMIDT, W; KEMLER, R. **The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium.** *J Embryol Exp Morphol*, 87:27-45. 1985.
- DOYLE, J.P.; COLMAN, D.R. **Glia-neuron interactions and the regulation of myelin formation.** *Curr Opin Cell Biol*, 5 (5):779-785. 1993.
- DUESTER, G. **Retinoic acid regulation of the somitogenesis clock.** *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81 (2):84-92. 2007.
- DUSSAULT, J.H.; RUEL, J. **Thyroid hormones and brain development.** *Annu Rev Physiol*, 49:321-334. 1987.
- ELIASSON, C.; SAHLGREN, C.; BERTHOLD, C.H.;STAKEBERG, J.; CELIS, J.E.; BETSHOLTZ, C.; ERIKSSON, J.E.; PEKNY, M. **Intermediate filament protein partnership in astrocytes.** *J Biol Chem*, 274 (34):23996-24006. 1999.
- EMERICH, D.F.; VASCONCELLOS, A.V.; ELLIOTT, R.B.; SKINNER, S.J.; BORLONGAN, C.V. **The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation.** *Expert Opin Biol Ther*, 4 (8):1191-1201. 2004.
- ENG, L.F.; YU, A.C.; LEE, Y.L. **Astrocytic response to injury.** *Prog Brain Res*, 94:353-365. 1992.

- ERLICH, R.B.; KAHN, S.A.; LIMA, F.R.; MURAS, A.G.; MARTINS, R.A.; LINDEN, R.; CHIARINI, L.B.; MARTINS, V.R.; MOURA NETO, V. **ST11 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways.** *Glia*, 55 (16):1690-1698. 2007.
- EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature*, 292 (5819):154-156. 1981
- FARIA, J.; ROMAO, L.; MARTINS, S.; ALVES, T.; MENDES, F.A.; DE FARIA, G.P.; HOLLANDA, R.; TAKIYA, C.; CHIMELLI, L.; MORANDI, V.; DE SOUZA, J.M.; ABREU, J.G.; MOURA NETO, V. **Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization.** *Differentiation*, 74 (9-10):562-572. 2006.
- FELICIELLO, A; LI, Y; AVVEDIMENTO, E.V.; GOTTESMAN, M.E.; RUBIN, C.S. **A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signaling to the nucleus.** *Curr Biol*. 7(12):1011-4. 1997
- FENG, L.; HATTEN, M.E.; HEINTZ, N. **Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS.** *Neuron*, 12 (4):895-908. 1994.
- FORREST, D.; HALLBOOK, F.; PERSSON, H.; VENNSTROM, B. **Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes.** *EMBO J*, 10 (2):269-275. 1991.
- FRIEL, R.; VAN DER SAR, S.; MEE, P.J. **Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling.** *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (13):1894-1903. 2005.
- FUCHS, E.; CLEVELAND, D.W. **A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.** *Science*, 279 (5350):514-519. 1998
- FULLER, M.L.; DECHANT, A.K.; ROTHSTEIN, B.; CAPRARIELLO, A.; WANG, R.; HALL, A.K.; MILLER, R.H. **Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions.** *Ann Neurol*, 62 (3):288-300. 2007.
- GALOU, M.; COLUCCI-GUYON, E.; ENSERGUEIX, D.; RIDET, J.L.; GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; PRIVAT, A.; BABINET, C.; DUPOUEY, P. **Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice.** *J Cell Biol*, 133 (4):853-863. 1996.
- GAUB, M.P.; LUTZ, Y.; GHYSELINCK, N.B.; SCHEUER, I.; PFISTER, V.; CHAMBON, P.; ROCHETTE-EGLY, C. **Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies.** *J Histochem Cytochem*, 46 (10):1103-1111. 1998.
- GHOSH, S.; RAHAMAN, S.O.; SARKAR, P.K. **Regulation of neurofilament gene expression by thyroid hormone in the developing rat brain.** *Neuroreport*, 10 (11):2361-2365. 1999.
- GOMES, F.C.; LIMA, F.R.; TRENTIN, A.G.; MOURA-NETO, V. **Thyroid hormone role in nervous system morphogenesis.** *Prog Brain Res*, 132:41-50. 2001.
- GOMES, F.C.; MAIA, C.G.; DE MENEZES, J.R.; MOURA-NETO, V. **Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation.** *Glia*, 25 (3):247-255. 1999.
- GOTZ, M.; HARTFUSS, E.; MALATESTA, P. **Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice.** *Brain Res Bull*, 57 (6):777-788. 2002
- GOULD, E.; FRANKFURT, M.; WESTLIND-DANIELSSON, A.; MCEWEN, B.S. **Developing forebrain astrocytes are sensitive to thyroid hormone.** *Glia*, 3 (4):283-292. 1990.
- GRANGER, B.L.; LAZARIDES, E. **Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle.** *Cell*, 22 (3):727-738. 1980.
- GRIFFIN, R.J.; DUDLEY, C.N.; CUNNINGHAM, M.L. **Biochemical effects of the mouse hepatocarcinogen oxazepam: similarities to phenobarbital.** *Fundam Appl Toxicol*, 29 (1):147-154. 1996.
- HARTFUSS, E.; GALLI, R.; HEINS, N.; GOTZ, M. **Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia.** *Dev Biol*, 229 (1):15-30. 2001.
- HERRMANN, H; AEBI, U. **Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.** *Curr Opin Cell Biol*, 12: 79-90. 2000

- HIJIKATA, T.; NAKAMURA, A.; ISOKAWA, K.; IMAMURA, M.; YUASA, K.; ISHIKAWA, R.; KOHAMA, K.; TAKEDA, S.; YORIFUJI, H. **Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through beta-synemin, alpha-dystrobrevin and actin.** *J Cell Sci*, 121 (Pt 12):2062-2074. 2008.
- HOCKFIELD, S.; MCKAY, R.D. **Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system.** *J Neurosci*, 5 (12):3310-3328. 1985.
- IKOTA, H.; KINJO, S.; YOKOO, H.; NAKAZATO, Y. **Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology.** *Acta Neuropathol*, 111 (5):475-482. 2006.
- ISHIZUYA-OKA, A.; UEDA, S.; AMANO, T.; SHIMIZU, K.; SUZUKI, K.; UENO, N.; YOSHIKAWA, K. **Thyroid-hormone-dependent and fibroblast-specific expression of BMP-4 correlates with adult epithelial development during amphibian intestinal remodeling.** *Cell Tissue Res*, 303 (2):187-195. 2001
- IZMIRYAN, A.; CHERAUD, Y.; KHANAMIRYAN, L.; LETERRIER, J.F.; FEDERICI, T.; PELTEKIAN, E.; MOURA-NETO, V.; PAULIN, D.; LI, Z.; XUE, Z.G. **Different expression of synemin isoforms in glia and neurons during nervous system development.** *Glia*, 54 (3):204-213. 2006.
- IZMIRYAN, A.; FRANCO, C.; PAULIN, D.; LI, Z.; XUE, Z. **Synemin expression pattern during mouse development.** *Glia*, 2008, submitted.
- JING, R.; PIZZOLATO, G.; ROBSON, R.M.; GABBIANI, G.; SKALLI, O. **Intermediate filament protein synemin is present in human reactive and malignant astrocytes and associates with ruffled membranes in astrocytoma cells.** *Glia*, 50 (2):107-120. 2005.
- JING, R.; WILHELMSSON, U.; GOODWILL, W.; LI, L.; PAN, Y.; PEKKNY, M.; SKALLI, O. **Synemin is expressed in reactive astrocytes in neurotrauma and interacts differentially with vimentin and GFAP intermediate filament networks.** *J Cell Sci*, 120 (Pt 7):1267-1277. 2007.
- JOHNSON, M.A.; WEICK, J.P.; PEARCE, R.A.; ZHANG, S.C. **Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture.** *J Neurosci*, 27 (12):3069-3077. 2007.
- KHANAMIRYAN, L.; LI, Z.; PAULIN, D.; XUE, Z. **Self-assembly incompetence of synemin is related to the property of its head and rod domains.** *Biochemistry*, 47 (36):9531-9539. 2008.
- KIM, S.U.; DE VELLIS, J. **Microglia in health and disease.** *J Neurosci Res*, 81 (3):302-313. 2005
- KITAZAWA, A.; SHIMIZU, N. **Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia.** *J Biosci Bioeng*, 100 (1):94-99. 2005
- KLEIHUES, P.; LOUIS, D.N.; SCHEITHAUER, B.W.; RORKE, L.B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P.C.; CAVENEE, W.K. **The WHO classification of tumors of the nervous system.** *J Neuropathol Exp Neurol*, 61 (3):215-225. 2002
- KLEIHUES, P.; SOYLEMEZOGLU, F.; SCHAUBLE, B.; SCHEITHAUER, B.W.; BURGER, P.C. **Histopathology, classification, and grading of gliomas.** *Glia*, 15 (3):211-221. 1995.
- KOKOEVA, M.V.; YIN, H.; FLIER, J.S. **Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance.** *Science*, 310(5748):679-683. 2005
- KONDO, T.; SETOGUCHI, T.; AND TAGA, T. **Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (3):781-786. 2004
- KONIG, S.; MOURA NETO, V. **Thyroid hormone actions on neural cells.** *Cell Mol Neurobiol*, 22 (5-6):517-544. 2002.
- KUMAR, M.; BAGCHI, B.; GUPTA, S.K.; MEENA, A.S.; GRESSENS, P.; MANI, S. **Neurospheres derived from human embryoid bodies treated with retinoic Acid show an increase in nestin and ngn2 expression that correlates with the proportion of tyrosine hydroxylase-positive cells.** *Stem Cells Dev*, 16 (4):667-681. 2007.
- LANDRY, C.F.; IVY, G.O.; BROWN, I.R. **Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization.** *J Neurosci Res*, 25 (2):194-203. 1990.
- LAZARIDES, E. **Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins.** *Annu Rev Biochem*, 51: 219-250. 1982



- LEE, M.K.; XU, Z.; WONG, P.C.; CLEVELAND, D.W. **Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo**. *J Cell Biol*, 122 (6):1337-1350. 1993.
- LEONARD, J.L. **Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development**. *Steroids*, 73 (9-10):1008-1012. 2008.
- LESTER, L.B.; LANGEBERG, L.K.; SCOTT, J.D. **Anchoring of protein kinase A facilitates hormone-mediated insulin secretion**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14942-7. 1997
- LEVITT, P.; RAKIC, P. **Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain**. *J Comp Neurol*, 193 (3):815-840. 1980
- LIMA, F.R.; GERVAIS, A.; COLIN, C.; IZEMBART, M.; MOURA-NETO, V.; MALLAT, M. **Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone**. *J Neurosci*, 21 (6):2028-2038. 2001.
- LIMA, F.R.; GONCALVES, N.; GOMES, F.C.; DE FREITAS, M.S.; MOURA-NETO, V. **Thyroid hormone action on astroglial cells from distinct brain regions during development**. *Int J Dev Neurosci*, 16 (1):19-27. 1998.
- LLEDO, P.M.; ALONSO, M.; GRUBB, M.S. **Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits**. *Nat Rev Neurosci*, 7 (3):179-193. 2006.
- MA, D.K.; MING, G.L.; SONG, H. **Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis**. *Curr Opin Neurobiol*, 15 (5):514-520. 2005.
- MALLAT, M.; LIMA, F.R.; GERVAIS, A.; COLIN, C.; MOURA-NETO, V. **New insights into the role of thyroid hormone in the CNS: the microglial track**. *Mol Psychiatry*, 7 (1):7-8. 2002.
- MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R.M. **The nuclear receptor superfamily: the second decade**. *Cell*, 83 (6):835-839. 1995.
- MARTIN, G.R. **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (12):7634-7638. 1981.
- MARTINEZ, R.; GOMES, F.C. **Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway**. *J Neurosci Res*, 80 (3):341-349. 2005.
- MARTINEZ-CEBALLOS, E.; GUDAS, L.J. **Hoxa1 is required for the retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells into neurons**. *J Neurosci Res*, 86 (13):2809-2819. 2008.
- MARTINS, S.C. DE S.; ROMÃO, L.F.; FARIA, J.C.; AFONSO, R.C.H.; PELLIZZON, C.H.; MURRAY, S.A.; MERCER, J.A.; CAMERON, L.C.; MOURA-NETO, V. **Effect of thyroid hormone T3 on Myosin-Va expression in the central nervous system**. *Brain Res*. 2009, *submitted*.
- MERCIER, C.; MASSEGUIN, C.; ROUX, F.; GABRION, J.; SCHERRMANN, J.M. **Expression of P-glycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain: focus on astrocytes**. *Brain Res*, 1021 (1):32-40. 2004.
- MEYER-FRANKE, A.; SHEN, S.; BARRES, B.A. **Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons**. *Mol Cell Neurosci*, 14 (4-5):385-397. 1999.
- MISSON, J.P.; EDWARDS, M.A.; YAMAMOTO, M.; CAVINESS, V.S. JR. **Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker**. *Brain Res Dev Brain Res*, 44(1):95-108. 1988.
- MIYATA, T.; KAWAGUCHI, A.; OKANO, H.; OGAWA, M. **Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons**. *Neuron*, 31 (5):727-741. 2001.
- MIZUNO, Y.; THOMPSON, T.G.; GUYON, J.R.; LIDOV, H.G.; BROSIUS, M.; IMAMURA, M.; OZAWA, E.; WATKINS, S.C.; KUNKEL, L.M. **Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (11):6156-6161. 2001.
- MOON, R.T.; LAZARIDES, E. **Synthesis and post-translational assembly of intermediate filaments in avian erythroid cells: vimentin assembly limits the rate of synemin assembly**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (18):5495-5499. 1983.

- MOORE, K.A.; LEMISCHKA, I.R. **Stem cells and their niches**. *Science*, 311 (5769):1880-1885. 2006.
- MOURA-NETO, V.; MALLAT, M.; ALLIOT, F.; PESSAC, B.; PROCHIANTZ, A. **Astrocytic cerebellar cell clones synthesize the beta' isoforms of the beta-tubulin protein family**". *Neuroscience*, 16 (2):333-341. 1985.
- MOURA-NETO, V.; MALLAT, M.; JEANTET, C.; PROCHIANTZ, A. **Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture**. *EMBO J*, 2 (8):1243-1248. 1983
- NADARAJAH, B.; PARNAVELAS, J.G. **Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex**. *Nat Rev Neurosci*, 3 (6):423-432. 2002
- NAKAYAMA, T.; MOMOKI-SOGA, T.; INOUE, N. **Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons**. *Neurosci Res*, 46 (2):241-249. 2003.
- NAKAYAMA, T.; SAI, T.; OTSU, M.; MOMOKI-SOGA, T.; INOUE, N. **Astrocytogenesis of embryonic stem-cell-derived neural stem cells: Default differentiation**. *Neuroreport*, 17 (14):1519-1523. 2006.
- NAKAYAMA, T.; INOUE, N. **Neural stem sphere method: induction of neural stem cells and neurons by astrocyte-derived factors in embryonic stem cells in vitro**. *Methods Mol Biol*, 330:1-13. 2006.
- NATSUME, H.; SASAKI, S.; KITAGAWA, M.; KASHIWABARA, Y.; MATSUSHITA, A.; NAKANO, K.; NISHIYAMA, K.; NAGAYAMA, K.; MISAWA, H.; MASUDA, H.; NAKAMURA, H. **Beta-catenin/Tcf-1-mediated transactivation of cyclin D1 promoter is negatively regulated by thyroid hormone**. *Biochem Biophys Res Commun*, 309 (2):408-413. 2003.
- NIWA, H.; BURDON, T.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. **Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3**. *Genes Dev*, 12 (13):2048-2060. 1998.
- NOCTOR, S.C.; FLINT, A.C.; WEISSMAN, T.A.; DAMMERMAN, R.S.; KRIEGSTEIN, A.R. **Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex**. *Nature*, 409 (6821):714-720. 2001.
- NOCTOR, S.C.; FLINT, A.C.; WEISSMAN, T.A.; WONG, W.S.; CLINTON, B.K.; KRIEGSTEIN, A.R. **Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia**. *J Neurosci*, 22 (8):3161-3173. 2002.
- NONAKA, J.; YOSHIKAWA, M.; OUJI, Y.; MATSUDA, R.; NISHIMURA, F.; YAMADA, S.; NAKASE, H.; MORIYA, K.; NISHIOFUKU, M.; ISHIZAKA, S.; SAKAKI, T. **CoCl<sub>2</sub> inhibits neural differentiation of retinoic acid-treated embryoid bodies**. *J Biosci Bioeng*, 106(2):141-147. 2008.
- O'FARRELL, P.H. **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins**. *J Biol Chem*. 250(10):4007-21. 1975.
- OH, J.; RECKNOR, J.B.; RECKNOR, J.C.; MALLAPRAGADA, S.K.; SAKAGUCHI, D.S. **Soluble factors from neocortical astrocytes enhance neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult rat hippocampus on micropatterned polymer substrates**. *J Biomed Mater Res A*, 2008
- OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L. **Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development**. *Endocr Rev*, 18 (4):462-475. 1997
- OZOLEK, J.A.; JANE, E.P.; KROWSOSKI, L.; SAMMAK, P.J. **Human embryonic stem cells (HSF-6) show greater proliferation and apoptoses when grown on glioblastoma cells than mouse embryonic fibroblasts at day 19 in culture: comparison of proliferation, survival, and neural differentiation on two different feeder cell types**. *Stem Cells Dev*, 16 (3):403-412. 2007
- PAN, Y.; JING, R.; PITRE, A.; WILLIAMS, B.J.; SKALLI, O. **Intermediate filament protein synemin contributes to the migratory properties of astrocytoma cells by influencing the dynamics of the actin cytoskeleton**. *FASEB J*, 22 (9):3196-3206. 2008.
- PAREKKADAN, B.; BERDICHEVSKY, Y.; IRIMIA, D.; LEEDER, A.; YARMUSH, G.; TONER, M.; LEVINE, J.B.; YARMUSH, M.L. **Cell-cell interaction modulates neuroectodermal specification of embryonic stem cells**. *Neurosci Lett*, 438 (2):190-195. 2008.

- PELLEGRINI, G.; RAMA, P.; MAVILIO, F.; LUCA, M.D. **Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy**. J Pathol. 2008.
- PICCIRILLO, S.G.; REYNOLDS, B.A.; ZANETTI, N.; LAMORTE, G.; BINDA, E.; BROGGI, G.; BREM, H.; OLIVI, A.; DIMECO, F.; VESCOVI, A.L. **Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells**. Nature, 444 (7120):761-765. 2006
- PIXLEY, S.K.; DE VELLIS, J. **Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin**. Brain Res, 317 (2):201-209. 1984.
- PONTES, B.; VIANA, N.B.; CAMPANATI, L.; FARINA, M.; NETO, V.M.; NUSSENZVEIG, H.M. **Structure and elastic properties of tunneling nanotubes**. Eur Biophys J, 37 (2):121-129. 2008.
- PRATHER, R.S.; SIMS, M.M.; MAUL, G.G.; FIRST, N.L.; SCHATTEN, G. **Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis**. Biol Reprod, 41 (1):123-132. 1989.
- PRESTON, S.L.; ALISON, M.R.; FORBES, S.J.; DIREKZE, N.C.; POULSOM, R.; WRIGHT, N.A. **The new stem cell biology: something for everyone**. Mol Pathol, 56 (2):86-96. 2003.
- PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M.; PIETRZAK, M.; TUROWSKA, O.; NAUMAN, A. **Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation**. Acta Biochim Pol, 53 (4):641-650.
- RAKIC, P. **Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex**. Brain Res, 33 (2):471-476. 2006. 1971.
- RAMÓN Y CAJAL, S. **Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés**. Paris: Maloine; 1911.
- RICHARDSON, G.D.; ROBSON, C.N.; LANG, S.H.; NEAL, D.E.; MAITLAND, N.J.; COLLINS, A.T. **CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells**. J Cell Sci, 117 (Pt 16):3539-3545. 2004.
- ROBER, R.A.; WEBER, K.; OSBORN, M. **Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study**. Development, 105 (2):365-378. 1989.
- RUSTOM, A.; SAFFRICH, R.; MARKOVIC, I.; WALTHER, P.; GERDES, H.H. **Nanotubular highways for intercellular organelle transport**. Science, 303 (5660):1007-1010. 2004.
- SAMUELS, H.H.; STANLEY, F.; CASANOVA, J. **Depletion of L-3,5,3"-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone**. Endocrinology, 105 (1):80-85. 1979.
- SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M.S. **Neural stem cells and the origin of gliomas**. N Engl J Med, 353 (8):811-822. 2005.
- SANDOVAL, I.V.; COLACO, C.A.; LAZARIDES, E. **Purification of the intermediate filament-associated protein, synemin, from chicken smooth muscle. Studies on its physicochemical properties, interaction with desmin, and phosphorylation**. J Biol Chem, 258 (4):2568-2576. 1983
- SANTIAGO, M.F.; LIOUR, S.S.; MENDEZ-OTERO, R.; YU, R.K. **Glial-guided neuronal migration in P19 embryonal carcinoma stem cell aggregates**. J Neurosci Res, 81 (1):9-20. 2005.
- SCHMECHEL, D.E.; RAKIC, P. **A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes**. Anat Embryol (Berl), 156 (2):115-152. 1979.
- SCHWEITZER, S.C.; KLYMKOWSKY, M.W.; BELLIN, R.M.; ROBSON, R.M.; CAPETANAKI, Y.; EVANS, R.M. **Paranemin and the organization of desmin filament networks**. J Cell Sci, 114 (Pt 6):1079-1089. 2001.
- SHARLIN, D.S.; TIGHE, D.; GILBERT, M.E.; ZOELLER, R.T. **The balance between oligodendrocyte and astrocyte production in major white matter tracts is linearly related to serum total thyroxine**. Endocrinology, 149 (5):2527-2536. 2008.
- SHIH, M.; LIN, F.; SCOTT, J.D.; WANG, H.Y.; MALBON, C.C. **Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin**. J Biol Chem. 274(3):1588-95. 1999

- SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; HIDE, T.; DIRKS, P.B. **Cancer stem cells in nervous system tumors.** *Oncogene*, 23 (43):7267-7273. 2004.
- SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; TERASAKI, M.; BONN, V.E.; HAWKINS, C.; SQUIRE, J.; DIRKS, P.B. **Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.** *Cancer Res*, 63 (18):5821-5828. 2003
- STEWART, C.L.; GADI, I.; BHATT, H. **Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line.** *Dev Biol*, 161(2):626-628. 1994.
- STIPURSKY, J.; GOMES, F.C. **TGF-beta1/SMAD signaling induces astrocyte fate commitment in vitro: implications for radial glia development.** *Glia*, 55 (10):1023-1033. 2007.
- STROJNIK, T.; ROSLAND, G.V.; SAKARIASSEN, P.O.; KAVALAR, R.; LAH, T. **Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival.** *Surg Neurol*, 68 (2):133-143; discussion 143-134. 2007.
- SUDHOF, T.C.; MALENKA, R.C. **Understanding synapses: past, present, and future.** *Neuron*, 60 (3):469-476. 2008.
- SULTANA, S.; SERNETT, S.W.; BELLIN, R.M.; ROBSON, R.M.; SKALLI, O. **Intermediate filament protein synemin is transiently expressed in a subset of astrocytes during development.** *Glia*, 30 (2):143-153. 2000.
- SUN, N.; CRITCHLEY, D.R.; PAULIN, D.; LI, Z.; ROBSON, R.M. **Human alpha-synemin interacts directly with vinculin and metavinculin.** *Biochem J*, 409 (3):657-667. 2008a.
- SUN, N.; CRITCHLEY, D.R.; PAULIN, D.; LI, Z.; ROBSON, R.M. **Identification of a repeated domain within mammalian alpha-synemin that interacts directly with talin.** *Exp Cell Res*, 314 (8):1839-1849. 2008b.
- 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*, 85 (2):141-152. 1998.
- TAVAZOIE, M.; VAN DER VEKEN, L.; SILVA-VARGAS, V.; LOUISSAINT, M.; COLONNA, L.; ZAIDI, B.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; DOETSCH, F. **A specialized vascular niche for adult neural stem cells.** *Cell Stem Cell*, 3 (3):279-288. 2008.
- TAWK, M.; TITEUX, M.; FALLET, C.; LI, Z.; DAUMAS-DUPOINT, C.; CAVALCANTE, L.A.; PAULIN, D.; MOURA-NETO, V. **Synemin expression in developing normal and pathological human retina and lens.** *Exp Neurol*, 183 (2):499-507. 2003.
- THERY, C.; CHAMAK, B.; MALLAT, M. **Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing.** *Eur J Neurosci*, 3 (11):1155-1164. 1991.
- THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** *Science*, 282 (5391):1145-1147. 1998.
- TITEUX, M.; BROCHERIOU, V.; XUE, Z.; GAO, J.; PELLISSIER, J.F.; GUICHENEY, P.; PAULIN, D.; LI, Z. **Human synemin gene generates splice variants encoding two distinct intermediate filament proteins.** *Eur J Biochem*, 268 (24):6435-6449. 2001.
- TRENTIN, A.G. **Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis.** *J Endocrinol*, 189 (2):189-197. 2006.
- TRENTIN, A.G.; ALVAREZ-SILVA, M.; MOURA NETO, V. **Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281 (5):E1088-1094. 2001.
- TRENTIN, A.G.; DE AGUIAR, C.B.; GARCEZ, R.C.; ALVAREZ-SILVA, M. **Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion.** *Glia*, 42 (4):359-369. 2003.
- TRENTIN, A.G.; MOURA NETO, V. **T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization.** *Neuroreport*, 6 (2):293-296. 1995.

- TRENTIN, A.G.; ROSENTHAL, D.; MOURA-NETO, V. **Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation, and proliferation.** *J Neurosci Res*, 41 (3):409-417. 1995.
- UEKI, T.; TANAKA, M.; YAMASHITA, K.; MIKAWA, S.; QIU, Z.; MARAGAKIS, N.J.; HEVNER, R.F.; MIURA, N.; SUGIMURA, H.; SATO, K. **A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus.** *J Neurosci*, 23 (37):11732-11740. 2003.
- VAN DER FLIER, L.G.; CLEVERS, H. **Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium.** *Annu Rev Physiol*. 2008.
- VARLET, P.; SONI, D.; MIQUEL, C.; ROUX, F.X.; MEDER, J.F.; CHNEIWEISS, H.; DAUMAS-DUPOINT, C. **New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases.** *Neurosurgery*, 55 (6):1377-1391. 2004.
- VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B.A. **Brain tumour stem cells.** *Nat Rev Cancer*, 6 (6):425-436. 2006.
- VILHARDT, F. **Microglia: phagocyte and glia cell.** *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (1):17-21. 2005.
- VISSER, T.J. **Role of sulfation in thyroid hormone metabolism.** *Chem Biol Interact*, 92 (1-3):293-303. 1994.
- WALZ, W.; HERTZ, L. **Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level.** *Prog Neurobiol*, 20 (1-2):133-183. 1983
- WANG, J.; WANG, X.; JIANG, S.; LIN, P.; ZHANG, J.; WU, Y.; XIONG, Z.; REN, J.J.; YANG, H. **Partial Biological Characterization of Cancer Stem-like Cell Line (WJ(2)) of Human Glioblastoma Multiforme.** *Cell Mol Neurobiol*, 28 (7):991-1003. 2008.
- WICHTERLE, H.; PELJTO, M. **Differentiation of mouse embryonic stem cells to spinal motor neurons.** *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 1:Unit 1H 1 1-1H 1 9. 2008
- WOBUS, A.M.; BOHELER, K.R. **Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy.** *Physiol Rev*, 85 (2):635-678. 2005
- XUE, Z.G.; CHERAUD, Y.; BROCHERIOU, V.; IZMIRYAN, A.; TITEUX, M.; PAULIN, D.; LI, Z. **The mouse synemin gene encodes three intermediate filament proteins generated by alternative exon usage and different open reading frames.** *Exp Cell Res*, 298 (2):431-444. 2004.
- ZAMONER, A.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M.C.; GOTTFRIED, C.; BARRETO SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R. **Thyroid hormones reorganize the cytoskeleton of glial cells through Gfap phosphorylation and Rhoa-dependent mechanisms.** *Cell Mol Neurobiol*, 27 (7):845-865. 2007.
- ZHANG, L.; THEISE, N.; CHUA, M.; REID, L.M. **The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration.** *Hepatology*, 48 (5):1598-1607. 2008.
- ZHAO, M.; MOMMA, S.; DELFANI, K.; CARLEN, M.; CASSIDY, R.M.; JOHANSSON, C.B.; BRISMAR, H.; SHUPLIAKOV, O.; FRISEN, J.; JANSON, A.M. **Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(13):7925-7930. 2003.

## ANEXO 1

**Effect of thyroid hormone T3 on Myosin-Va expression in the central nervous system.**

**Sheila Cristina de Souza Martins<sup>1, 2</sup>, Luciana Ferreira Romão<sup>1</sup>, Jane Cristina Faria<sup>1</sup>, Rosenilde Carvalho de Holanda Afonso<sup>1</sup>, Samantha Angel Murray<sup>3</sup>, Claudia Helena Pellizzon<sup>4</sup>, John A. Mercer<sup>5</sup>, Luiz-Claudio Cameron<sup>\*, 2, 6, 7</sup> and Vivaldo Moura-Neto<sup>\*, §, 1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro. CEP 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. CEP 22290-240, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup>School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth. St Michael's Building, white Swan Road Portsmouth, PO1 2DT, England.

<sup>4</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP. Distrito de Rubião JR s/n, Botucatu-SP, Brasil.

<sup>5</sup>McLaughlin Research Institute. Great Falls, MT 59405, USA.

<sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência da Motricidade Humana, Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>7</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais, Brasil.

\* These authors contributed equally to this work.

§ Corresponding author: Vivaldo Moura-Neto, Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil.

Tel: +55 21 2562-6465

Fax:

E-mail addresses: vivaldo@anato.ufrj.br

**Pages: 26**

**Figures: 6**

## Abstract

Thyroid hormones (THs) are essential for brain development, where they regulate gliogenesis, myelination, cell proliferation and protein synthesis. Hypothyroidism severely affects neuronal growth and establishment of synaptic connections. Triiodothyronine (T3), the biologically active form of TH, has a central function in these activities. So, Myosin-Va (Myo-Va), a molecular motor protein involved in vesicle and RNA transport, is a good candidate as a target for T3 regulation. Here, we analyzed Myo-Va expression in euthyroid and hypothyroid adult rat brains and synaptosomes. We observed a reduction of Myo-Va expression in cultured neural cells from newborn hypothyroid rat brain, while immunocytochemical experiments showed a punctate distribution of this protein in the cytoplasm of cells. Particularly, Myo-Va co-localized with microtubules in neurites, especially in their varicosities. Myo-Va immunostaining was stronger in astrocytes and neurons of controls when compared with hypothyroid brains. In addition, supplementation of astrocyte cultures with T3 led to increased expression of Myo-Va in cells from both euthyroid and hypothyroid animals, suggesting that T3 modulates Myo-Va expression in neural cells both *in vivo* and *in vitro*. We have further analyzed Myo-Va expression in U373 cells, a human glioblastoma line, and found the same punctate cytoplasmic protein localization. As in normal neural cells, this expression was also increased by T3, suggesting that the modulatory mechanism exerted by T3 over Myo-Va remains active on astrocyte tumor cells. These data, coupled with the observation that Myo-Va is severely affected in hypothyroidism, support the hypothesis that T3 activity regulates neural motor protein expression, taking Myo-Va as a model. As a consequence, reduced T3 activity could supposedly affect axonal transport and synaptic function, and could therefore explain disturbances seen in the hypothyroid brain.

**Section:** Cellular and Molecular Biology of Nervous System

**Key words:** Myosin-Va, neurons, astrocytes, astrogloma, hypothyroidism, T3

**Abbreviations:** D2, type II iodothyronine 5'-deiodinase; Myo-Va, Myosin-Va; SFM, serum-free medium; T3, triiodothyronine; T4, tetra-iodothyronine (thyroxine); TH, thyroid hormone.



## 1. Introduction

The myosin-V class is a processive actin-based motor (Mehta et al., 1999; Sakamoto et al., 2000) used for intracellular transport and organelle tethering (Provance et al., 2002; Abu-Hamdah et al., 2006). Through its tail domain, Myo-Va interacts with multiple cargoes, including brain vesicles (Prekeris and Terrian, 1997; Evans et al., 1998; Miller and Sheetz, 2000), and mRNA (Ohashi et al., 2002; Yoshimura et al., 2006, Salerno et al., 2008). Moreover, Myo-Va appears to play a role in protein synthesis in the axoplasm (Sotelo-Silveira et al., 2004) where it is locally synthesized after injury (Calliari et al., 2002). In another case of neuronal damage, glutamate excitotoxicity, Myo-Va is proteolyzed by calpain in neuronal cultures (Alavez et al., 2004). Myo-Va is highly expressed in the brain (Espreafico et al.1992), particularly in neurons (Tilelli et al., 2003). It is also present in astrocytes, where it plays a role in thyroid hormone-dependent endocytosis of type II iodothyronine 5'-deiodinase (D2) (Stachelek et al., 2000).

The normal development of the nervous system is under thyroid hormone (TH) regulation (Dussault and Ruel, 1987; Konig and Moura Neto, 2002; Bernal et al., 2003; Zoeller and Rovet, 2004; de Escobar et al., 2007; Ahmed et al., 2008). Serious damage to the brain is likely to occur in the absence of the hormones tri (T3) and tetra (T4) iodothyronine (Porterfield & Hendrich, 1993). Hypothyroidism leads to cortical malformations (Goodman and Gilbert, 2007), as well as functional perturbation (Calloni et al., 2001; Gilbert et al., 2007).

T3 acts through TH receptors (Ortiga-Carvalho et al., 2004, 2005), which are differentially expressed during development in neurons, astrocytes, oligodendrocytes (Mellstrom et al., 1991; Strait et al., 1991; Puymirat, 1992; Carre et al., 1998) and microglia (Lima et al., 2001). In cortical astrocytes, T3 induces morphological differentiation at different stages of development, increasing the expression of glial fibrillary acidic protein

(GFAP), a cytoskeletal marker for mature astrocytes, and decreasing expression of the intermediate filament protein vimentin (Trentin and Moura Neto, 1995; Trentin et al., 1995; Lima et al., 1997, 1998). In addition, T3 induces proliferation of cerebellar astrocytes and C6 glioma cells by promoting secretion of basic fibroblast growth factor (bFGF) (Trentin et al., 2001). T3 also induces astrocytes to secrete growth factors that modulate proliferation and differentiation of granular cerebellar neurons (Gomes et al., 1999a; Martinez and Gomes, 2002, 2005). This suggests that T3 modulates astrocyte-neuron interactions during brain development (Gomes et al., 1999a; Gomes et al., 2001).

As described above, Myo-Va plays a role in many events that are regulated by TH. Therefore, we were interested in dissecting the relationship between TH and Myo-Va expression. Here, we have found that Myo-Va is modulated in the central nervous system by TH, as protein expression decreases in hypothyroid brains. This Myo-Va reduction can be rescued when exogenous T3 is added to cultured neural cells. Our data demonstrate a primary role for T3 in modulating normal neural Myo-Va expression, as seen in euthyroid cells, as well as abnormal physiological conditions, as observed for hypothyroid cells and malignant astrocytes.

## 2. Results

### 2.1. Reduced Myo-Va Expression in the Hypothyroid Brain

Because Myo-Va belongs to a superfamily with members of high homology, we first established the quality and specificity of the polyclonal antibody to detect this protein in our preparations. For this purpose, we performed Western blotting using purified myosin II and brain extracts from rat or *MyoVa*<sup>d-120J</sup> (*dilute-lethal*) mouse, a null phenotype of the locus which encodes the *MYOVA* gene (Mercer et al., 1991), as a negative control (Fig. 1A). The anti-Myo-Va medial tail antibody recognized a sole protein band of ~190kDa in the extract

from whole adult brain (b, see Fig1A); as expected, this band was absent in *dilute* mouse brain protein extract ( $d^{fl}$ ). Furthermore, this antibody did not recognize the myosin heavy chain (MII). A pre-immune rabbit serum tested against the same samples indicated that the control serum had no reactivity for Myo-Va (data not shown). These results demonstrate the specificity of this antibody, which will be further used in our experiments to analyze Myo-Va expression and map its cellular localization.

To determine whether TH plays a role in CNS Myo-Va expression, we assayed the expression of this protein in euthyroid and hypothyroid rat brains by Western blotting. Rats exhibiting classical signs of hypothyroidism, such as reduced weight and delayed eye opening in the pups, were used for these experiments. Cyclophilin was used as a loading control in these experiments, demonstrating a similar amount of proteins was loaded in different lanes (Fig. 1B). We observed a 50% reduction of Myo-Va levels in hypothyroid rat brains when compared with euthyroid rat brains (Fig. 1C and D).

## 2.2. Myo-Va Expression and TH Regulation in Neural Cells

Hypothyroidism generally affects expression of proteins in the brain. Since Myo-Va expression was diminished in our hypothyroid rat model, we wondered whether absence of T3 affects expression of this motor protein in both neuron and astrocyte populations. First, we examined the distribution of Myo-Va in euthyroid and hypothyroid neurons. Figures 2A and B show double immunodetection of Myo-Va and  $\beta$ -tubulin III, respectively. Confocal microscope images illustrate that Myo-Va is present in the cytoplasm of newborn neurons and extends uniformly into their neurites. We observed intense staining of Myo-Va in the growth cone and some specific points of the neurites, apparently varicosities (Fig. 2A, arrow). This fluorescent signal is co-localized with  $\beta$ -tubulin III (Fig. 2C), a typical neuronal marker, previously reported in varicosities (Schumm et al., 2002).

Protein extracts were next analyzed by Western blotting, where Cyclophilin was used as the internal control (Figs. 3A and B). Myo-Va expression in hypothyroid neurons was decreased by 20% when compared with euthyroid ones (Fig. 3C and E). In order to better characterize neuronal Myo-Va expression, we analyzed synaptosomes obtained from adult rat brain. In fact, the synaptosome, a typical structure that is representative of neuronal function, is enriched in Myo-Va (Prekeris and Terrian, 1997; Ohyama et al., 2001; Casaletti et al., 2003). It was further demonstrated that the synaptosome is also under TH control (Bruno et al., 2005; Sarkar et al., 2008). In accordance with this, we observed a 20% reduction in Myo-Va level in synaptosomes obtained from hypothyroid rat brains (Fig. 3D), as contrasted with the euthyroid condition quantified in Fig. 3E.

Because astrocytes, an enriched glial population of the brain, also express Myo-Va (Espreafico et al., 1992), we decided to look for a possible TH regulation in this important population for cerebral homeostasis. In cortical astrocyte cultures from newborn euthyroid rats, we observed a punctate Myo-Va distribution in all cells. This expression was concentrated in the nuclear periphery (arrow) and plasma membrane sheet (arrowhead), possibly in contact regions between cells (Fig. 4A). As a marker for purity of the astrocyte cultures, we performed glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining. As seen in Figures 4A' and B', GFAP was expressed in both euthyroid and hypothyroid cells.

Hypothyroid and euthyroid brains retain differences in gene expression after many cell divisions and days of culture (reviewed by Konig and Moura Neto, 2002; Trentin, 2006). Therefore, we were able to assess Myo-Va expression in cortical astrocytes cultures derived from euthyroid and hypothyroid newborn rat brains. Cytoplasmic distribution of Myo-Va was not altered in hypothyroid newborn cultures (Fig. 4B), but there was a 30% decrease in Myo-Va protein level when compared with euthyroid astrocytes (see Figs. 5A and C).

To quantify the action of the TH over Myo-Va protein levels from euthyroid and hypothyroid astrocytes, we treated cell cultures with 50nM of T3 for three days, followed by Western blot experiments. Cyclophilin was used as internal control (Fig. 5A). T3 treatment increased Myo-Va protein expression by about 30% in astrocytes from both euthyroid and hypothyroid newborn rat brains (Fig. 5B and C). Moreover, this treatment resulted in changes in astrocyte cell shape in hypothyroid newborn rats, from polygonal flat morphology to a more dendritic morphology, as shown in Figure 4C. This result is in accordance with our previous report (Trentin et al., 1995). Myo-Va distribution follows this new morphology.

Next, we decided to examine whether Myo-Va is expressed in transformed cells of neural origin, such as the human astrogloma cell line U373. The astrocytic origin of these cells was verified by GFAP immunostaining (Fig. 6A'). Interestingly, Myo-Va expression is maintained in this cell line. In addition, Myo-Va distribution in T3-treated U373 cells was similar to control cells (data not shown) as examined by immunocytochemistry (Fig. 6A), following the punctate expression pattern seen in non-tumoral astrocytes from euthyroid and hypothyroid brains, except that it was more diffuse in the cytoplasm. Rare cells displayed perinuclear or plasma membrane Myo-Va location, in contrast to our observations in non-tumoral astrocytes from euthyroid and hypothyroid brains.

As in euthyroid/hypothyroid neural cultures, T3 treatment exerted the same up-regulative effect over Myo-Va expression in U373 cells, compared with the control condition in SFM. Again Cyclophilin was used as internal control (Fig. 6B). We could observe a 30% increase in Myo-Va expression upon T3 stimulation, as quantified by Western blotting (Figs. 6C and D).

### **3. DISCUSSION**

In this report, we showed that expression of Myo-Va, an unconventional myosin, is modulated by the thyroid hormone T3 in the central nervous system *in vivo* and *in vitro*. Its expression is diminished in the hypothyroid brain, including both neuronal and glial cell populations. This modulatory mechanism was conserved even in malignant cell dysfunction, as observed for the astrocytic tumor cell line U373.

In the absence of T3, nervous system development is impaired and synaptic contact fails. Here we have determined that hypothyroidism affects Myo-Va expression in the brain. We observed a 50% reduction in Myo-Va expression in hypothyroid when compared with euthyroid brains. This reduction is accounted by a significant decrease of 30% within the astrocyte population and a discrete reduction in Myo-Va expression in neurons and synaptosomes (20%).

We believe that Myo-Va neuronal reduction could be implicated in the deficiency of synaptic transmission, a common sign of hypothyroidism in the brain. In fact, it has been shown by others that this motor protein is essential for the correct establishment of synapses within proper dendritic territories of Purkinje cells (Takagishi et al., 2007).

We have demonstrated the presence of Myo-Va in the growth cone, extension and collateral branches of the axon. Although the presence of Myo-Va in growth cones has been previously reported (Evans et al., 1997), this is the first demonstration of Myo-Va expression in varicosities of neurites, where it may be involved in generation of branching (Dent and Kalil, 2001). In this case, Myo-Va could play an important role in secondary axonal guidance directed by growth cone interactions with extracellular cues, as well as in the transport system of molecules and vesicles by myosin motor complexes.

Presence of actin and various myosins has been previously shown around the nucleoplasm (Milankov and De Boni, 1993; Pestic-Dragovich et al., 2000), and we have observed a similar punctate perinuclear distribution for Myo-Va in the cytoplasm of

astrocytes. As Myo-Va has been implicated in mRNA transport from the nucleoplasm to the cytoplasm (Ohashi et al., 2002; Salerno et al.; 2008), we believe this could explain the perinuclear location observed here. In addition, Myo-Va localization around the sheet of plasma membrane could be a consequence of its role in trafficking route of secretory granules (Rudolf et al., 2003; Desnos et al., 2007).

The effect of T3 in morphological and biochemical properties of astrocytes have been described by us (Trentin and Moura Neto, 1995; Trentin et al., 1995; Gomes et al., 1999a; Lima et al., 2001; Trentin et al., 2001) and others (Clos et al., 1982; Legrand et al., 1983; Carlson et al., 1994, 1996). In this study, we reported that in hypothyroidism, Myo-Va expression decreased 30% in astrocytes, and stimulation with T3 reversed this effect. Furthermore, T3 also induced morphological changes in protoplasmic astrocytes that were transformed into process-bearing astrocytes, as previously reported by us (Trentin et al., 1995). Immunostaining suggests that Myo-Va is associated with the cytoskeleton supporting these processes. Therefore, it is possible that Myo-Va performs a cargo function and transports vesicles throughout astrocyte processes, as it occurs in neurites.

Myo-Va plays a role in type II iodothyronine deiodinase (D2) recycling in a T4 dependent manner, suggesting that Myo-Va may be able to regulate TH concentration through D2 levels. In fact, it has been shown that D2 provides adequate levels of the active thyroid hormone T3 (reviewed by Bernal et al., 2003; Bianco and Kim, 2006; Ahmed et al., 2008).

It has been shown that Myo-Va is linked to regeneration and is a degradation target during excitotoxic injury (Calliari et al., 2002; Alavez et al., 2004). These data, together with the findings in this paper, strongly support the hypothesis that thyroid hormones could have a role in Myo-Va expression after neuron damage.

Thyroid hormone modulation of Myo-Va seems to persist in transformed cells. Our data demonstrate that T3 induces an increase in Myo-Va expression in the human astrogloma

U373 cell line, bringing up an important question about the contribution of T3 to tumor cell migration, through the myosin-actin contractile system of the cells, and in the control of organelle transport.

Myo-Va has a pivotal position in cargo transportation, synapse establishment and axonal guidance. Our demonstration that Myo-Va is a target of T3 in neuron and glial cells opens new avenues for potential therapeutic modulation of this protein, and consequent motor function, which could interfere with synaptic transmission and axonal transport, processes that are affected in hypothyroidism.

#### **4. Experimental procedures**

##### **4.1 Animals.**

Hypothyroidism was induced in littermates by treating pregnant female rats on the 12th day of gestation [embryonic day 12 (E12)] with 0.02% Methimazole (MMI, Sigma) in their drinking water until end of lactation. After this period, animals were treated with MMI for 3 months (adult hypothyroid rats), when they were used for experiments.

We also used newborn (P0) hypothyroid rats. All animals were kept under standard laboratory conditions according to NIH guidelines.

##### **4.2. Anti-Myosin-Va antibody.**

We used affinity-purified rabbit polyclonal antibody against Myo-Va medial tail (MTMyo-Va 1117-1435 of chicken Myosin V) produced by us. Myo-Va medial tail protein was obtained from bacterially-expressed recombinant protein according to Espreafico et al., 1992.

##### **4.3. Cell Culture**

###### **4.3.1 Astrocyte Culture.**



Primary cultures were prepared from cerebral cortices from postnatal day zero (P0) euthyroid or hypothyroid rats. Cortices were removed and meninges were carefully stripped off. Dissociated cells were plated into 15.5-mm diameter wells (24-well plates) and/ or 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning Inc., NY, USA), previously coated with polyornithine (1.5 µg/mL, molecular weight 41000; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Astrocytes were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Hypothyroid astrocytes were cultured with T3/T4-depleted fetal calf serum as described by Trentin et al. (1995). For immunocytochemistry assays, cells were plated on polyornithine-treated glass coverslips. Cell cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere chamber for 10 days until they reached confluence.

#### **4.3.2. Neuronal culture.**

Neuronal cultures were prepared from cerebral cortices from P0 euthyroid and hypothyroid rats as previously described (Gomes et al., 1999b), and incubated with serum free medium (DMEM-F12; SFM) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere for 24 h.

#### **4.3.3 Human Astrogloma U373-MG Cell Culture.**

U373-MG cells were cultured in DMEM/F12 with 10% FCS medium, incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere.

#### **4.5. T3-treatment.**

After reaching confluence, euthyroid and hypothyroid astrocytes and U373-MG cells were treated with 50 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3, Sigma) in DMEM-F12 for 3 days, with

daily changes of medium. Control cells were cultured simultaneously in SFM. After the third day of treatment, proteins were extracted for western blots or cells were processed for immunocytochemistry.

#### **4.6. Protein Extracts.**

##### **4.6.1 Cell Protein Extracts.**

Confluent monolayers were washed with ice-cold PBS, scraped from the dish, and lysed with buffer A, containing 102 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 0.51 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 0.08 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and 1 mM benzamidine.

##### **4.6.2. Synaptosomal Protein Extracts.**

Synaptosomes were prepared from euthyroid and hypothyroid brains and purified over a Percoll gradient, as described by Dunkley et al. (1986, 1988). Isolated synaptosomes were disrupted with the buffer A described above, and total protein was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis.

##### **4.6.3. Brain Protein Extracts.**

Whole euthyroid and hypothyroid rat-brain extracts and whole-brain extracts from control *Myo5a*<sup>d=120J</sup>/*Myo5a*<sup>d=120J</sup> (*dilute-lethal*) mice, a null mutant lacking Myo-Va (Moore et al., 1988), were obtained by homogenizing the brain with buffer A and centrifuging at 7,000 x g for 2 min (4°C). Proteins were also subjected to polyacrylamide gel electrophoresis as below.

#### **4.7. Myosin II Purification.**

Myosin II from striated muscle was purified (see Bremel and Weber, 1975) from an euthanized adult rat. Myosin II was quantified and treated as described above for brain-protein extracts.

#### **4.8. Immunocytochemistry.**

Immunocytochemistry was performed as previously described (Gomes et al., 1999b). Anti-Myo-Va medial tail (1:50) or anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (DAKO, 1:400) antibodies were used, followed by a second incubation with Cy3-conjugated sheep anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Co.; 1: 5000) for 1 h. The observations were made with a Nikon TE300 microscope. Representative cells were selected for documentation with CoolSNAP-Procf (Photometrics). Immunofluorescence of neuronal cells was observed with an LSM 510 Meta Zeiss confocal microscope. For double immunocytochemistry, anti-mouse  $\beta$ -tubulin isotype III (SIGMA; 1:200) and anti-Myo-Va antibodies were incubated overnight and developed with fluorescein anti-mouse IgG (Accurate Chemical & Scientific Corporation; 1:400) and Cy3.

#### **4.9. Electrophoresis and Western Blot Analysis.**

Protein samples from cells, synaptosomes and brains were quantified (Bradford, 1976), and approximately 50  $\mu$ g of protein per lane was resolved on a 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After migration, proteins were processed for Western blotting as previously described (Faria et al., 2006). We used antibodies anti-Myo-Va (1: 500), and anti-Cyclophilin (1: 1000; Synapse) as internal controls.

#### **4.10. Statistical Analysis.**

Western blot films were scanned and protein bands were analyzed by Scion Image software. The optical density (O.D.) of each band was quantified. Cyclophilin was used to correct each Myo-Va immunodetection band and results were shown as Myo-Va and Cyclophilin ratio. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M of 3 different experiments for each condition. Statistical significance was assessed for all measurements using Student's *t*-test or ANOVA followed by Dukey test in GraphPad Prism 5; values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### **Acknowledgments.**

We thank Dr. Leonardo Tavares (Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ) for his help with confocal microscopy, Dr. Milena Bastos Furtado (UFRJ) for critical comments on this manuscript and Adiel Nascimento for technical assistance. This study was supported by CAPES-COFECUB n° 542/2006, CNPq, FAPERJ, PRONEX 171.546/2006, FUJB-UFRJ, NIH R01 GM066901 (J.A.M.).

## REFERENCES

- Abu-Hamdah, R., Cho, W.J., Horber, J.K., Jena, B.P., 2006. Secretory vesicles in live cells are not free-floating but tethered to filamentous structures, a study using photonic force microscopy. *Ultramicroscopy* 106(8-9), 670-673.
- Ahmed, O.M., El-Gareib, A.W., El-Bakry, A.M., Abd El-Tawab, S.M., Ahmed, R.G., 2008. Thyroid hormones states and brain development interactions. *Int J Dev Neurosci.* 26(2), 147-209.
- Alavez, S., Moran, J., Franco-Cea, A., Ortega-Gomez, A., Casaletti, L., Cameron, L.C., 2004. Myosin Va is proteolysed in rat cerebellar granule neurons after excitotoxic injury. *Neurosci Lett* 367(3), 404-409.
- Bernal, J., Guadano-Ferraz, A., Morte, B., 2003. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid* 13(11), 1005-1012.
- Bianco, A.C., Kim, B.W., 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116(10), 2571-2579.
- Boldogh, I.R., Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., Pon, L.A., 2005. Mitochondrial movement and inheritance in budding yeast. *Gene* 354, 28-36.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bremel, R.D., Weber, A., 1975. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochim Biophys Acta* 376(2), 366-374.
- Bruno, A.N., Ricachenevsky, F.K., Pochmann, D., Bonan, C.D., Battastini, A.M., Barreto-Chaves, M.L., Sarkis, J.J., 2005 Hypothyroidism changes adenine nucleotide

- hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. *Int J Dev Neurosci.* 23(1), 37-44.
- Calliari, A., Sotelo-Silveira, J., Costa, M.C., Nogueira, J., Cameron, L.C., Kun, A., Benech, J., Sotelo, J.R., 2002. Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motil Cytoskeleton* 51(4), 169-176.
- Calloni, G.W., Alvarez-Silva, M., Vituri, C., Trentin, A.G., 2001. Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 126(1), 121-124.
- Carlson, D.J., Strait, K.A., Schwartz, H.L., Oppenheimer, J.H., 1994. Immunofluorescent localization of thyroid hormone receptor isoforms in glial cells of rat brain. *Endocrinology* 135(5), 1831-1836.
- Carlson, D.J., Strait, K.A., Schwartz, H.L., Oppenheimer, J.H., 1996. Thyroid hormone receptor isoform content in cultured type 1 and type 2 astrocytes. *Endocrinology* 137(3), 911-917.
- Carre, J.L., Demerens, C., Rodriguez-Pena, A., Floch, H.H., Vincendon, G., Sarlieve, L.L., 1998. Thyroid hormone receptor isoforms are sequentially expressed in oligodendrocyte lineage cells during rat cerebral development. *J Neurosci Res* 54(5), 584-594.
- Casaletti, L., Tauhata, S.B., Moreira, J.E., Larson, R.E., 2003. Myosin-Va proteolysis by Ca<sup>2+</sup>/calpain in depolarized nerve endings from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 308(1), 159-164.
- Clos, J., Legrand, C., Legrand, J., Ghandour, M.S., Labourdette, G., Vincendon, G., Gombos, G., 1982. Effects of thyroid state and undernutrition on S100 protein and astroglia development in rat cerebellum. *Dev Neurosci* 5(2-3), 285-292.

- de Escobar, G.M., Obregón, M.J., del Rey, F.E., 2007 Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy. *Public Health Nutr.* 10(12A), 1554-70.
- Dent, E.W., Kalil, K., 2001. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21(24), 9757-9769.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J., Rostas, J.A., 1986. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res* 372(1), 115-129.
- Dunkley, P.R., Heath, J.W., Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Glenfield, P.J., Rostas, J.A., 1988. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* 441(1-2), 59-71.
- Dussault, J.H., Ruel, J., 1987. Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol* 49, 321-334.
- Espreafico, E.M., Cheney, R.E., Matteoli, M., Nascimento, A.A., De Camilli, P.V., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119(6), 1541-1557.
- Evans, L.L., Hammer, J., Bridgman, P.C., 1997. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. *J Cell Sci* 110 ( Pt 4), 439-449.
- Evans, L.L., Lee, A.J., Bridgman, P.C., Mooseker, M.S., 1998. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci* 111 ( Pt 14), 2055-2066.
- Faria, J., Romao, L., Martins, S., Alves, T., Mendes, F.A., de Faria, G.P., Hollanda, R., Takiya, C., Chimelli, L., Morandi, V., de Souza, J.M., Abreu, J.G., Moura Neto, V., 2006. Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture

- and neuronal modulation of glial laminin organization. *Differentiation* 74(9-10), 562-572.
- Gilbert, M.E., Sui, L., Walker, M.J., Anderson, W., Thomas, S., Smoller, S.N., Schon, J.P., Phani, S., Goodman, J.H., 2007. Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology* 148(1), 92-102.
- Goodman, J.H., Gilbert, M.E., 2007 Modest thyroid hormone insufficiency during development induces a cellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. *Endocrinology*. 148(6), 2593-7.
- Gomes, F.C., Maia, C.G., de Menezes, J.R., Neto, V.M., 1999a. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 25(3), 247-255.
- Gomes, F.C., Garcia-Abreu, J., Galou, M, Paulin, D., Moura Neto, V., 1999b. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia* 26(2), 97-108.
- Gomes, F.C., Lima, F.R., Trentin, A.G., Moura Neto, V., 2001. Thyroid hormone role in nervous system morphogenesis. *Prog Brain Res* 132, 41-50.
- Goodman, J.H., Gilbert, M.E., 2007. Modest thyroid hormone insufficiency during development induces a cellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. *Endocrinology* 148(6), 2593-2597.
- Konig, S., Moura Neto, V., 2002. Thyroid hormone actions on neural cells. *Cell Mol Neurobiol* 22(5-6), 517-544.
- Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T, Almers, W., 2000 Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophysical Journal* 78(6), 2863-77.



- Legrand, C., Ghandour, M.S., Clos, J., 1983. Histochemical and biochemical studies of butyrylcholinesterase activity in adult and developing cerebellum. Effects of abnormal thyroid state and undernutrition. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9(6), 433-453.
- Lima, F.R., Trentin, A.G., Rosenthal, D., Chagas, C., Moura Neto, V., 1997. Thyroid hormone induces protein secretion and morphological changes in astroglial cells with an increase in expression of glial fibrillary acidic protein. *J Endocrinol* 154(1), 167-175.
- Lima, F.R., Goncalves, N., Gomes, F.C., de Freitas, M.S., Moura Neto, V., 1998. Thyroid hormone action on astroglial cells from distinct brain regions during development. *Int J Dev Neurosci* 16(1), 19-27.
- Lima, F.R., Gervais, A., Colin, C., Izembart, M., Neto, V.M., Mallat, M., 2001. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J Neurosci* 21(6), 2028-2038.
- Martinez, R., Gomes, F.C., 2002. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 277(51), 49311-49318.
- Martinez, R., Gomes, F.C., 2005. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway. *J Neurosci Res* 80(3), 341-349.
- Mehta, A.D., Rock, R.S., Rief, M., Spudich, J.A., Mooseker, M.S., Cheney, R.E., 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 400(6744), 590-593.

- Mellstrom, B., Naranjo, J.R., Santos, A., Gonzalez, A.M., Bernal, J., 1991. Independent expression of the alpha and beta c-erbA genes in developing rat brain. *Mol Endocrinol* 5(9), 1339-1350.
- Mercer, J.A., Seperack, P.K., Strobel, M.C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 349(6311), 709-713.
- Milankov, K., De Boni, U., 1993. Cytochemical localization of actin and myosin aggregates in interphase nuclei in situ. *Exp Cell Res* 209(2), 189-199.
- Miller, K.E., Sheetz, M.P., 2000. Characterization of myosin V binding to brain vesicles. *J Biol Chem* 275(4), 2598-2606.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T.A., Anzai, K., 2002. Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277(40), 37804-37810.
- Ohyama, A., Komiya, Y., Igarashi, M., 2001. Globular tail of myosin-V is bound to vamp/synaptobrevin. *Biochem Biophys Res Commun* 280(4), 988-991.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Hashimoto, K., Pazos-Moura, C.C., Geenen, D., Cohen, R., Lang, R.M., Wondisford, F.E., 2004. Thyroid hormone resistance in the heart: role of the thyroid hormone receptor beta isoform. *Endocrinology* 145(4), 1625-1633.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Shibusawa, N., Nikrodhanond, A., Oliveira, K.J., Machado, D.S., Liao, X.H., Cohen, R.N., Refetoff, S., Wondisford, F.E., 2005. Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *J Clin Invest* 115(9), 2517-2523.

- Pestic-Dragovich, L., Stojiljkovic, L., Philimonenko, A.A., Nowak, G., Ke, Y., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hozak, P., de Lanerolle, P., 2000. A myosin I isoform in the nucleus. *Science* 290(5490), 337-341.
- Prekeris, R., Terrian, D.M., 1997. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J Cell Biol* 137(7), 1589-1601.
- Provance, D.W., James, T.L., Mercer, J.A., 2002. Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic* 3(2), 124-132.
- Puymirat, J., 1992. Thyroid receptors in the rat brain. *Prog Neurobiol* 39(3), 281-294.
- Salerno, V.P., Calliari, A., Provance, D.W. Jr., Sotelo-Silveira, J.R., Sotelo, J.R., Mercer, J.A., 2008 Myosin-Va mediates RNA distribution in primary fibroblasts from multiple organs. *Cell Motil Cytoskeleton*. 65(5), 422-33.
- Sarkar, P.K., 2008 L-triiodothyronine differentially and nongenomically regulates synaptosomal protein phosphorylation in adult rat brain cerebral cortex: role of calcium and calmodulin. *Life Sci*. 82(17-18), 920-7.
- Schnell, E., Nicoll, R.A., 2001. Hippocampal synaptic transmission and plasticity are preserved in myosin Va mutant mice. *J Neurophysiol* 85(4), 1498-1501.
- Schumm, M.A., Castellanos, D.A., Frydel, B.R., Sagen, J., 2002. Enhanced viability and neuronal differentiation of neural progenitors by chromaffin cell co-culture. *Brain Res Dev Brain Res*. 137(2), 115-25.
- Sotelo-Silveira, J.R., Calliari, A., Cardenas, M., Koenig, E., Sotelo, J.R., 2004. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *J Neurobiol* 60(2), 187-196.

- Stachelek, S.J., Kowalik, T.F., Farwell, A.P., Leonard, J.L., 2000. Myosin V plays an essential role in the thyroid hormone-dependent endocytosis of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 275(41), 31701-31707.
- Strait, K.A., Schwartz, H.L., Seybold, V.S., Ling, N.C., Oppenheimer, J.H., 1991. Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor protein beta 1 and variant alpha 2 in selected tissues: cerebellar Purkinje cells as a model for beta 1 receptor-mediated developmental effects of thyroid hormone in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9), 3887-3891.
- Strobel, M.C., Seperack, P.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1990. Molecular analysis of two mouse dilute locus deletion mutations: spontaneous dilute lethal20J and radiation-induced dilute prenatal lethal Aa2 alleles. *Mol Cell Biol* 10(2), 501-509.
- Takagishi, Y., Hashimoto, K., Kayahara, T., Watanabe, M., Otsuka, H., Mizoguchi, A., Kano, M., Murata, Y., 2007. Diminished climbing fiber innervation of Purkinje cells in the cerebellum of myosin Va mutant mice and rats. *Dev Neurobiol* 67(7), 909-923.
- Tilelli, C.Q., Martins, A.R., Larson, R.E., Garcia-Cairasco, N., 2003. Immunohistochemical localization of myosin Va in the adult rat brain. *Neuroscience* 121(3), 573-586.
- Trentin, A.G., Moura Neto, V., 1995. T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *Neuroreport* 6(2), 293-296.
- Trentin, A.G., Rosenthal, D., Moura Neto, V., 1995. Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation, and proliferation. *J Neurosci Res* 41(3), 409-417.
- Trentin, A.G., Alvarez-Silva, M., Moura Neto, V., 2001. Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(5), E1088-1094.

- Trentin, A.G., 2006. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. *J Endocrinol* 189(2), 189-197.
- Yoshimura, A., Fujii, R., Watanabe, Y., Okabe, S., Fukui, K., Takumi, T., 2006. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Curr Biol* 16(23), 2345-2351.
- Zoeller, R.T., Rovet, J., 2004. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol* 16(10), 809-818.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: (A) Western blot for Myo-Va on whole protein extract from normal rat brain (b) or dilute lethal ( $d^{l1}$ ) mouse brain, purified myosin II (MII). Western blot for Cyclophilin (B) or Myo-Va (C) on whole protein extract from euthyroid (Eu) and hypothyroid (h) adult brains. (D) Quantitative analysis of bands is expressed as the ratio between Myo-Va and Cyclophilin O.D. levels (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ ). \*  $p < 0.05$  according to Student's t-test.

Figure 2: Typical immunofluorescence pattern for Myo-Va (A) and  $\beta$ -tubulin III (B) in cortical neurons. (C) Overlay of (A) with (B). Specific localization of Myo-Va in growth cones (arrow) and varicosities of neurites (arrowhead). Scale bar = 20  $\mu$ m.

Figure 3: Western blot for Cyclophilin (A and B) and Myo-Va (C and D) on whole protein extracts from P0 cortical neurons (Neu) and adult synaptosome (Syn) obtained from euthyroid (Eu) and hypothyroid (h) rat brains. (E) Quantitative analysis of bands is expressed as the ratio between Myo-Va and Cyclophilin O.D. levels (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ ). \*  $p < 0.05$  according to Student's t-test.

Figure 4: Immunofluorescence for Myo-Va in (A) euthyroid cortical astrocytes, (B) non-treated hypothyroid cortical astrocytes and (C) T3-stimulated hypothyroid cortical astrocytes. Myo-Va is heavily localized on nuclear periphery (arrow) and around plasma membrane region (arrowhead). Insets: GFAP immunostaining in euthyroid (A') and hypothyroid (B') astrocytes. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Figure 5: Western blot for Cyclophilin (A) and Myo-Va (B) on whole protein extracts from euthyroid (Eu) or hypothyroid (h) astrocytes treated with T3 (T3) or incubated with SFM for negative control (Ct). (C) Quantitative analysis of bands is expressed as the ratio between Myo-Va and Cyclophilin O.D. levels, (mean  $\pm$  S.E.M., n= 3).  $p < 0.05$  for hypothyroidism (\*) and T3-treatment (\*\*) conditions according to ANOVA two ways

Figure 6: (A) Myo-Va immunolocalization in U373-MG cells. Inset: GFAP immunostaining (A'). Western blot of Cyclophilin (B) and Myo-Va (C) on whole protein extracts from control (Ct) and T3-treated (T3) U373-MG cell line. (D) Quantitative analysis of bands is expressed as the ratio between Myo-Va and Cyclophilin O.D. levels (mean  $\pm$  S.E.M., n= 3). \*  $p < 0.05$  according to Student's t-test. Scale bar = 50  $\mu$ m.

Fig 1

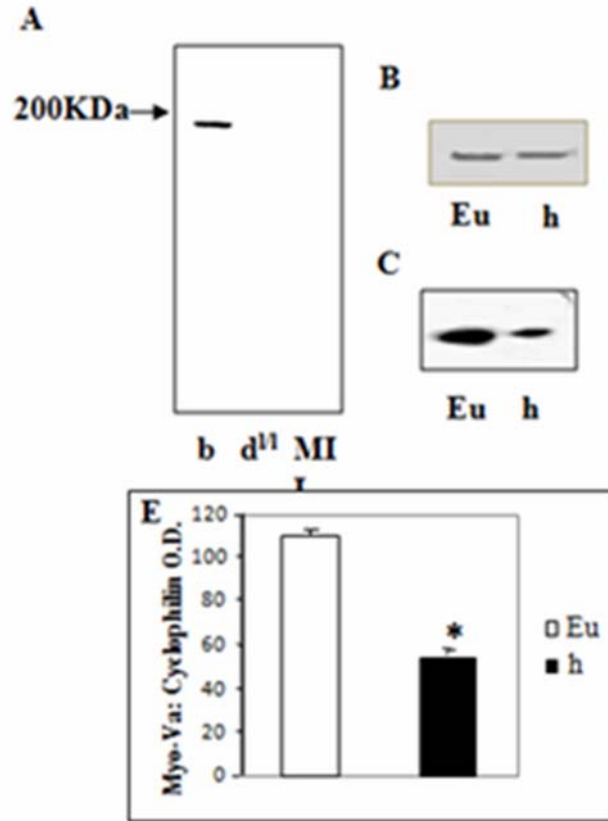




Fig 2

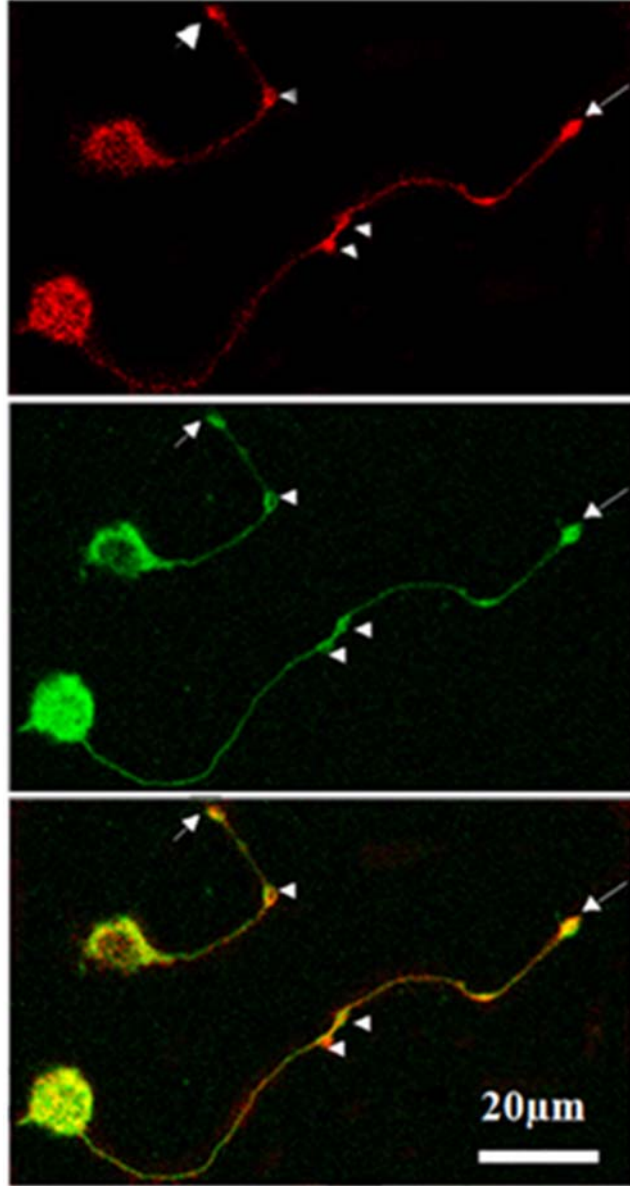


Fig 3

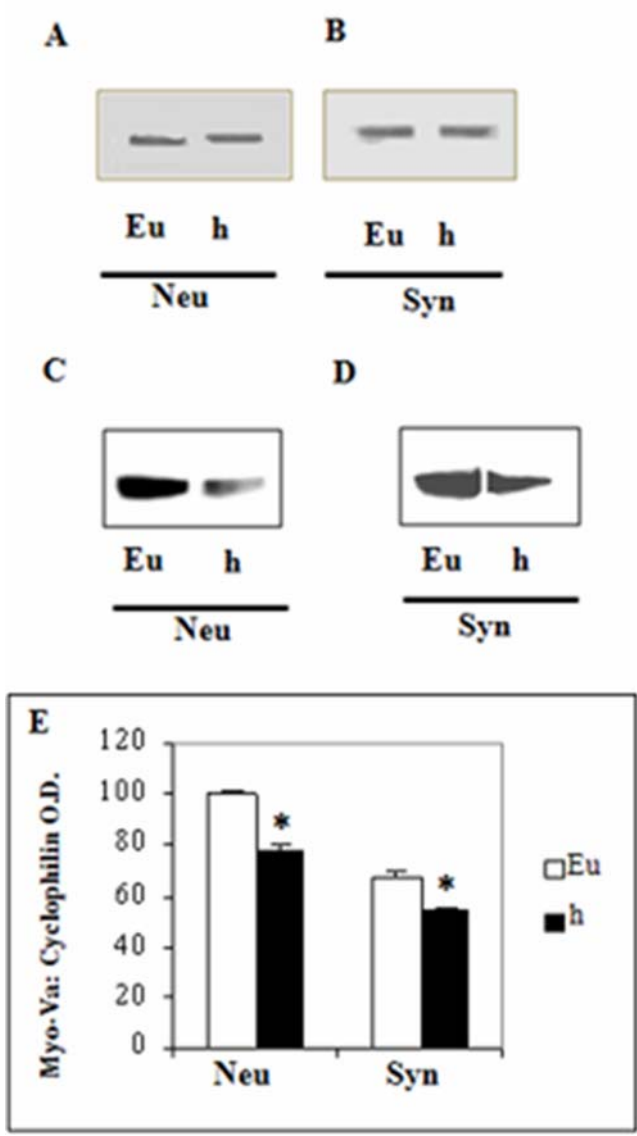


Fig 4

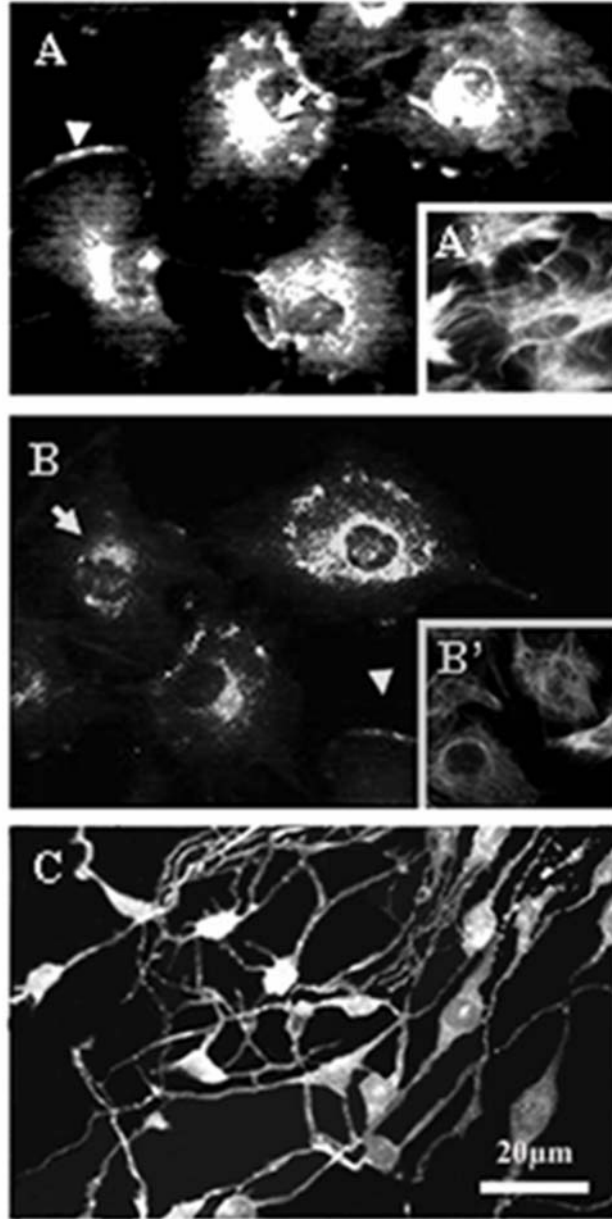


Fig 5

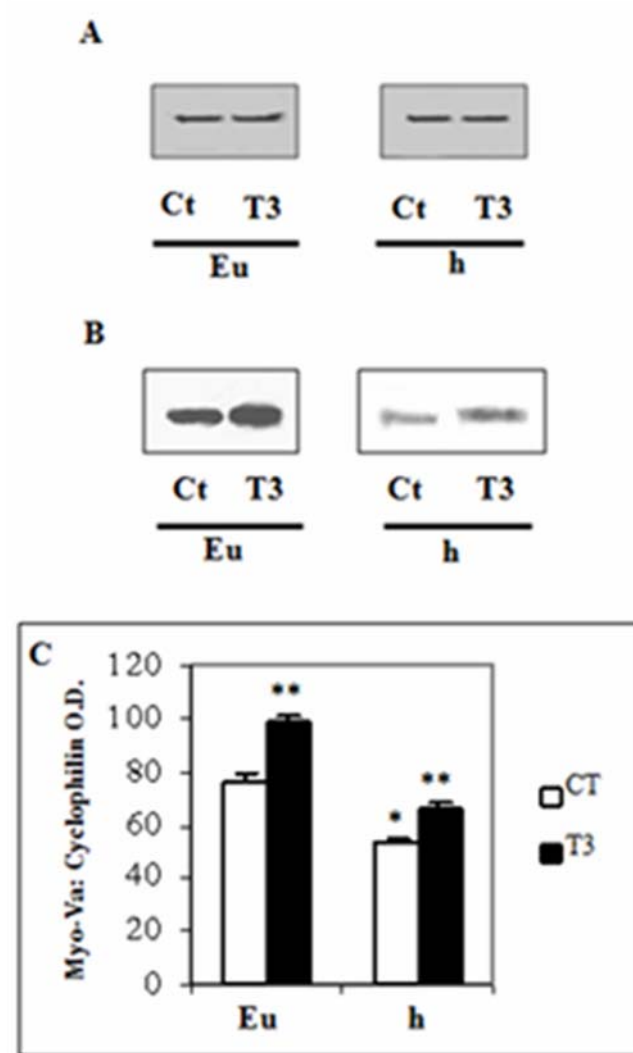
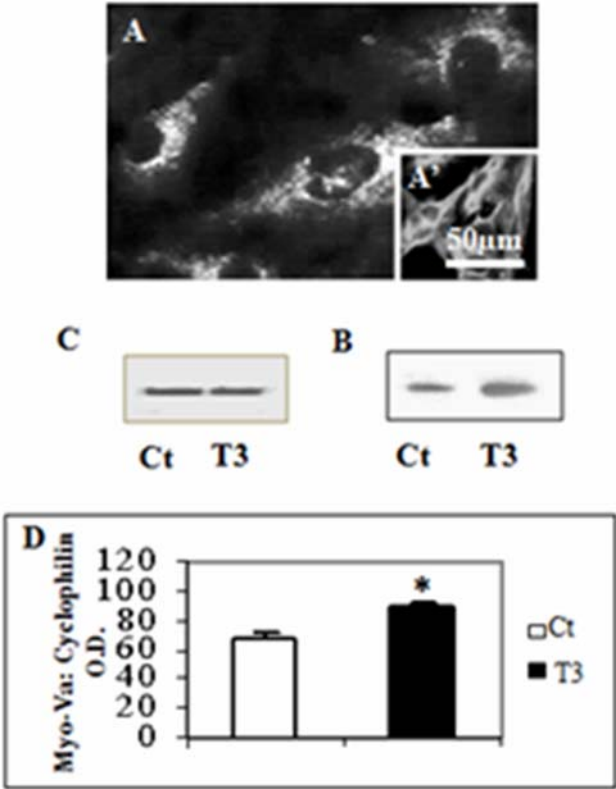


Fig6



## ANEXO 2

Jane Faria · Luciana Romão · Sheila Martins ·  
Tércia Alves · Fabio A. Mendes · Giselle Pinto de Faria ·  
Rosenilde Hollanda · Christina Takiya · Leila Chimelli ·  
Veronica Morandi · Jorge Marcondes de Souza ·  
Jose Garcia Abreu · Vivaldo Moura Neto

## Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization

Received October 30, 2005; accepted in revised form May 2, 2006

**Abstract:** The harmonious development of the central nervous system depends on the interactions of the neuronal and glial cells. Extracellular matrix elements play important roles in these interactions, especially laminin produced by astrocytes, which has been shown to be a good substrate for neuron growth and axonal guidance. Glioblastomas are the most common subtypes of primary brain tumors and may be astrocytes in origin. As normal laminin-producing glial cells are the

preferential substrate for neurons, and glial tumors have been shown to produce laminin, we questioned whether glioblastoma retained the same normal glial–neuron interactive properties with respect to neuronal growth and differentiation. Then, rat neurons were co-cultured onto rat normal astrocytes or onto three human glioblastoma cell lines obtained from neurosurgery. The co-culture confirmed that human glioblastoma cells as well as astrocytes maintained the ability to support neuritogenesis, but non-neural normal or tumoral cells failed to do so. However, glioblastoma cells did not distinguish embryonic from post-natal neurons in relation to neurite pattern in the co-cultures, as normal astrocytes did. Further, the laminin organization on both normal and tumoral glial cells was altered from a filamentous arrangement to a mixed punctuate/filamentous pattern when in co-culture with neurons. Together, these results suggest that glioblastoma cells could identify neuronal cells as partners, to support their growth and induce complex neurites, but they lost the normal glia property to distinguish neuronal age. In addition, our results show for the first time that neurons modulate the organization of astrocytes and glioblastoma laminin on the extracellular matrix.

Jane Faria · Luciana Romão · Sheila Martins · Tércia Alves ·  
Fabio A. Mendes · Giselle Pinto de Faria · Rosenilde  
Hollanda · Jose Garcia Abreu\* · Vivaldo Moura Neto\* (✉)  
Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, Bloco F sala 20, Rio de Janeiro 21949-590, Brazil  
E-mail: vivaldo@anato.ufrj.br

Tércia Alves · Veronica Morandi  
Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade  
Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-590, Brazil

Christina Takiya  
Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de  
Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Rio de Janeiro 21949-590, Brazil

Leila Chimelli  
Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário  
Clementino Fraga Filho, Universidade Estadual do Rio de  
Janeiro, Bloco F sala 20, Rio de Janeiro 21949-590, Brazil

Jorge Marcondes de Souza  
Serviço de Neurocirurgia, Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, Bloco F sala 20, Rio de Janeiro 21949-590, Brazil

\*These authors contributed equally to this work.

**Key words** Glioma · neuron–glia interactions ·  
extracellular matrix · brain tumors

### Introduction

The harmonious development of the central nervous system (CNS) depends on the interactions of the neuronal and glial cells. These interactions are established early on during brain development and may be

controlled by growth factors released in the extracellular space, by extracellular matrix (ECM) elements, or gap-junctions, in order to achieve CNS construction. During neurogenesis, astrocytes, the larger glial cell population in the brain, play a pivotal role in both embryonic and adult neural cell development (Lim and Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002; Nakayama et al., 2003). It has been shown that astrocytes promote neuronal proliferation, axonal guidance, and synapse formation *in vitro* (Noble et al., 1984; Mallat et al., 1986; Nedergaard, 1994; Garcia-Abreu et al., 1995b; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Gomes et al., 1999b) and also *in vivo* (Rakic, 1972, 1981; Snow et al., 1990; Pires-Neto et al., 1998). These interactions can also be seen by functional coupling of neurons to glia (Frôes et al., 1999) or by the capacity of neurons to control gap-junctional communication in astrocytes (Rouach et al., 2000, 2002) and modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocytes with involvement of transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) (Mittaud et al., 2002). In fact, an increasing amount of evidence points toward neurons as modulators of glial development. For instance, neuron-derived signals induce proliferation and morphological changes in cerebellar glia (Hatten, 1985, 1987), cortical glial maturation with an increasing expression of the astrocyte marker GFAP through TGF $\beta$ 1 secretion and dependent on neuronal brain region (Gomes et al., 1999a; De Sampaio e Spohr et al., 2002; Sousa et al., 2004). These data suggest that neuronal and glial cells' interactions may be differentially regulated during development of the brain according to brain-specific regions. In fact, it has been proved that astrocytes can define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic neurons based on its regionally specific heterogeneity (Denis-Donini et al., 1984; Garcia-Abreu et al., 1995b). We have demonstrated that astrocytes derived from distinct sub-regions of the midbrain can differently modulate neurite extension and arborization. Astrocytes from the lateral region of the midbrain are permissive to neurite outgrowth of midbrain neurons, whereas those derived from the midline are non-permissive to neuritic growth (Garcia-Abreu et al., 1995b). This difference of mid-brain astrocytes property could be partially due to the concentration of sulfated proteoglycans distributed in the astrocyte ECM or delivered in the medium by the cells from the distinct midbrain sub-regions (Garcia-Abreu et al., 1996, 2000) as well as by their abilities to deposit laminin differentially in their own ECM, showing a different organization on each of the astrocyte types: filamentous on lateral astrocytes ECM or mixed, filamentous, and punctuate shape, on medial astrocytes (Garcia-Abreu et al., 1995a).

Among several ECM components, laminin has been implicated in the morphogenesis of the nervous system with abundant evidence of its ability to promote cell migration, differentiation, and axonal guidance *in vitro*

(Chamak and Prochiantz, 1989; Liesi, 1990; Hunter and Brunken, 1997; Colognato and Yurchenco, 2000). Astrocytes are thought to be a major source of ECM molecules in the CNS (Pindzola et al., 1993; Powell and Kleinman, 1997) even when differentiated *in vitro*, and they also produce laminin. *In vivo*, its laminin expression decreases during normal astroglial maturation and in the injured adult CNS, laminin is produced only in some reactive astrocytes near lesions (Liesi, 1985; Giftchristos and David, 1988; McKeon et al., 1991).

Glioblastomas are the most common subtype of primary brain tumors and are characterized by its highly proliferative index, aggressive invasiveness, and short survival, being considered one of the deadliest of human cancers (Kleihues and Cavenee, 2000). As normal laminin-producing glial cells and laminin itself from an exogenous source are the preferential substrate for neuron growth, and glial tumors have been shown to produce laminin *in vitro* and *in vivo* (Giese et al., 1995; Chintala et al., 1996; Ljubimova et al., 2006), we questioned whether glioblastoma retained the normal glial properties and behavior with respect to supporting neuronal growth. To approach these questions, rat neurons were co-cultured onto rat normal astrocytes or non-neural cells or onto three human glioblastoma cell lines obtained from neurosurgery. We verified that human glioblastoma cells as well as astrocytes supported neuritogenesis, but non-neural cells failed to do so. Different from astrocytes, glioblastoma cells did not distinguish embryonic from neonatal neurons in relation to neurite pattern in the co-cultures. Laminin organization on both normal and tumoral glial cells was changed from a filamentous arrangement to a mixed punctuate/filamentous pattern when in co-culture with neurons. Our data strongly suggest that like astrocytes, Gbm cells recognize neurons as partners to support growth of complex neurite and that neurons modify glioblastoma laminin organization.

---

## Materials and methods

### Animals

All animals were kept under standard laboratory conditions according to NIH guidelines.

### Primary astrocyte, neuronal, and endothelial cell cultures

Astrocyte primary cultures were prepared from newborn (0–1-day old; P0) Wistar rat cerebral cortices, as described previously (Trentin and Moura Neto, 1995). Dissociated cells were plated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12/10% FBS into a 15.5 mm diameter well (24-well plate) and/or 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning Inc., New York, New York), previously coated with polyornithine (1.5  $\mu$ g/ml, Mr 41,000; Sigma, St. Louis, MO). For immunocytochemistry assays, cells were plated on polyornithine-treated glass coverslips. The cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air chamber for 10 days until reaching near confluence.



Primary neuronal cell cultures were prepared from 18 day embryonic (E18) and newborn (0–1 day old; P0) Wistar rats cerebral cortices as previously described (Moura Neto et al., 1983). Briefly, single-cell suspensions were obtained by dissociating cells of cerebral cortices in DMEM/F12 medium supplemented with glucose (33 mM), glutamine (2 mM), and sodium bicarbonate (3 mM).  $5 \times 10^4$  cells were plated either on polyornithine-treated coverslips placed on a 24-well plate to single neuronal cultures or plated onto normal or tumor cell monolayers to a co-culture, as indicated below. The neuronal cultures or the co-cultures were kept in DMEM/F12 medium without serum or supplements for up to 24 or 48 hr.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained by treatment of umbilical veins with a 0.1% collagenase IV solution (Sigma) as described previously (Jaffe et al., 1973) and adapted by Ferrari de Outeiro-Berstein et al. (2002). Dissociated cells were plated in plates previously treated with porcine skin gelatin and grown in M199 supplemented with 2 mM glutamine, 2.5 mg/ml amphotericin B, 100 mg/ml penicillin, 100 mg/ml gentamycin, 0.13% sodium bicarbonate, and 20% fetal calf serum (FCS). Cells were maintained as indicated for astroglial cells.

#### Human glioblastoma (Gbm) cell culture

Primary human glioblastoma cell cultures (Gbm) were obtained, by surgical biopsy, from patients who had given written consent to the study, and the procedures were in agreement with the Brazilian Ministry of Health Ethic Committee (CONEP No. 2340). The tumor samples were analyzed histologically by the Pathology Service of the Federal University of Rio de Janeiro Hospital. The glial tumor biopsies were washed in DMEM medium, mechanically dissociated, plated onto glass coverslips previously coated with polyornithine, or directly plated on a 24-well plate and/or 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning) in growth medium DMEM/F12 supplemented with 10% FCS. The cell cultures were kept as described above. The medium was changed every 3 days until the culture was near confluence, in around 7 days. Then, cell cultures were either fixed and processed for characterization as described below, or split, or frozen in media containing 50% glycerol, 50% growth medium in cryotubes, and conserved in liquid N<sub>2</sub>. The tumor cells were named Gbm95, Gbm02, and Gbm03.

#### Cell line cultures

RAT (Fibroblast cell line) was a generous gift from Dr. Ulisses Gazos Lopes (Lopes et al., 1997); MCF7 (breast cancer cell line) and U79 (uterus cancer cell line) were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/home.html>). These cell lineages were cultured as described for Gbm cells.

#### Co-cultures

Primary astrocytes, Gbm, and cell line monolayer plated on coverslips were used as a carpet to grow, in co-culture, neurons from E18 and P0 rat cortices as described in Garcia-Abreu et al. (1995b). Briefly, cell monolayers near confluence were washed three times with serum-free DMEM/F12. Cells ( $5 \times 10^5$ ) freshly dissociated from E18 or P0 rat brain hemispheres obtained as indicated above were plated onto those monolayers. The co-cultures were maintained 24 or 48 hr in serum-free DMEM/F12 and then, the media were discarded and the co-cultures were fixed with paraformaldehyde for immunocytochemistry, morphometry, and statistical analyses of the neuronal morphology.

#### Histological analyses and immunocytochemistry

Biotin–streptavidin–peroxidase immunohistochemistry was performed in 3–4 μm thickness paraffin tumor sections. Sections were

immunostained with anti-GFAP monoclonal primary antibody (1:50, Dako, CA). The Universal Immunostaining System Streptavidin–Peroxidase kit (Coulter, Fullerton, CA) was used to develop the reaction. Hematoxylin was used to stain and counterstain paraffin tumor sections and mounted with PERMOUNT. The primary antibody was omitted to provide negative controls.

All samples were examined under a light microscope Nikon (Tokyo, Japan) TE 300 and some were selected for image documentation on a CoolSNAP-Proof, ROPER Scientific Photometrics (Tokyo, Japan).

Immunocytochemistry was performed as described previously (Garcia-Abreu et al., 1995b and Gomes et al., 1999b). Briefly, cultured or co-cultured cells plated on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min at room temperature, except by laminin staining. After blocking, cells were incubated with primary antibodies for 1 hr at room temperature, followed by PBS washes and incubation with specific secondary antibody conjugated with Cy3, fluorescent isothiocyanate, or horseradish peroxidase. To perform morphometry analysis, neurites were visualized using the VIP kit (Vector, Burlingame, CA) reaction. Primary antibodies used and dilutions were as follows: anti-GFAP (1:500, Dako), anti-nestin, anti-vimentin and anti-β-tubulin III (1:200, Sigma), and anti-laminin (1:30, Sigma). In all immunostaining-negative controls, reactions were performed by omitting the primary antibody. No reactivity was observed when the primary antibody was absent.

#### Morphometry and statistical analyses

Neurons immunostained for β tubulin III were analyzed by the total neurite length using the Sigma Scan Pro Software (Jandel Scientific, Linshire, UK). In each experiment, at least five independent experiments were performed and each in triplicate, about 100 neurons per well, encompassing three to four fields randomly chosen on the coverslips, were scored per condition. Statistical significance was evaluated using the Mann–Whitney test (Siegel, 1956) from the statistical package of Microsoft Excel version 7.0.

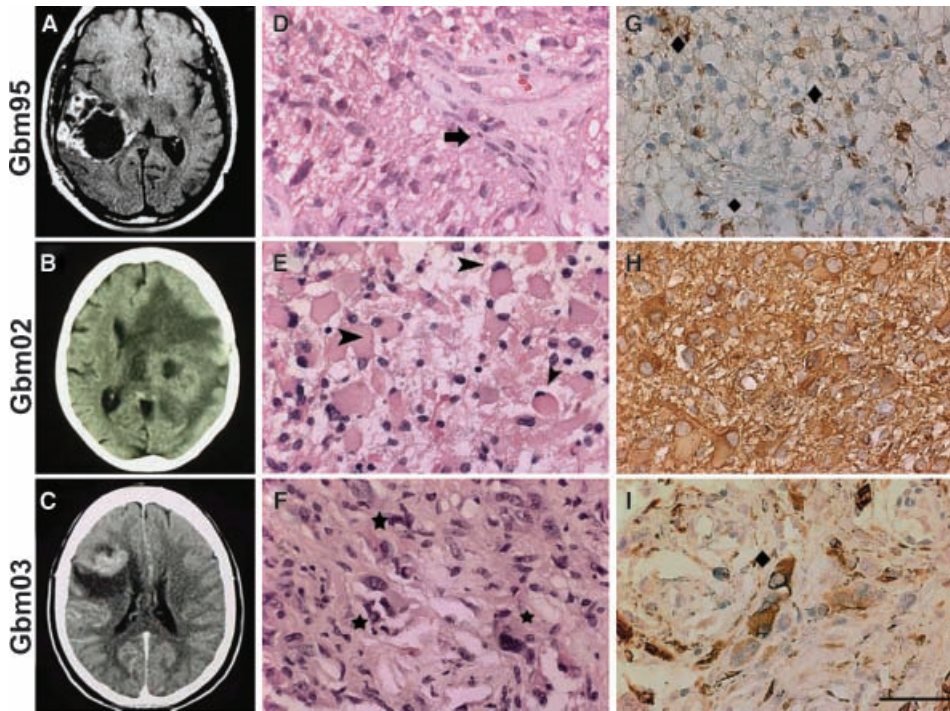
#### Electrophoresis on polyacrylamide gel and Western blot analysis

Protein concentration on cell extracts was measured in triplicate by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA). Fifty micrograms of protein per lane was loaded to electrophoresis in a 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were electrically transferred onto a Hybond-P polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences, Miami, FL) for 1 hr. Membranes were blocked in buffer containing non-fat milk 5%, and incubated with the polyclonal rabbit anti-Laminin (1:300, Sigma), 4°C, overnight. Peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2,000, Amersham) was added to the membrane and incubated for 1 hr at room temperature. Proteins were visualized using the enhancing chemiluminescence detection system (ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Miami, FL). Coomassie blue staining of the gel was used to monitor protein loading.

## Results

### Human glioblastoma characterization

Surgical biopsies from three glial tumors diagnosed as glioblastoma were used in this study. The computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) imaging showed a typical ring-shaped aspect with a hypodense center because of necrosis and peripheral contrast



**Fig. 1** Magnetic resonance, computed tomography image, and histopathology of human glioblastoma. (A) Gbm 95, magnetic resonance depicting a temporal lobe-enhancing lesion with central necrosis and mass effect. Brain computed tomography scans of Gbm 02 (B) and Gbm 03 (C). Note the hypodense area in the lesion area suggesting an edema. Hematoxylin–eosin staining of Gbm 95, Gbm 02, and Gbm 03 (D–F) showing vascular endothelial proliferation (black arrow) gemistocystic figures (arrowhead) and cellular pleomorphism (stars). GFAP immunoreaction of Gbm 95, 02, and 03 (G–I). Note that some neoplastic cells were GFAP-positive (diamonds), although this antigen was primarily identified in the reactive astrocytes that intermingled with tumor cells. Scale bar: 50  $\mu$ m.

enhancement, plus the peritumoral hypodense area due to edema (Figs. 1A–1C). The contrast enhancement was a criterion to suspect a glioblastoma. Hematoxylin–eosin (HE) staining of 4  $\mu$ m histological sections of each tumor sample is shown in Figures 1D–1F. The temporal lobe tumor Gbm95 (Fig. 1A) corresponds to a glial neoplasia with diffuse proliferation of fibrillary astrocytes, moderate nuclear pleomorphism, occasional multinucleated cells with many mitoses, and necrosis as a feature of glioblastoma. In addition, vascular proliferation can be observed in the tumor area (Fig. 1D). Gbm 02 also shows temporal localization (Fig. 1B) and the HE staining permits observation of glial neoplasia with cellular pleomorphism and many gemistocystic figures (Fig. 1E). The frontal lobe neoplasia, Gbm 03 (Fig. 1C), is characterized by pleomorphic astrocytic proliferation and evident hyperchromatic nuclei. In all three tumors, we found focal areas of necrosis, microvascular, and endothelial proliferation (data not shown).

Gbm02 and Gbm 03 were GFAP-positive in many of the neoplastic cells (Figs. 1H,1I). However, in Gbm95, some neoplastic cells were GFAP-positive, although this antigen was primarily identified in the reactive astrocytes that intermingled with cells (Fig. 1G). Together, these observations in combination allowed these three tumors to be classified as glioblastoma.

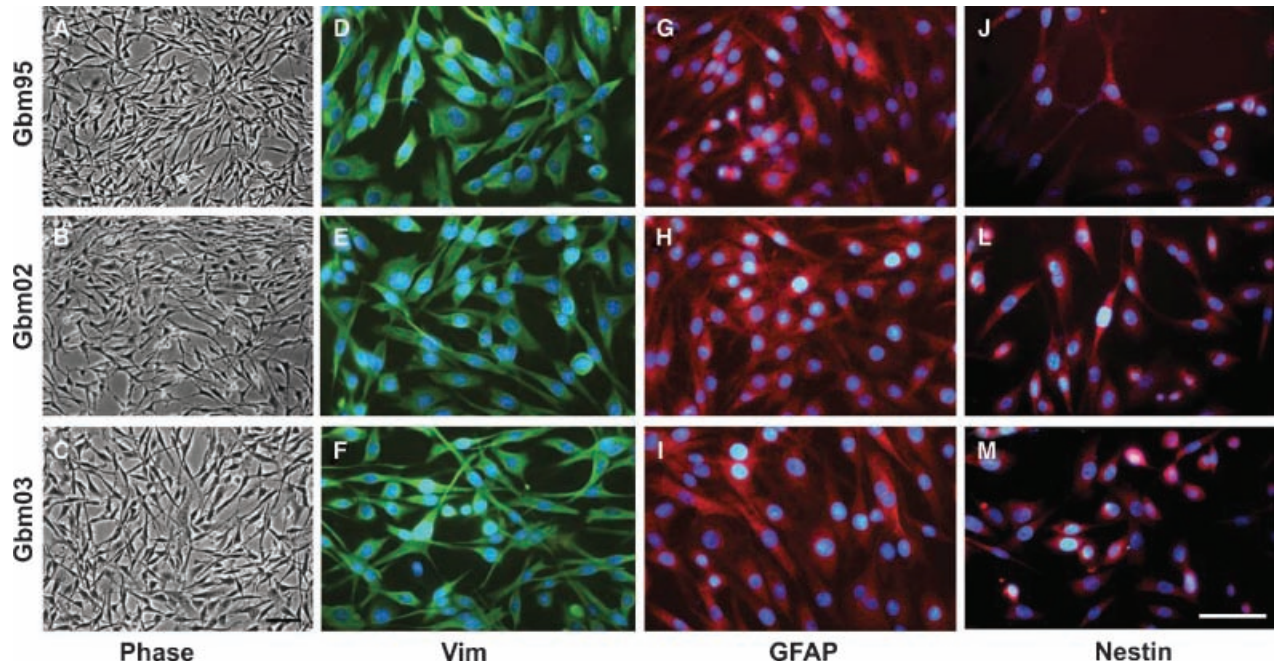
#### Glioblastoma cell cultures

At phase contrast, the glioblastoma cell cultures, Gbm95, Gbm02, and Gbm03, did not show significant

morphological difference (Figs. 2A–2C). However, Gbm cells were morphologically different from the flat-shaped primary astrocytes and non-neural tumors cell lines (data not shown). All these types of glioblastoma cells are positive to vimentine (Figs. 2D–2F), exhibiting the filament network of this protein in the cytoplasm and concentrated around the cellular nuclei. In addition, all Gbm cells were also positive to the anti-GFAP antibody, but the cytoplasm staining has a more punctuate distribution than that of the filamentous network usually observed in normal rat astrocytes (Figs. 2G–2I). Although all cells were stained to these glial-filaments, some of them were more clearly labeled than others (Figs. 2G–2I). Nestin, a precocious intermediate filament cell marker, was present in glioblastoma cells in culture as well (Figs. 2J–2L). Interestingly, we identified many cells that did not react with anti-nestin antibody (Figs. 2J–2L). These results show that in culture Gbm cells express neural markers, thus retaining astroglial identity.

The normal glial and glioblastoma cells are preferential substrates for neurons

In order to evaluate whether human glioblastoma Gbm95, Gbm02, and Gbm03 cells could sustain neurite outgrowth, freshly dissociated cells obtained from 18 day embryonic (E18) or neonatal (P0) rat brain were cultured, under serum-free conditions, onto monolayers of each three types of glioblastoma for 24 hr. The neuron growth supporting properties of glioblastoma



**Fig. 2** Human glioblastoma cell characterization. Phase contrast photomicrography of Gbm 95 (A), Gbm 02/02 (B), and Gbm 03/02 (C). Vimentin, GFAP, and nestin immunostaining of Gbm 95

(D, G, J), Gbm 02/02 (E, H, L), and Gbm 03/02 (F, I, M), respectively. Scale bar: 50  $\mu$ m. Panels D to M show blue nuclei 4',6-diamidino-2-phenylindole staining. Scale bar: 50  $\mu$ m.

monolayers was compared with that of normal primary astrocytes from newborn rat brain (Figs. 3A–3D). During the first 24 hr, E18 neurons extended neurite with very complex branches when co-cultured onto normal astrocytes as well as onto glioblastoma cells, although we observed that the neurites were shortened on Gbm than in astrocyte carpets (Figs. 3A–3D). The Gbm02 seemed to be a slightly better substrate for neurite extension than the other two glioblastoma, Gbm95 and Gbm03 (compare Figs. 3C with 3B, 3D).

In order to observe the progression of neurites, we maintained the co-cultures for one more day (Figs. 3E–3H) under the same condition. Neurons co-cultured onto normal glial or onto Gbm cell carpet showed very long and similar complex neurites (Figs. 3E–3H). We noticed that in both glial and Gbm carpets, neurons sometimes aggregate their cell bodies and extend neurites (Figs. 3E–3H). In order to investigate whether glial and tumor carpets are capable of supporting the growth of aged neurons, we co-cultured neonatal cells onto these carpets (Figs. 3I–3Q). As we observed previously, neurons exhibited similar pictures of complex neurites when co-cultured onto glial or tumor carpets for one or two days (Figs. 3I–3Q). On the second day of co-culture, neurons exhibited a very similar profile, extending normally branched neurites (Figs. 3N–3Q), although it seemed that both P0 neurites were shorter on the second day of co-culture than E18 neurites co-cultured onto the glial substrates (compare Figs. 3E, 3N).

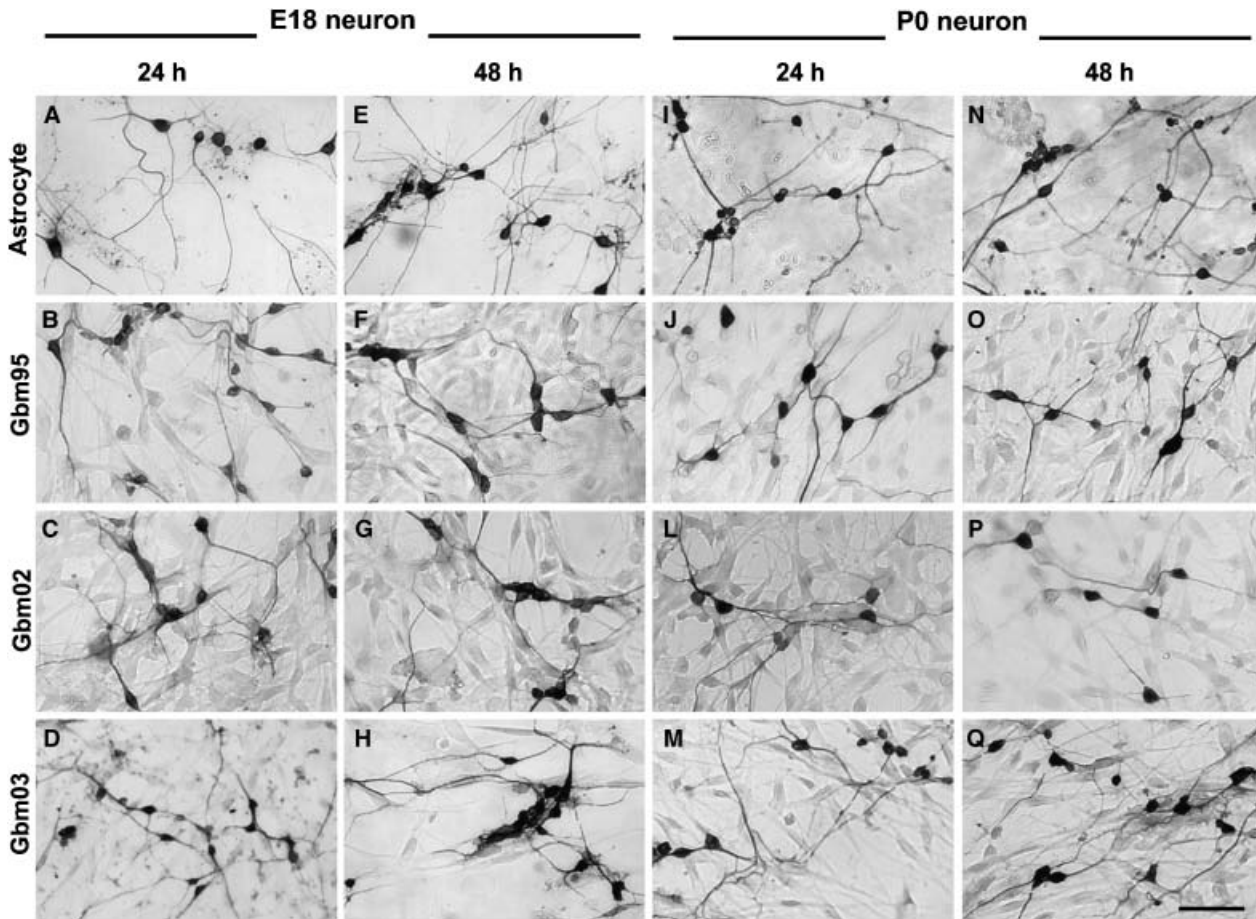
Monolayers of a lineage of rat fibroblast were used as non-neural cell carpet to co-culture neurons under the

same conditions, but in this case neurons exhibited a paucity of neurites (not shown). Despite the scarcity of neurites on the neurons co-cultured onto fibroblast, under this condition no neuron was able to survive more than 6 hr. To verify whether another human cell, but non-neural cell, could support neurite growth of neurons, we co-cultured freshly prepared newborn neurons on monolayers of MCF7, a breast tumor lineage, a U79 human uterus tumor lineage, and on HUVEC, a normal human cell prepared from a human umbilical vein. It was observed that neurons did not survive, and died during the first 6 hr of co-cultures on all these cell carpets tested (not shown).

These observations led to the conclusion that human glioblastoma cells retain the property of normal glia to recognize neurons as a partner and favor their development and neurite growth in culture.

#### Does neurite outgrowth show age-related differences?

In order to compare the neurite patterning of embryonic neurons with that of newborn neurons in glial and tumor substrates, we used a morphometry study of the neuronal complexity in co-cultures described above (Fig. 4). The longest neurite (Fig. 4A) growing on normal glia carpet from embryonic E18 neurons were 400  $\mu$ m in the first 24 hr. After 48 hr in co-culture, the longest neurite increased 50% of growth, reaching 600  $\mu$ m in length (Fig. 4B). E18 neurons cultured onto human glioblastoma cells developed shorter neurites,



**Fig. 3** Representative morphology of  $\beta$  tubulin III-positive neurons co-cultured onto astrocytes and Gbm cells in different times. E18 neurons were co-cultured for 24 and 48 hr onto astrocytes (A, E),

Gbm 95 (B, F), Gbm 02 (C, G), and Gbm 03 (D, H). P0 neurons were co-cultured for 24 and 48 hr onto astrocytes (I, N), Gbm 95 (J, O), Gbm 02 (L, P), and Gbm 03 (M, Q). Scale bar: 50  $\mu$ m.

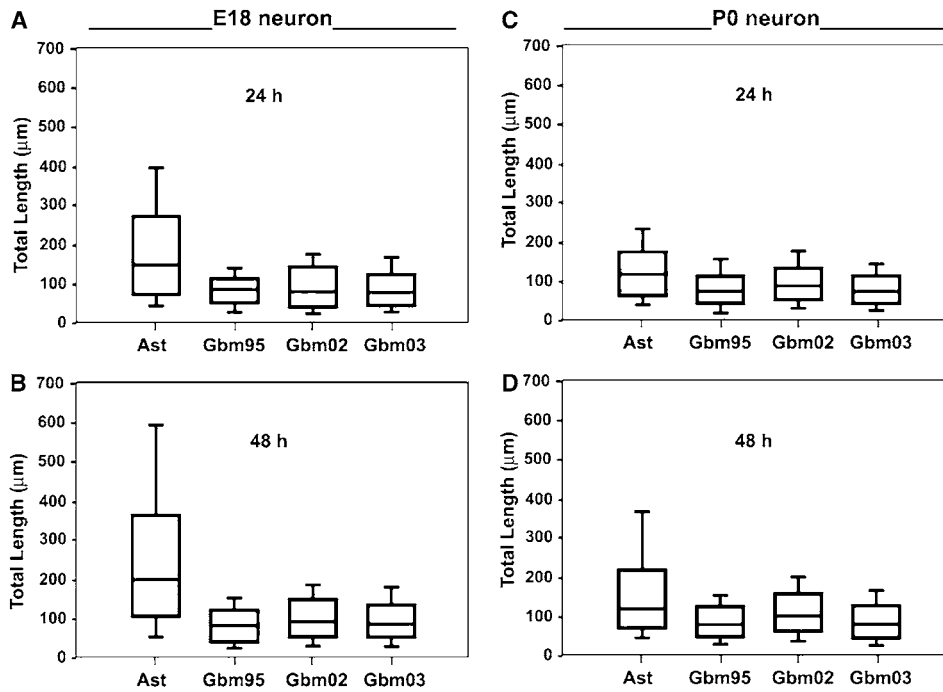
the longest being 200  $\mu$ m (Figs. 4A,4B). These differences between neurite lengths of the two types of substrates, normal versus tumoral glia, were around three to four times in the first 24 hr and increased to four to five times during the next day of co-culture, favoring the growth of neurites onto normal glia carpet. Although the longest neurite of E18 neurons on normal glia carpet was four times longer than those found on tumor glia, when we analyzed the median of total length we found an increase of only 1.5 times on the first day and up to two times for the second day (Figs. 4A,4B). This could then explain the apparent similarity shown in Figure 3.

The normal astrocytes, during the first 24 hr of co-culture, supported P0 neurite growth up to 240  $\mu$ m and it reached nearly 400  $\mu$ m on the second day of co-culture, which was lower than the corresponding length displayed by E18 neurons (Figs. 4A–4D). The median of total length neurite was nearly a half of the neurite length from embryonic E18 neurons, even after 48 hr in co-culture (Figs. 4C,4D). Thus, astrocytes were a better substrate, although the total lengths of the longest neurites in P0 neurons were shorter than those observed

from the E18 neurons (Figs. 4A–4D), suggesting that astrocytes can distinguish embryonic neurons developing from newborn rat neurons by inducing different neuritic patterning. On the other hand, it was noticeable that embryonic and neonatal neurons growing onto glioblastoma cell carpets showed total length of neurites and median lengths that were similar during 24 and 48 hr of co-culture (Figs. 4A–4D). These results led us to conclude that astrocytes are able to distinguish the different neurite growth potential characteristic of embryonic and neonatal neurons. Further, Gbm cells are not able to distinguish these different neuronal potentials. Therefore, Gbm cells cannot recapitulate some aspects of astrocyte–neuron interaction, but they at least retain the permissive properties of neurite growth.

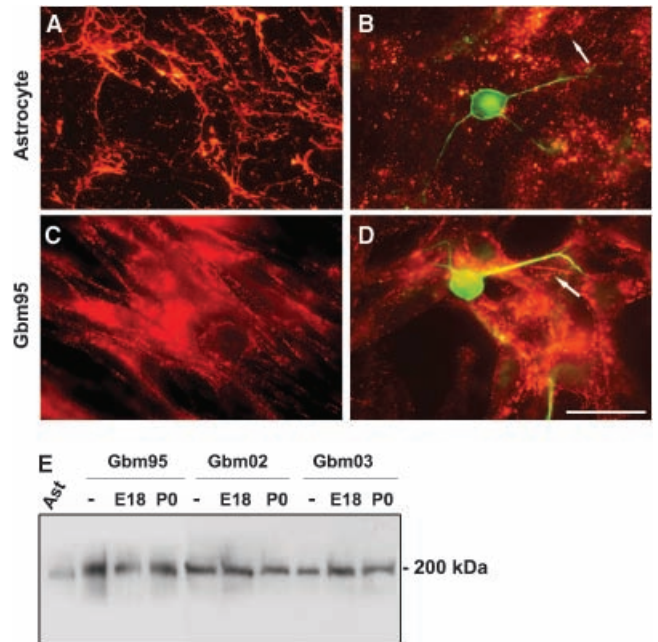
#### Neurons modulate laminin pattern on glial and Gbm cells

In order to verify whether laminin expressed by Gbm and glial cells in co-culture shows a particular organi-



**Fig. 4** Morphometry analysis of total length of neurites from  $\beta$  tubulin III-positive neurons co-cultured onto astrocytes and Gbm cells in different times. Graphs showing the total length of neurites from  $\beta$  tubulin III-positive neurons. E18 neurons were co-cultured for 24 hr (A) and 48 hr (B) onto astrocytes and Gbm 95, 02, 03 cells. P0 neurons were co-cultured for 24 hr (C) and 48 hr (D) onto astrocytes and Gbm 95, 02, 03 cells. Box and whisker plots show distribution of the total length of neurites on each cellular type. Boxes enclose 25th and 75th percentiles of each distribution and are bisected by the median; whiskers indicate 5th and 95th percentiles.

zation related to permutation and sustaining neurite outgrowth, a polyclonal anti-laminin antibody was used to identify this glycoprotein deposition on normal astrocytes and Gbm cells under the same experimental conditions used previously (Fig. 5). Laminin was stained as a mesh-network (hypodense) on the surface of astrocyte cultures (Fig. 5A). On Gbm cells, we observed an intense fluorescence of laminin staining on its surface that seemed to be arranged in a manner similar to normal astrocytes, but with a highly dense staining following cell shape and indicating a higher laminin density in tumor ECM (Fig. 5C). In fact, protein extracts from the three Gbm cell lines seemed to be at least twice the amount of laminin if compared with those of normal astrocytes (Fig. 5E). In an attempt to evaluate the laminin organization in both glia and tumor cells under the co-cultures described above, a comparative immunostaining of laminin was performed (Figs. 5B,5D). Surprisingly, it was observed that the fibrillar meshwork of laminin on the surface of glial and tumor cells was changed when both embryonic and neonatal neurons were present on top of the carpets (Figs. 5B,5D). Fibrillar ECM laminin changed to a mixed arrangement, slightly fibrillar, but with a densely distributed punctuate laminin organization in both astrocytes and glioblastoma cells. In addition, we observed laminin patches more clearly present in neuron-Gbm co-cultures than in Gbm cultures. Interestingly, we rarely observed these laminin patches in astrocyte cultures. These results suggest that the laminin reorganization was due to the neuron-glia co-culture condition, suggesting that neurons could control the organization of normal or glioblastoma ECM cells, at least regarding laminin patterning.



**Fig. 5** Neurons modulate laminin pattern on glial and Gbm cells. Laminin immunoreaction (red) of Astrocyte (A) and Gbm 95 cells (C) showing the predominant fibrillar pattern on the cell surface. E18  $\beta$  tubulin III-positive neurons (green) co-cultured onto astrocytes (B) and Gbm 95 cells (D) altered the fibrillar pattern to a mixed fibrillar and punctuate pattern (Arrows). The same results were found when P0 neurons were used (not shown). (E) Immunoblot analysis of the 200 kDa laminin content in the cell extracts from astrocytes, Gbm cells co-cultured or not with E18 or P0 neurons. Scale bar: 50  $\mu$ m.

## Discussion

In this report, we investigated the interactive properties of neuron and glial cells, looking for similarities and differences between normal and tumor glial cells, with respect to survival and support of neuritic growth from embryonic and neonatal neurons. Our experiments point out that the interactivity characteristic of glial cells with neurons is well preserved, even when malignant transformation of glia is occurring. The following conclusions can be arrived at from our experiments: (1) rat astrocytes distinguish the neuritic growth potential of embryonic and newborn neurons; (2) although supportive to neuritic growth, glioblastoma cells lose their characteristic of normal glia to distinguish this potential; (3) non-neural cells tested here cannot support neuronal growth; (4) glioblastoma cell produces laminin as an exuberant density deposited on its ECM; and finally, in a pioneer experiment to our knowledge, (5) it was demonstrated that neurons modulate laminin organization on ECM from normal or tumoral glial cells.

Among neuroectodermal neoplasias, glioblastoma is a highly malignant tumor. This tumor entity (Russell and Rubinstein, 1989) of astrocytic lineage can arise through a process of anaplasia from astrocytoma, by progressive steps of pre-existent lower grade astrocytic tumor (Schiffer, 1997). Glioblastoma are mainly localized in cerebral hemispheres, preferentially arising in the subcortical white matter (Kleihues and Cavenee, 2000) and rarely present in the gray matter. Three samples from different patients were investigated and showed glioblastoma patterns as indicated by tomography diagnosis, staining with HE in paraffin sections, and GFAP immunostaining. Although GFAP has been considered a specific marker to normal or tumor glial cells from astrocytic lineage (Eng et al., 1971) and is currently used for diagnosis (Deck et al., 1978), investigation of the GFAP presence in these three tumors showed varied expression, with some positive cells to astrocytic antigen and other negative ones, and sometimes the overall GFAP levels were lower than normal glia. A similar picture has been described for SV-40T antigen immortalized glial cells (Moura Neto et al., 1986; Frisa et al., 1994) or for another human glioblastoma (Gomès et al., 1997). In fact, these differences of GFAP expression in glioblastoma could account for possible highly proliferating tumor cells negative for GFAP (Schiffer, 1997) and because of an increasing astrocytic anaplasia, causing a progressive loss of GFAP production (Duffy et al., 1982). Thus, these differences of GFAP expression between glioblastoma cells could be explained by the cellular heterogeneity of the tumor (Singh et al., 2003) or perhaps because of a transformation of stem cells by asymmetrical division (Reya et al., 2001; Berger et al., 2004). Then, the expression of GFAP could be preceded by another protein

expression, for instance nestin before the conversion of immature glial cells and GFAP astrocytic tumoral cells.

After tumor removal, the biopsies of glioblastoma used here were cultured for several generations, frozen, and re-plated, and they always retained the same morphology and growth rate in culture. Three Gbm cells were stained for GFAP and vimentin, but nestin immunoreaction was not found in all cells. In fact, it has been demonstrated that established astrocytoma cell lines, with enhanced motility and invasive potential, are decorated with nestin (Rutka et al., 1999). Although we could not double immunostain for intermediate filaments in our experiments, it is possible that nestin-positive cells are also GFAP positive. This co-expression could either point to a close relationship between proliferating glioblastoma cells and precursor cells or proliferating reactive astrocytes present in the tumor mass (Lin et al., 1995). Our work is more in accordance with the first possibility above, as it would be difficult to believe in the presence of reactive astrocytes in the culture after more than 15 splits.

Astroglia is a unique substrate for the *in vitro* growth of central nervous system neurons (Noble et al., 1984). In our experiments, normal glia or human Gbm cell supported neuron survival and neurite growth with complex arborization. Neither rat fibroblast and HUVEC, nor non-neural human tumor cell tested in this work supported neuron. Moura Neto et al. (1986) reported that mesencephalic rodent glial cells, normal or transformed by SV-40T antigen (SV-40 Tag), support the development of rodent neurons (Mallat et al., 1986). These SV-40-transformed mesencephalic astrocytes could induce the same degree of growth complexity in mesencephalic or striatal neurons. It has also been shown that SV-40 Tag-immortalized astrocytes that expressed lower GFAP levels supported neurite extension, but less efficiently than normal astrocytes (Frisa et al., 1994). Our results from the astroglial and Gbm cells are in agreement with these reports, and show for the first time that despite being able to support neurite growth, Gbm cells different from astrocytes are not able to distinguish the distinct neuritic growth potential characteristic of embryonic and newborn neurons. Although we cannot rule out the possibility that these differences are due to homotypes versus heterotypes cells, rat neuron/rat glia versus rat neuron/human glia, respectively, these findings strongly suggest that changes in the glial cells ECM, or in the glial membrane components, or glial-soluble molecules recognizing the surface of the neurons are playing a pivotal role in this neuron–glia interaction.

Laminin is one of the ECM components implicated in neurite growth and is expressed by glial cells. Four distinct immunoreactive patterns can be organized in developing rat brain: small and large punctiform laminin, sheath laminin, and somal laminin on the ECM (Zhou, 1990) with unique spatial and temporal distributions. Our previous study demonstrated that fibrillar or punc-

tuate glial-ECM laminin organization is related to different degrees of neurite extension (Garcia-Abreu et al., 1995a; Freire et al., 2002; for a review, see Cavalcante et al., 2002). Here, we verified that levels of laminin expression seem to be higher in Gbm than in glial cells. In fact, laminin isoforms change from normal astrocytes to glioblastoma and it is overexpressed in glial tumor cells (Ljubimova et al., 2004, 2006). Interestingly, in our experiments the presence of neurons on glial or Gbm cell surface changed the laminin organization from fibrillar to a predominant punctuate array. Differences in laminin organization may be due to different isoforms expressed (Ljubimova et al., 2004) or as we have published, due to a focal altered pH on cell surface (Freire and Coelho-Sampaio, 2000) that could be induced by sialic acid present on the membrane surface of the glial cells (Freire et al., 2004), and by consequence favors neuriteogenesis or cell proliferation. In these reports, the implications of protein kinases A or C were demonstrated. As laminin is involved both in  $\beta 1$  integrin-dependent and independent signaling mechanisms during neurogenesis (Andressen et al., 2005), our results suggest that the interconversion of laminin forms described here could also be dependent on a possible role of neurons or their signaling molecules acting on the glial membrane surface and ECM similar to Reelin, Disabled 1, and  $\beta 1$  integrins acting on radial glial (Dulabon et al., 2000; Förster et al., 2002), for instance. Experiments are in progress to understand this mechanism more clearly. Our results show that neuronal control of laminin might be relevant to understanding the biological properties of glial and tumor cells *in vivo*. If malignant glia cells recognize signals provided by normal neurons, then perhaps migration and invasion of glioblastoma cells in the brain are supported by cross-talk between migrating tumoral cells and the neighboring neurons.

In conclusion, our results show for the first time that human glioblastoma cells, in spite of their malignant progression, maintain glial characteristics to support neuronal survival and neurite outgrowth, although they did not retain normal glial properties of distinguishing young neurons from aged ones. In addition, we also concluded that neurons modulate laminin organization in glioblastoma cells as well as in normal glia.

**Acknowledgments** We thank Dr. Helena L. Borges for discussions and comments on the manuscript, Dr. Ulisses G. Lopes for kindly gifting the RAT fibroblast cell line, and Adiel Batista for animal care. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), and Fundação Ary Frauzino, Brazil.

## References

- Andressen, C., Adrian, S., Fassler, R., Arnhold, S. and Addicks, K. (2005) The contribution of  $\beta 1$  integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *Eur J Cell Biol* 84:973–982.
- Berger, F., Gay, E., Pelletier, L., Tropel, P. and Wion, D. (2004) Development of gliomas: potential role of symmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol* 5:511–514.
- Cavalcante, L.A., Garcia-Abreu, J., Moura Neto, V., Silva, L.C. and Weissmuller, G. (2002) Modulators of axonal growth and guidance at the brain midline with special reference to glial heparan sulfate proteoglycans. *An Acad Bras Cienc* 74: 691–716.
- Chamak, B. and Prochiantz, A. (1989) Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. *Development* 106:483–491.
- Chintala, S.K., Sawaya, R., Gokaslan, Z.L., Fuller, G. and Rao, J.S. (1996) Immunohistochemical localization of extracellular matrix protein in human glioma, both *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Lett* 101:107–114.
- Colognato, H. and Yurchenco, P. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dynam* 218:213–234.
- Deck, J.H., Eng, L.F., Bigbee, J. and Woodcock, S.M. (1978) The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol* 42: 183–190.
- Denis-Donini, S., Glowinski, J. and Prochiantz, A. (1984) Glial heterogeneity might define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurons. *Nature* 307: 641–643.
- De Sampaio e Spohr, T.C., Martinez, R., da Silva, E.F., Moura Neto, V. and Gomes, F.C. (2002) Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor- $\beta 1$ . *Eur J Neurosci* 16:2059–2069.
- Duffy, P.E., Huang, Y.Y. and Rapport, M.M. (1982) The relationship of GFAP to the shape, motility and differentiation of human astrocytoma cells. *Exp Cell Res* 139:145–157.
- Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A. and Anton, E.S. (2000) Reelin binds  $\alpha 3\beta 1$  integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27:33–44.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A. and Gerstl, B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28:351–354.
- Ferrari de Outeiro-Berstein, M.A., Nunes, S.S., Andrade, A.C., Alves, T.R., Legrand, C. and Morandi, V. (2002) A recombinant NH(2)-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biol* 21:311–324.
- Förster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K.H., Johansen, C., Grasu-Porta, D., Müller, U. and Frotscher, M. (2002) Reelin, Disabled 1, and  $\beta 1$  integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13178–13183.
- Freire, E. and Coelho-Sampaio, T. (2000) Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *J Biol Chem* 275:817–822.
- Freire, E., Gomes, F.C.A., Linden, R. and Moura Neto, V. (2002) Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuriteogenesis. *J Cell Sci* 115:4867–4876.
- Freire, E., Gomes, F.C.A., Linden, R. and Moura Neto, V. (2004) Sialic acid residues on astrocytes regulate neuriteogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. *J Cell Sci* 117: 4067–4076.
- Frisa, P.S., Goodman, M.N., Smith, G.M., Silver, J. and Jacobberger, J.W. (1994) Immortalization of immature and mature mouse astrocytes with SV40T antigen. *J Neurosci Res* 39: 47–56.
- Fróes, M.M., Correia, A.H.P., Garcia-Abreu, J., Spray, D.C., Campos De Carvalho, A.C. and Moura Neto, V. (1999) Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7541–7546.

- Garcia-Abreu, J., Cavalcante, L.A. and Moura Neto, V. (1995a) Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *NeuroReport* 6:761–761.
- Garcia-Abreu, J., Mendes, F.A., Onofre, G.R., De Freitas, M.S., Silva, L.C., Moura Neto, V. and Cavalcante, L.A. (2000) Contribution of heparan sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. *Glia* 29: 260–272.
- Garcia-Abreu, J., Moura Neto, V., Carvalho, S.L. and Cavalcante, L.A. (1995b) Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. *J Neurosci Res* 40: 417–477.
- Garcia-Abreu, J., Silva, L.C., Tovar, F.F., Onofre, G.R., Cavalcante, L.A. and Moura Neto, V. (1996) Compartmental distribution of sulfated glycosaminoglycans in lateral and medial midbrain astroglial cultures. *Glia* 17:339–344.
- Giese, A., Rief, M.D., Tran, N.L. and Berens, M.E. (1995) Specific attachment and migration of human astrocytoma cells on human but not murine laminin. *Glia* 13:64–74.
- Giftchristos, N. and David, S. (1988) Laminin and heparan sulphate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting. *J Neurocytol* 17:385–397.
- Gomès, D., De Nechaud, B., Maunoury, R., Moura Neto, V., Brigaudeau, C., Labrousse, F. and Dupouey, P. (1997) Glial fibrillary acidic protein expression in a new human glioma cell line in culture before and after xenogenic transplantation into nude mice. *Acta Neuropathol* 94:376–384.
- Gomes, F.C., Garcia-Abreu, J., Galou, M., Paulin, D. and Moura Neto, V. (1999a) Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia* 26:97–108.
- Gomes, F.C.A., Paulin, D. and Moura Neto, V. (1999b) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32:615–631.
- Hatten, M.E. (1985) Neuronal regulation of astroglia morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol* 100:384–396.
- Hatten, M.E. (1987) Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *J Cell Biol* 104:1353–1360.
- Hunter, D.D. and Brunken, W.J. (1997) B2 laminins modulate neuronal phenotype in rat retina. *Mol Cell Neurosci* 10:7–15.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745–2756.
- Kleihues, P. and Cavenee, W.K. (2000) Pathology and genetics – tumors of the nervous system. World Health Organization classification of tumors. IARC, Lyon, 314p.
- Liesi, P. (1985) Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? *EMBO J* 4:1163–1170.
- Liesi, P. (1990) Extracellular matrix and neuronal movement. *Experientia* 46:900–907.
- Lim, D.A. and Alvarez-Buylla, A. (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7526–7531.
- Lin, R.C., Matesic, D.F., Marvin, M., McKay, R.D. and Brustle, O. (1995) Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis* 2:79–85.
- Ljubimova, J.Y., Fujita, M., Khazenzon, N.M., Das, A., Pikul, B.B., Newman, D., Sekingachi, K., Sorokin, L.M., Sasaki, T. and Black, K.L. (2004) Association between laminin-8 and glial tumor grade, recurrence, and patient survival. *Cancer* 101: 604–612.
- Ljubimova, J.Y., Fujita, M., Khazenzon, N.M., Ljubimov, A.V. and Black, K.L. (2006) Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Front Biosci* 11: 81–88.
- Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R. and Cooper, G.M. (1997) p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 272:12893–12896.
- Mallat, M., Moura Neto, V., Gros, F., Glowinsky, J. and Prochiantz, A. (1986) Two simian virus 40 (SV40)-transformed cells lines from the mouse striatum and mesencephalon presenting astrocytic characters. II. Interactions with mesencephalic neurons. *Brain Res* 391:23–31.
- McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S. and Silver, J. (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398–3411.
- Mittaud, P., Labourdette, G., Zingg, H., Guenot-Di Scala, D. (2002) Neurons modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocyte involvement of TGF $\beta$  and membrane components. *Glia* 37:169–177.
- Moura Neto, V., Mallat, M., Chneiweiss, H., Premont, J., Gros, F. and Prochiantz, A. (1986) Two simian virus 40 (SV40)-transformed cell lines from the mouse striatum and mesencephalon presenting astrocytic characters. I. Immunological and pharmacological properties. *Brain Res* 391:11–22.
- Moura Neto, V., Mallat, M., Jeantet, C. and Prochiantz, A. (1983) Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. *EMBO J* 2:1243–1248.
- Nakayama, T., Momoki-Soga, T. and Immae, N. (2003) Astrocytic-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res* 46:241–249.
- Nedergaard, M. (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768–1771.
- Noble, M., Fok-seang, J. and Cohen, J. (1984) Glia are a unique substrate for the in vitro growth of central nervous system neurons. *J Neurosci* 4:1892–1903.
- Pindzola, R.R., Doller, C. and Silver, J. (1993) 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* 156:34–48.
- Pires-Neto, M.A., Braga-De-Souza, S. and Lent, R. (1998) Molecular tunnels and boundaries for growing axons in the anterior commissure of Hamster embryos. *J Comp Neurol* 399:176–198.
- Powell, S.K. and Kleinman, H.K. (1997) Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 29:401–414.
- Rakic, P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61–83.
- Rakic, P. (1981) Neuronal–glial interaction during brain development. *TINS* 4:184–187.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. and Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111.
- Rouach, N., Glowinski, J. and Giaume, C. (2000) Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149:1513–1526.
- Rouach, N., Tence, M., Glowinski, J. and Giaume, C. (2002) Co-stimulation of N-methyl-D-aspartate and muscarinic neuronal receptors modulates gap junctional communication in striatal astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1023–1028.
- Russell, D.S. and Rubinstein, L.J. (1989) Pathology of tumors of the nervous system. 5th edn. Arnold, London.
- Rutka, J.T., Ivanchuck, S., Mondal, S., Taylor, M., Sakai, K., Dirks, P., Jun, P., Jung, S., Becker, L.E. and Ackerley, C. (1999) Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int J Dev Neurosci* 17: 503–515.
- Schiffer, D. (1997) Glioblastoma multiforme in brain tumors. Biology, pathology, and clinical references. 2nd revised edn. Springer, Berlin, pp 155–203.
- Siegel, S. (1956) Non-parametric statistic for the behavioral sciences. McGraw Hill, New York, 330 p.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. and Dirks, P.B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828.
- Snow, D.M., Steindler, D.A. and Silver, J. (1990) Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in development of an axon barrier. *Dev Biol* 138:359–376.



- Song, H., Stevens, C.F. and Gage, F.H. (2002) Astroglia induces neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39–42.
- Sousa, V. de O., Romão, L., Moura Neto, V. and Gomes, F.C. (2004) Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur J Neurosci* 19:1721–1730.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123–1133.
- Trentin, A.G. and Moura Neto, V. (1995) T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *Neuroreport* 2:293–296.
- Zhou, F.C. (1990) Four patterns of laminin-immunoreactive structure in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 55: 191–201.

# 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](#)