

*Vivian de Oliveira Sousa Corrêa*

**Papel dos receptores glutamatérgicos  
ionotrópicos do tipo NMDA e  
metabotrópicos do grupo II no  
desenvolvimento do córtex cerebral**

Programa em Ciências Morfológicas

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

***Vivian de Oliveira Sousa Corrêa***

**Papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos  
do tipo NMDA e metabotrópicos do grupo II no  
desenvolvimento do córtex cerebral**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Morfológicas como parte dos requisitos necessários para  
obtenção de grau de Doutor em Ciências Morfológicas

Orientador: Flávia Carvalho Alcantara Gomes  
Laboratório de Neurobiologia Celular  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO

JANEIRO 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Corrêa, Vivian de Oliveira Sousa

Papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA e metabotrópicos do grupo II no desenvolvimento do córtex cerebral/ Vivian de Oliveira Sousa. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.

xiv, 147f. :il. ; 31 cm

Orientador: Flávia Carvalho Alcantara Gomes

Tese (doutorado) – UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.

Referências bibliográficas: f. 96-117.

1. Sistema nervoso central. 2. Astrócitos 3. Comunicação celular. 4. Neuroglia. 5. Citocinas. 6. Fator de crescimento transformante beta. 7. Neurotransmissores. 8. Animais transgênicos. 9. Cultura de células. – Teses. I. Gomes, Flávia Carvalho Alcantara. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

**Título:** Papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA e metabotrópicos do grupo II no desenvolvimento do córtex cerebral

**Autor:** Vivian de Oliveira Sousa Corrêa

Tese de Doutorado submetida à avaliação pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

---

Prof<sup>a</sup>. Flávia Carvalho Alcantara Gomes (Doutora – UFRJ) (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Patrícia Franca Gardino (Doutora – UFRJ) (Examinador)

---

Prof. Jean-Christophe Houzel (Doutor – UFRJ) (Examinador)

---

Prof. Mariana Souza da Silveira (Doutora – UFRJ) (Examinador)

---

Prof<sup>a</sup>. Cláudia dos Santos Mermelstein (Doutora – UFRJ) (Revisora e Suplente)

**Rio de Janeiro**

**2009**

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Professora Flávia Carvalho Alcantara Gomes, com os recursos concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência - Ministério da Ciência e Tecnologia (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## **AGRADECIMENTOS**

*“Tudo posso naquele que me fortalece”* Filipenses 4:13

A Deus, pois tudo o que tenho e tudo que sou vem do meu Senhor.

A minha mãe, a minha irmã Priscila, aos meus avós e a todos os meus familiares.

A minha nova família, meu marido João Marcos, pelo apoio integral.

A minha orientadora Flávia Gomes e a todos do Laboratório de Neurobiologia Celular.

Ao Professor Rogério Panizzutti, colaborador em uma parte deste trabalho.

À Professora Cláudia Mermelstein, por gentilmente aceitar revisar esta tese.

A todos os componentes da banca.

Ao Professor Vivaldo Moura Neto e a todos do ex-“Departamento de Anatomia” e do Programa de Ciências Morfológicas.

A todos os meus amigos que têm se alegrado comigo por mais esta vitória.

A todos vocês, muito obrigada e que o Senhor Jesus os abençoe!

## RESUMO

CORRÊA, Vivian de Oliveira Sousa. **Papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA e metabotrópicos do grupo II no desenvolvimento do córtex cerebral.** Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

As interações neuro-gliais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso. Este trabalho investigou o papel de transmissores sinápticos (glutamato e D-serina) e um fator trófico, o fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), como mediadores dessas interações durante a diferenciação de células da glia radial (progenitoras neurais) e de astrócitos. No período embrionário, grande parte da população glial é formada pelas células de glia radial (GR). Mostramos que estas células, assim como os progenitores cultivados sob a forma de neuroesferas, expressam Serina Racemase (SR), enzima que converte L-serina em D-serina. Como a GR está envolvida na migração neuronal, a identificação de SR nesta população é importante, pois a D-serina tem sido relacionada aos processos migratórios. Dados *in vitro* mostraram que o glutamato e a D-serina induzem os progenitores neurais a assumirem um fenótipo radial e aumentam a expressão de BLBP, marcador de células de GR, no córtex cerebral de animais embrionários. Estes dados sugerem um possível papel dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na especialização da GR durante a migração neuronal no córtex cerebral. Analisamos, também, o papel do glutamato na maturação astrocitária através das vias de TGF- $\beta$ 1. Um dos eventos que marcam a diferenciação de astrócitos é a expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP). Em parte deste trabalho, como instrumento metodológico, utilizamos um camundongo transgênico contendo o gene da enzima bacteriana  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) sob a regulação de parte do promotor do gene de GFAP. Aqui, nós mostramos que o glutamato ativa o promotor do gene de GFAP em astrócitos do córtex cerebral. A ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos 2/3 pelos neurônios induz a secreção de TGF- $\beta$ 1, levando a ativação do gene de GFAP e a maturação astrocitária. Ambos, a produção de TGF- $\beta$ 1 e ativação do gene de GFAP por este fator envolve as vias MAPK/PI3K. Nosso trabalho mostra que os receptores glutamatérgicos estão envolvidos em eventos do desenvolvimento do córtex cerebral como especificação das GR e maturação astrocitária.

## ABSTRACT

CORRÊA, Vivian de Oliveira Sousa. **Papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA e metabotrópicos do grupo II no desenvolvimento do córtex cerebral.** Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Neuron-glia interactions play an important role in nervous system development. This work investigated the effect of synaptic transmitters (glutamate and D-serine) and of a trophic factor, the transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), as mediators of such interactions during radial glia cells (neural progenitors) and astrocyte differentiation. Radial glia (RG) cells constitute the major part of the glial population in embryonic cortex. We have shown that these cells, and also the neural progenitors cultivated in neurospheres, express Serine Racemase (SR), an enzyme that converts L-serine in D-serine. As RG is involved in neuronal migration, the identification of SR in this population is important because D-serine has been related to migration. *In vitro* data have shown that glutamate and D-serine induce progenitors to take a radial phenotype and increase BLBP expression, a radial glia cell marker, in the cerebral cortex from embryonic mice. Our data suggest a possible role for glutamatergic receptors NMDA in RG specialization during cerebral cortex neuronal migration. We also analyzed the role of glutamate in astrocyte maturation through TGF- $\beta$ 1 pathways. A hallmark of astrocyte differentiation is the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP). In part of this work, as a methodological approach, we have used a transgenic animal bearing the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) bacteria enzyme gene under the control of part of the GFAP gene promoter. Here, we show that glutamate activates the GFAP gene promoter of astrocytes from cerebral cortex. Glial metabotropic glutamate 2/3 receptor activation by neurons induces TGF- $\beta$ 1 secretion leading to GFAP gene activation and astrocyte maturation. Both TGF- $\beta$ 1 production and GFAP gene promoter activation by this factor, involves MAPK/PI3K pathways. Our work provides evidence that astrocytes surrounding synapses are target of neuronal activity.

## ABREVIATURAS

- AMPA-** *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
- β-Gal-** β-Galactosidase
- BLBP-** proteína ligadora de lipídeo do cérebro, do inglês *brain lipid binding protein*
- BMP-** proteína morfogenética óssea, do inglês *bone morphogenetic protein*
- BSA-** albumina de soro bovino, do inglês *bovine serum albumine*
- CO<sub>2</sub>-** dióxido de carbono
- DAO-** D-aminoácido oxidase
- DMEM F-12-** meio de cultura, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, suplementado com o nutriente F12
- DNAc-** ácido desoxirribonucléico complementar, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*
- E14-** camundongos embrionários de 14 dias
- EGF-** fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor*
- ELA-** Esclerose Lateral Amiotrófica
- FGFb-** fator de crescimento de fibroblasto básico, do inglês *basic fibroblast growth factor*
- FI-** filamento intermediário
- GABA-** ácido gama aminobutírico
- GAPDH-** Desidrogenase Gliceraldeído 3-fosfato, do inglês *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
- GDF-** fator de crescimento e diferenciação, do inglês *growth/differentiation factor*
- GFAP-** proteína ácida fibrilar glial, do inglês *glial fibrillary acidic protein*
- GLAST-** transportador glutamato-aspartato, do inglês *glutamate-aspartate transporter*
- GR-** glia radial
- LTP-** potenciação de longa duração, do inglês *long-term potentiation*
- MAPK-** proteinocinase ativada por mitógenos, do inglês *mitogen-activated protein kinase*
- MC-** meio condicionado
- MEC-** matriz extracelular
- mGluR2/3-** receptores metabotrópicos de grupo II
- NaCl-** cloreto de sódio
- NMDA-** N-Metil-D-Aspartato
- NMDAR-** receptor NMDA
- NGS-** soro normal de cabra; do inglês *normal goat serum*
- P0-** camundongos recém-natos
- PBS-** tampão salina fosfato
- PDGF-** fator derivado de plaquetas, do inglês *platelet-derived growth factor*
- PI3K-** fosfatidilinositol-3 kinase, do inglês *phosphatidylinositol 3 kinase*
- RC1-** anticorpo 1 para glia radial, do ingles *antibody radial cell 1*
- RC2-** anticorpo 2 para glia radial, do ingles *antibody radial cell 2*
- RMS-** corrente migratória rostral, do inglês *rostral migratory stream*
- RNA-** ácido ribonucléico, do inglês *ribonucleic acid*
- RT-PCR-** reação de polimerase em cadeia utilizando a transcriptase reversa, do inglês *reverse transcription – polymerase chain reaction*
- SDS-PAGE-** eletroforese em gel de poliacrilamina utilizando dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*
- SN-** sistema nervoso

**SNC**- sistema nervoso central

**SR**- Serina Racemase

**TBS-T**- tampão Tris salina-Tween, do inglês *Tris Buffer Saline-Tween*

**TGF- $\beta$** - fator de crescimento transformante- $\beta$ , do inglês *transforming growth factor- $\beta$*

**TGF- $\beta$ 1**- fator de crescimento transformante- $\beta$ 1, do inglês *transforming growth factor- $\beta$ 1*

**TGF- $\beta$ 2**- fator de crescimento transformante- $\beta$ 2, do inglês *transforming growth factor- $\beta$ 2*

**TGF- $\beta$ 3**- fator de crescimento transformante- $\beta$ 3, do inglês *transforming growth factor- $\beta$ 3*

**TGFRI**- receptor tipo I para TGF- $\beta$ , do inglês *TGF- $\beta$  receptor type I*

**TGFRII**- receptor tipo II para TGF- $\beta$ , do inglês *TGF- $\beta$  receptor type II*

**TNF- $\beta$** - fator de necrose tumoral- $\beta$ , do inglês *tumor necrosis factor- $\beta$*

**X-Gal**- 5-bromo 4-cloro 3 indolyl-b-D-galactosidase

**ZSV**- zona subventricular, do inglês *subventricular zone*

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Sinalização clássica do TGF- $\beta$ 1_____	18
<b>FIGURA 2:</b> Receptores glutamatérgicos _____	23
<b>FIGURA 3:</b> Distribuição de Serina Racemase (SR) em células de GR <i>in vitro</i> ____	48
<b>FIGURA 4:</b> Influência dos neuromoduladores na população neuronal _____	50
<b>FIGURA 5:</b> Efeito dos neuromoduladores no número total de células e morte celular_____	51
<b>FIGURA 6:</b> Ação de glutamato/D-serina na proliferação dos precursores_____	53
<b>FIGURA 7:</b> Glutamato e D-serina induzem a radialização de progenitores neurais_____	55
<b>FIGURA 8:</b> Ação de glutamato/D-serina na especificação da população de GR __	56
<b>FIGURA 9:</b> Progenitores neurais cultivados em neuroesferas expressam Serina Racemase (SR) _____	58
<b>FIGURA 10:</b> Glutamato e D-serina aumentam os níveis de BLBP em neuroesferas _____	60
<b>FIGURA 11:</b> Ação de glutamato/D-serina na migração em explantes corticais ____	62
<b>FIGURA 12:</b> Expressão do gene repórter ( <i>lacZ</i> ) sob a regulação do promotor de GFAP <i>in vitro</i> _____	64
<b>FIGURA 13:</b> Sinaptossomas ativam o promotor do gene de GFAP em astrócitos transgênicos _____	66
<b>FIGURA 14:</b> Indução do promotor do gene de GFAP por glutamato _____	67
<b>FIGURA 15:</b> Ativação do gene de GFAP por glutamato é mediada por TGF- $\beta$ 1 __	69
<b>FIGURA 16:</b> Ativação da via de TGF- $\beta$ 1 por glutamato _____	71
<b>FIGURA 17:</b> Ativação do gene de GFAP por glutamato ou TGF- $\beta$ 1 é mediada pelas vias de MAPK/PI3K _____	72
<b>FIGURA 18:</b> A fosforilação de Smad2 é independente das vias de MAPK/PI3K em astrócitos _____	74
<b>FIGURA 19:</b> Genes de GFAP de regiões encefálicas distintas são diferentemente modulados por glutamato _____	76

**FIGURA 20:** Participação de glutamato e D-serina na transição das células neuroepiteliais (NE) para GR \_\_\_\_\_ 84

**FIGURA 21:** Participação das vias de sinalização de glutamato e TGF- $\beta$ 1 na ativação do gene de GFAP \_\_\_\_\_ 90

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Anticorpos primários utilizados na imunocitoquímica e imunohistoquímica _____	42
<b>TABELA 2:</b> Anticorpos secundários utilizados na imunocitoquímica e imunohistoquímica _____	42
<b>TABELA 3:</b> Anticorpos primários utilizados no <i>Western blot</i> _____	44
<b>TABELA 4:</b> Anticorpos secundários utilizados no <i>Western blot</i> _____	44

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Células gliais	1
1.1.1. Glia Radial	2
1.1.2. Astrócitos	5
1.2. Diferenciação astrocitária	12
1.3. TGF- $\beta$ 1	16
1.3.1. A família TGF- $\beta$ e sua sinalização	16
1.3.2. Ação do TGF- $\beta$ 1 no SN	19
1.4. Glutamato e seus receptores	22
1.4.1. Receptores metabotrópicos	24
1.4.2. Receptores ionotrópicos	24
1.5. D-serina	26
1.6. Glutamato e D-serina no desenvolvimento do SNC	28
1.7. Justificativa	31
<b>2. OBJETIVOS</b>	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
3.1. Animais	33
3.2. Cultura primária de células astrocitárias	33
3.3. Co-culturas	34
3.4. Preparação do meio condicionado	35
3.5. Preparação e isolamento de frações sinaptossomais	35
3.6. Meio condicionado sinaptossomal	36
3.7. Tratamento das monocamadas astrocitárias	36
3.8. Ensaios de inibição	37
3.9. Coloração com X-Gal	37
3.10. Cultura enriquecida em glia radial	38
3.11. Cultura de explante	39
3.12. Cultura de progenitores neurais	39
3.13. Imunocitoquímica e Imunohistoquímica	40
3.14. <i>Western blot</i>	43
3.15. Extração de RNA	44
3.16. Síntese de DNAc	45
3.17. Reação de RT-PCR	45
<b>4. RESULTADOS</b>	47
4.1. Serina Racemase (SR) é expressa em células de GR <i>in vitro</i>	47
4.2. Glutamato e D-serina induzem o aumento na população de células de GR em cultura	49
4.3. A especificação de células de GR em neuroesfera é induzida por glutamato e D-serina	57
4.4. Efeito do glutamato e D-serina na migração neuronal em explantes de córtex cerebral	59
4.5. Ativação do transgene GFAP- <i>lacZ</i> em culturas astrocitárias	63
4.6. Glutamato ativa o promotor de gene de GFAP de astrócitos transgênicos	65
4.7. Ativação do gene de GFAP por glutamato é mediada por TGF- $\beta$ 1	68

4.8. Ativação do promotor do gene de GFAP envolve as vias de MAPK/PI3K	70
4.9. O gene de GFAP é diferentemente modulado em regiões distintas do encéfalo	73
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8. ANEXOS	118
8.1. ROMÃO, L.; SOUSA, V.O.; MOURA NETO, V. & GOMES, F.C.A. <b>Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF-<math>\beta</math>1 pathways.</b> <i>J. Neurochem.</i> 106: 746-756. 2008.	
8.2. SOUSA, V.O.; ALMEIDA, J.C.; ELLER, C.M. & GOMES, F.C.A. <b>Characterization of TGF-<math>\beta</math>1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes.</b> <i>In Vitro Cell. Dev. Biol.–Animal</i> 42: 171-175. 2006.	
8.3. GOMES, F.C.A.; SOUSA, V.O. & ROMÃO, L. <b>Emerging roles for TGF-<math>\beta</math>1 in nervous system development.</b> <i>Int. J. Dev. Neurosci.</i> 23: 413-424. 2005.	
8.4. Aprovação do protocolo para utilização de animais em experimentos relacionados a esta tese.	

## **1. INTRODUÇÃO**

---

### **1.1. Células gliais**

O tecido nervoso é composto basicamente por dois tipos celulares: neurônios e células gliais. Durante muitos anos, a maioria dos estudos sobre o sistema nervoso central (SNC) se focou fundamentalmente na fisiologia e evolução dos neurônios, uma vez que desempenham papéis cruciais como o recebimento, processamento e transmissão de impulsos nervosos.

As células gliais foram descritas inicialmente em 1846, quando Rudolf Virchow reconheceu pela primeira vez a existência no SNC de um componente intersticial constituído por células estreladas ou espinhosas morfologicamente distintas dos neurônios. Foram chamadas de neuroglia e descritas como um tecido conectivo cuja função principal era prover sustentação metabólica e mecânica aos neurônios. Entretanto, estudos atuais têm mostrado que as células gliais participam ativamente de diversos processos de relevante importância no desenvolvimento e manutenção do SN, muitas vezes atuando em conjunto com neurônios de forma a determinar a arquitetura morfo-fisiológica do SN (Gritti & Bonfante, 2008; Ma et al., 2005; Newman, 2003; Prevot et al., 2007; Rakic, 2007).

O termo glia inclui a microglia e a macroglia. A macroglia é subdividida em: oligodendrócitos, células de Schwann, ependimócitos, células da glia radial (GR) e os astrócitos (Morest & Silver, 2003; Kettenmann & Ransom, 2005).

Recentemente, uma população distinta de células macrogliais foi reconhecida, as células NG2. Estas células possuem características morfológicas, fisiológicas e funcionais próprias (Nishiyama et al., 2009). No desenvolvimento do SNC, as células NG2 podem originar astrócitos e oligodendrócitos (Zhu et al., 2008). No SNC adulto,

estas células podem continuar dividindo enquanto mantêm seu estado diferenciado, reconhecido pela morfologia e as sinapses que forma com os neurônios (Ge et al., 2009).

As células da microglia representam cerca de 5–20% de todas as células gliais, possuem um corpo celular pequeno e são recrutadas para sítios de lesões, infecções ou doenças degenerativas do SN. No estado ativo, estas células mudam morfologicamente e são capazes de migrar, proliferar e realizar fagocitose (Wolff & Chao, 2004). Os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização das fibras neuronais no SNC (Baumann & Pham-Dinh, 2001), sendo esta função exercida pelas células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP) (Bruska & Wozniak, 1999). Os endotélio são células ciliadas, achatadas, ligadas por *tight junctions* na sua superfície apical, e tendem a se arranjar em monocamadas de epitélio cubóide a colunar limitando o espaço ventricular (Reichenbach & Robinson, 1995). Alguns autores apontam estas células como progenitoras no SNC (Johansson et al., 1999).

### **1.1.1. Glia Radial**

As células da GR foram descritas no encéfalo fetal humano no fim do século XIX (Magini, 1888), possuem um corpo oval localizado na zona ventricular e prolongamentos que se estendem até a superfície pial e servem de guia para a migração neuronal (Rakic, 1990). Inicialmente relacionadas apenas aos processos de migração neuronal e laminação do córtex cerebral, estas células têm sido atualmente relacionadas a diversos outros eventos do desenvolvimento do SN. No cerebelo, a GR está envolvida na migração das células granulares. Após o período migratório as células da GR originam a glia de Bergmann (Sotelo, 2004).

Algumas moléculas podem ser consideradas como marcadoras de GR (para revisão veja Malatesta et al., 2008). A proteína acídica fibrilar glial (GFAP: *glial fibrillary acidic protein*), presente em astrócitos, também é encontrada em GR de primatas (Howard et al., 2008; Levitt & Rakic, 1980). A GR de roedores não expressa GFAP (Bignami & Dahl, 1974), mas expressa outros marcadores típicos astrocitários, como o transportador de glutamato GLAST (Hartfuss et al., 2001; Shibata et al., 1997) e a proteína ligadora de lipídeo do cérebro (BLBP: *brain lipid binding protein*) (Feng et al., 1994; Hartfuss et al., 2001). Além disso, marcam para RC1 (*antibody radial cell 1*) e RC2 (*antibody radial cell 2*) (Misson et al., 1988). O RC2 também reconhece células precursoras, por ser uma isoforma da nestina (Hartfuss et al., 2001). Outras moléculas características de células precursoras também são expressas por GR, como as proteínas nestina, vimentina (Götz et al., 2002) e transitina (Yuan et al., 1997).

Logo após o aparecimento dos primeiros neurônios, as células neuroepiteliais passam por mudanças e adquirem características moleculares e citológicas típicas de células da GR (Malatesta et al., 2008). Atualmente, está bem estabelecida a participação da GR em originar neurônios (Anthony et al., 2004; Gotz & Barde, 2005; Malatesta et al., 2000, 2003; Merkle et al., 2004; Noctor et al., 2001; 2002). Após o término da migração neuronal, as células da GR retraem seus prolongamentos e diferenciam-se em astrócitos (Barry & McDermott, 2005; deAzevedo et al., 2003; Gritti & Bonfanti, 2007; Munoz-Garcia & Ludwin, 1986; Voigt, 1989).

As células de GR são importantes guias da migração neuronal. O modelo de migração do córtex cerebral pode ser utilizado para entender a importância da interação neurônio-glia radial nesta fase do desenvolvimento. Como em outras áreas do SNC, dois tipos gerais de migração são encontrados no córtex cerebral baseados

na orientação: (1) migração radial, em que as células migram da zona progenitora para a superfície pial seguindo a disposição radial do tubo neural; (2) migração tangencial, na qual as células migram ortogonalmente em relação à migração radial (Ghashghaei et al., 2007; Marín & Rubenstein, 2003). No início do desenvolvimento do córtex cerebral, a migração radial parece ocorrer através de translocação somal ou nuclear, onde a célula emite seu prolongamento até a superfície pial, onde se prende e então, seu corpo transloca-se até a posição desejada. Com o aumento da espessura do córtex, começa a ocorrer uma migração dependente das células da GR (Nadarajah, 2003; Nadarajah et al., 2003).

Além do processo migratório, a interação entre GR e neurônios possui um importante papel no desenvolvimento destas células, uma vez que o íntimo contato pode gerar um ambiente capaz de influenciar o fenótipo de ambos os tipos celulares (Hatten, 1987; Mendez-Otero & Constantine-Paton, 1990; Moyses et al., 2008; Swanson et al., 1997). Hunten & Hatten (1995) mostraram que fatores solúveis, presentes no período embrionário, atuam na manutenção do fenótipo de GR. Durante o desenvolvimento, a expressão de um antagonista deste fator permitiria a expressão do fenótipo astrocitário. O grupo de Eva Anton relatou a influência de neuregulina-1 no estabelecimento, manutenção e transformação das células da GR no córtex cerebral (Schmid et al., 2003). Recentemente, Ghashghaei e colaboradores (2008) mostraram que a introdução de uma forma constitutiva ativa do receptor erbB2 em astrócitos maduros promove sua desdiferenciação em células de GR. Outros fatores também tem sido identificados com importantes para a manutenção da GR, como *Notch* (Ever & Gaiano, 2005; Gaiano & Fishell, 2002), *Wnt* (Zhou et al., 2004) e meteorina (Nishino et al., 2004). A presença de moléculas que

mantenham o fenótipo da GR é de extrema importância para que a migração neuronal e a formação da citoarquitetura cerebral ocorram de forma correta.

### **1.1.2. Astrócitos**

As duas maiores classes de astrócitos foram descritas em cortes histológicos do SNC de acordo com sua morfologia e distribuição: *astrócitos protoplasmáticos ou tipo I* são encontrados principalmente na substância cinzenta, possuem contornos irregulares e estendem prolongamentos achatados que parecem preencher a maioria do espaço entre os outros elementos da neurópila; *astrócitos fibrosos ou tipo II* são encontrados principalmente na substância branca, tendem a ter contornos mais regulares e estendem prolongamentos cilíndricos e ramificados (Miller & Raff, 1984).

Os astrócitos desempenham uma série de funções importantes no SN: (1) corrigem os níveis de potássio do meio extracelular alterados com a descarga de potenciais de ação dos neurônios (Frank et al., 1983; Neusch et al., 2006); (2) estão envolvidos na captação e liberação de diversos neurotransmissores, tendo um papel crítico no metabolismo de glutamato e de ácido gama aminobutírico (GABA) (Oliet et al., 2004; Schousboe et al., 2004); (3) são necessários para a formação, função, e estabilidade das sinapses no SNC (He & Sun, 2007; Slezak & Pfrieger, 2003; Ullian et al., 2004), podendo ainda regular a transmissão sináptica (Allen & Barres, 2005; Newman, 2003); (4) participam da formação da barreira hematoencefálica, interagindo com as células endoteliais, influenciando-as e podendo ser influenciados por elas (Abbott, 2002; Choi & Kim, 2008); (5) secretam várias moléculas que modulam a sobrevivência e diferenciação neuronais (Gomes et al., 2001; Muller et al., 1995); (6) são componentes chaves da gliose reativa, evento característico da

resposta do SN à injúria (Pekny et al., 2007; Privat, 2003); (7) podem contribuir para a gênese celular no SN adulto, atuando como uma célula-tronco neural (Carmem et al., 2007; Goldman, 2003; Steindler & Laywell, 2003) ou gerando microambientes favoráveis para a sobrevivência de progenitores neuronais e gliais (Horner & Palmer, 2003; Ma et al., 2005; Moyse et al., 2008).

A interação neurônio-astrocítico desempenha importante função em diversas etapas do desenvolvimento do SN.

A proliferação dos precursores neuronais ocorre em uma região progenitora chamada zona subventricular (ZSV), situada no espaço periventricular. Acredita-se que precursores neuronais podem proliferar somente em um microambiente restrito, em presença de tipos celulares específicos. Dentre esses tipos celulares estão os astrócitos que produzem uma variedade de sinais intercelulares, tanto solúveis como associados à membrana, que propiciam um microambiente neurogênico para os precursores neuronais (Ma et al., 2005; Moyse et al., 2008; Doetsch, 2003). Lim & Alvarez-Buylla (1999) demonstraram que, *in vitro*, o contato com astrócitos fornece suporte à proliferação de precursores neuronais da ZSV, assim como a sua diferenciação em neuroblastos, inclusive no SN adulto. A influência de astrócitos na neurogênese foi mostrada pelo grupo de Fred Gage. Esses autores demonstraram que astrócitos adultos são capazes de induzir a formação de neurônios a partir de células-tronco adultas, *in vitro* (Song et al., 2002).

Dentre os sinais neurogênicos derivados dos astrócitos podemos citar o fator solúvel GDNF (*glial cell line-derived factor*) aumenta a proliferação no hipocampo e parece estimular a neurogênese no giro denteado (Chen et al., 2005). Neurogenesina-1 (Ng1), um fator secretado por astrócitos, promove diferenciação

neuronal de células-tronco adultas, agindo como antagonista do destino glial induzido por BMP (*bone morphogenetic protein*) (Ueki et al., 2003). Células-tronco neurais expressando Nurr-1 (*nuclear receptor-related factor 1*) podem diferenciar em neurônios dopaminérgicos quando co-cultivados com astrócitos do mesencéfalo ventral (Wagner et al., 1999; Hall et al., 2003). Este efeito envolve a secreção de Wnt-5a (Castelo-Branco et al., 2006). Wnt-3, derivado de astrócitos hipocâmpais, estimula a via de  $\beta$ -catenina resultando na diferenciação de células-tronco adultas do hipocampo em neurônios (Lie et al., 2005). Recentemente, Környei e colaboradores (2007) identificaram o ácido retinóico, uma das principais moléculas participantes do desenvolvimento do SNC, como fator neurogênico secretado pelos astrócitos.

Nosso grupo demonstrou que diversas moléculas secretadas por astrócitos cerebelares (TNF- $\beta$ , EGF, laminina e fibronectina) podem modular a proliferação e diferenciação de neurônios cerebelares (Gomes et al., 1999c; Martinez & Gomes, 2002). Em 2002, nosso grupo mostrou o papel dos astrócitos como mediadores da ação do hormônio da tireóide (T3) na diferenciação neuronal e no crescimento neurítico, através da liberação do EGF e conseqüente modulação das proteínas de matriz extracelular (MEC) (Martinez & Gomes, 2002).

Além dos mecanismos de especificação celular, a interação neurônio-astrócito é importante na migração de neuroblastos da ZSV para o bulbo olfatório. No animal recém-nato e durante seu desenvolvimento na primeira semana pós-natal, as células da GR fornecem o substrato para a migração dos neuroblastos na região progenitora e através da corrente migratória rostral (RMS: *rostral migratory stream*) (Alves et al., 2002). Posteriormente, os astrócitos podem influenciar a migração ao longo da RMS, produzindo um fator com atividade indutora migratória, MIA (*migration-inducing*

*activity*). Este fator ajuda no início do movimento dos precursores na ZSV e mantém o movimento destas células ao longo da RMS (Mason et al., 2001).

Além do estudo das interações neuro-gliais durante o desenvolvimento do SNC, alguns grupos têm estudado o papel da interação neuro-astrocíticas em processos patológicos. Em 2007, dois grupos diferentes mostraram o papel dos astrócitos na sobrevivência de motoneurônios presentes na medula espinhal acometidos pela Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Nestes trabalhos, ao contrário do que até então tem sido mostrado, os astrócitos foram identificados como “vilões” na patologia. Astrócitos com genótipo característico da ELA afetam negativamente a sobrevivência dos motoneurônios. Neurônios mutados sem a presença dos astrócitos não degeneram, mostrando que esta ação é específica das células astrocíticas (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). Estes estudos revelaram que a toxicidade da glia foi mediada por fatores liberados no meio de cultura. Recentemente, Di Giorgio e colaboradores (2008) e Marchetto e colaboradores (2008) mostraram que motoneurônios derivados de células-tronco embrionárias são sensíveis aos efeitos tóxicos da glia com a mutação característica de ELA. Estes trabalhos identificaram como fatores responsáveis pela toxicidade glial as prostaglandinas (Di Giorgio et al., 2008) e citocinas pró-inflamatórias (Marchetto et al., 2008).

As células da glia desempenham um papel importante nas funções sinápticas. Está bem estabelecido que astrócitos estão em contato íntimo com a maioria das sinapses e sustentam a liberação de neurotransmissores na pré-sinapse, fornecendo precursores de transmissores e substratos energéticos (Bacci et al., 1999; Barres & Smith, 2001; Carmignoto, 2000; Oliet & Mothet, 2008). No SN em desenvolvimento, células gliais guiam os axônios para seus alvos, e ajudam os neurônios a

estabelecerem conexões sinápticas funcionais. Na ausência de glia, neurônios em cultura têm uma habilidade limitada de formar sinapses. Sinapses formadas na ausência de células gliais são normalmente imaturas, indicando que o número total de sinapses em um neurônio não é uma propriedade intrínseca, mas pode estar profundamente regulado por sinais extrínsecos. Astrócitos participam na formação das sinapses (He & Sun, 2007; Ullian et al., 2004), aumentam o número de sinapses funcionais (Ullian et al., 2001) e são necessários para a maturação e estabilidade sináptica (Nishida & Okabe, 2007; Pfrieger & Barres, 1997). A ação dos astrócitos na sinaptogênese é mediada por sinais solúveis *in vivo*, que ativam um processo de maturação, aumentando a eficácia das transmissões sinápticas (Nägler et al., 2001). Um destes fatores que são difusíveis e derivados de astrócitos foi identificado, o colesterol. Este é interiorizado pelos neurônios, indo para a membrana, e isto resulta na melhora da eficácia sináptica, uma vez que o colesterol é necessário para a formação da sinapse (Mauch et al., 2001; Slezak et al., 2006). Os astrócitos secretam ainda proteínas de MEC, trombospondina 1 e 2, que também promovem a sinaptogênese no SNC *in vitro* e *in vivo* (Allen & Barres, 2005; Christopherson et al., 2005).

Baseado nestes dados mostrando a existência de uma comunicação dinâmica e bi-direcional entre neurônio e glia nas sinapses tem sido proposto que a glia deva ser somada ao esquema típico sináptico, a pré e pós-sinapse, como um terceiro elemento (Bacci et al., 1999; Haydon, 2000; Ullian et al., 2001).

Estudos em fatias organotípicas demonstram que astrócitos podem estimular os neurônios diretamente através da liberação de glutamato no hipocampo (Bezzi et al., 1998; Pasti et al., 1997) e no tálamo (Parri et al., 2001).

A glia também pode regular a transmissão sináptica por mecanismos “indiretos”, como a captação de glutamato. A transmissão sináptica em sinapses glutamatérgicas é finalizada pela remoção de glutamato da fenda, e astrócitos cerebrais e células de Müller na retina contribuem para esta captação (Bergles & Jahr, 1998; Oliet et al., 2001; Rothstein et al., 1996).

Outro tipo de modulação seria pela liberação do cofatores. Um exemplo bem conhecido de tal modulação é a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato), que requerem a presença do glutamato juntamente com um cofator que se liga ao sítio de ligação de glicina. Atualmente, sabe-se que a D-serina, e não a glicina é o principal agonista endógeno que ativa este sítio (Mothet, et al., 2000; Wolosker et al., 1999a), como falaremos mais adiante.

Estes dados relatam alguns papéis dos astrócitos sobre os neurônios, mas estudos sobre a influência dos neurônios sobre os astrócitos tiveram início com os trabalhos do grupo de Mary Hatten. Esse grupo demonstrou que os neurônios influenciam a morfologia de astrócitos cerebelares, os quais quando em contato com neurônios, mudam de uma morfologia achatada para uma mais alongada, provavelmente tornando-se mais eficazes para o suporte da migração neuronal (Hatten, 1985). Simultaneamente, a taxa de proliferação astrocitária é alterada: quando cultivados sozinhos os astrócitos proliferam rapidamente, mas co-cultivados com neurônios diminuem sua taxa de proliferação (Hatten, 1985).

Evidências adicionais do papel dos neurônios na diferenciação astrocitária vieram com os trabalhos de Swanson e colaboradores (1997), demonstrando que a influência neuronal deve ser importante na determinação do padrão de expressão de subtipos de transportadores de glutamato. Este trabalho demonstra que, na

ausência dos neurônios, os astrócitos expressam os transportadores de glutamato do tipo GLAST, característicos de astrócitos imaturos, enquanto que quando co-cultivados com neurônios, passam a expressar também transportadores do tipo GLT-1, característicos de astrócitos diferenciados. Estes dados sugerem que a diferenciação astrocitária pode sofrer influência neuronal.

Nos últimos anos, nosso grupo tem investigado o papel de fatores solúveis neuronais na diferenciação astrocitária. Focamos nossos trabalhos na avaliação da expressão de GFAP.

A proteína acídica fibrilar glial (GFAP: *glial fibrillary acidic protein*) foi descoberta por Larry Eng há mais de trinta anos durante a análise de uma placa em um paciente com esclerose múltipla (Eng, 1985; Eng et al., 2000). GFAP pertence à classe III dos Filamentos Intermediários (FIs) e é a proteína de FI mais abundante em astrócitos maduros. O fato de GFAP ser regulada ao longo do desenvolvimento, bem como em situações patológicas do SNC, torna o entendimento de sua modulação ferramenta importante não só para acompanhar a transformação astrocitária, mas também para estudar o papel de determinadas citocinas em processos patológicos.

## 1.2. Diferenciação astrocitária

Durante a formação do SNC, a geração dos neurônios segue-se a formação das células gliais. A gliogênese é um processo controlado pelo balanço entre a ativação de alguns genes e a modulação por fatores epigenéticos (Lee et al., 2000), ou seja, tanto os sinais intrínsecos celulares como as pistas extracelulares modulam o desenvolvimento das células gliais. Células-tronco neurais mantidas em cultura apresentam potencial de se diferenciar em neurônios ou células da glia, sendo a especificação final determinada pelos sinais extracelulares (Wang & Barres, 2000).

Alguns precursores gliais têm sido identificados: Células O2A, que se diferenciam em oligodendrócitos, e em cultura diferenciam-se em astrócitos tipo II; precursores restritos gliais (GRP: *glial restricted precursor*), que podem dar origem a oligodendrócitos, astrócitos tipo I e tipo II (Lee et al., 2000). Atualmente, as células precursoras O2A são denominadas células NG2 ou polidendrócitos (Ge et al., 2009).

Como já citado anteriormente, as células da GR transformam-se em astrócitos nos estágios finais da neurogênese, quando a migração neuronal já está completa (Barry & McDermott, 2005; Culican et al., 1990; deAzevedo et al., 2003; Gritti & Bonfanti, 2007; Voigt, 1989). Existe a hipótese de que, durante o desenvolvimento, haja um balanço entre moléculas que participariam na manutenção da GR e outras que induziriam a diferenciação.

Os receptores Notch e seus ligantes são fortes candidatos na regulação do fenótipo da GR. Utilizando uma metodologia de ganho de função *in vivo*, o grupo de Gord Fishell infectou o prosencéfalo de camundongos embrionários (antes do início da neurogênese) com um vírus expressando a forma ativa de Notch1. Os autores relataram que a ativação da sinalização de Notch1 em células do neuroepitélio

embrionário induz a formação da GR, mostrando a importância do contato celular para o estabelecimento inicial do fenótipo radial (Gaiano et al., 2000).

Similarmente, Patten e colaboradores (2003) investigaram o papel da sinalização de Notch1 na formação da GR *in vitro*. Eles observaram que o contato com os neurônios ativa a sinalização de Notch1 em astrócitos e que esta ativação é suficiente para induzir uma mudança morfológica, fazendo com que os astrócitos aparentassem um fenótipo de GR e passassem a expressar BLBP. Eles ainda relataram que a indução de GR por Notch1 é mediada por sua ação na expressão e função de erbB (receptores tirosina quinases responsáveis pela sinalização dos fatores de crescimento denominados neuregulinas). Posteriormente, Anthony e colaboradores (2005) relataram a modulação direta da expressão de BLBP por Notch.

Além de preservar a população progenitora, Notch modula a diferenciação astrocitária regulando a expressão de GFAP, em períodos mais tardios do desenvolvimento (Ge et al., 2002). Assim, podemos concluir que a função astrogliogênica de Notch é inibida no período neurogênico.

Outras moléculas com função reconhecida na manutenção da identidade da GR são os membros da família das neuregulinas. Schmid e colaboradores (2003) mostraram que a neuregulina1 exerce um papel crítico no estabelecimento da GR. Eles relatam que uma diminuição na expressão de erbB2, receptor para neuregulina1, leva à transformação de GR em astrócitos, e mostraram ainda que um constitutivo ativo de Notch1 ativa o promotor de erbB2 em GR. Em resumo, Notch1 induz a expressão de mais receptor para neuregulina e conseqüente manutenção do fenótipo de GR. Recentemente, este grupo confirmou o papel da neuregulina 1 na manutenção da GR superexpressando o receptores erbB2 em

astrócitos maduros. Estes voltam a exibir um fenótipo típico de GR (Ghashghaei et al., 2008).

Um grupo, examinando o papel da sinalização de Notch1 no telencéfalo embrionário, achou que além de promover características de GR *in vivo*, a ativação de Notch1, *in vitro*, faz com que as células da GR proliferem em resposta ao FGFb (Yoon et al., 2004). Em conjunto, estes dados revelam a importância das interações neuro-gliais, tanto através de contato celular como de fatores solúveis, no desenvolvimento das células da GR e na modulação de sua transformação em astrócitos.

Em 2004, Zhou e colaboradores mostraram que alterações na via de Wnt perturbam a organização da GR no giro denteado do hipocampo, sugerindo que esta molécula é importante para manter a GR. No mesmo ano, uma nova proteína secretada, meteorina, foi relacionada à regulação da diferenciação da GR (Nishino et al., 2004). Este trabalho mostra que a meteorina induz a diferenciação astrocitária e os autores sugerem também que, assim como Notch, esta molécula tem um papel na manutenção do estado indiferenciado da GR, uma vez que a expressão de meteorina ocorre durante o período neurogênico (Nishino et al., 2004).

Com a marcação da GR com cristais lipofílicos, Dil, e observação da morfologia destas células em rato recém-nato e ao longo da primeira semana pós-natal, pode-se notar a transformação GR – astrócito na ZSV e RMS. As células, que também são positivas para GFAP, vimentina e nestina, passam de um perfil bipolar simples para uma morfologia complexa com ramificações, sugerindo a diferenciação das células da GR em astrócitos (Alves et al., 2002).

Recentemente, nosso grupo mostrou a participação do fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), discutido a seguir, na transformação da GR em astrócitos (Stipursky & Gomes, 2007).

Durante a transformação de GR em astrócito ocorre uma alteração na prevalência de algumas moléculas. Alguns antígenos estão presentes nas células da GR, mas ausentes em astrócitos, como o RC2, nestina, vimentina e transitina (Götz et al., 2002). Com o desenvolvimento destas células, há uma diminuição nos níveis destas moléculas, e um aumento nos níveis de outras, como GFAP e a enzima glutamina sintetase em roedores. Algumas moléculas podem ser expressas tanto em células da GR como em astrócitos, como GLAST, BLBP e RC1 (Götz et al., 2002; Malatesta et al., 2003). Desta forma, o estudo da modulação destas proteínas permite o acompanhamento da diferenciação astrocitária.

Nos últimos anos, nosso grupo tem investigado o papel de fatores solúveis neuronais na diferenciação astrocitária. Para isso, nós utilizamos um camundongo transgênico que apresenta parte do promotor de GFAP ligado ao gene da enzima bacteriana  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) para estudar a diferenciação astrocitária.

Nosso grupo demonstrou previamente que neurônios embrionários ativam o promotor de GFAP, representado por um aumento de 60% no número de células  $\beta$ -Gal positivas e a diferenciação de astrócitos (Gomes et al., 1999a). A adição de meio condicionado (MC) por neurônios corticais embrionários tem efeito similar, sugerindo a participação de um fator solúvel neste evento (Gomes et al., 1999a). Posteriormente, nosso grupo mostrou que o principal mediador deste fenômeno é o TGF- $\beta$ 1 (de Sampaio e Spohr et al., 2002).

### 1.3. TGF- $\beta$ 1

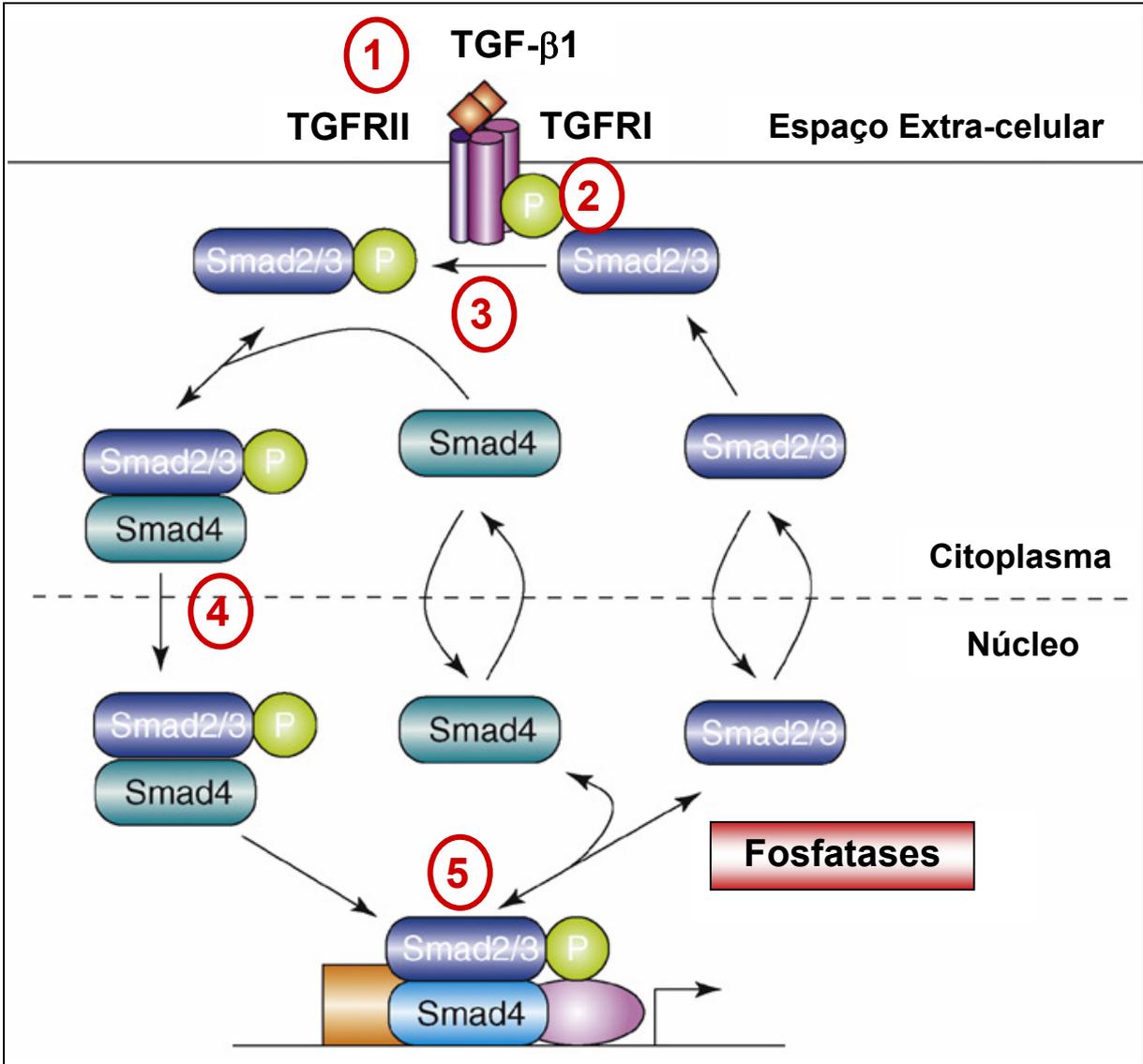
#### 1.3.1. A família TGF- $\beta$ e sua sinalização

A família de fatores de crescimento transformantes- $\beta$  (TGF- $\beta$ : *transforming growth factor- $\beta$* ) compreende um grande número de fatores de crescimento polipeptídicos relacionados, capazes de regular diversos processos celulares, como proliferação, determinação de linhagem, diferenciação, motilidade, adesão e morte (Massagué, 1998). Todas estas funções atribuem a esta família um papel essencial no desenvolvimento, homeostase, e reparo de virtualmente todos os tecidos em diversos organismos. De acordo com a similaridade da seqüência primária, estes fatores podem ser divididos em grupos, incluindo as subfamílias de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP: *bone morphogenetic protein*), fatores de crescimento e diferenciação (GDF: *growth/differentiation factor*), Nodal, activinas, TGF- $\beta$  e outras. A subfamília TGF- $\beta$  é constituída por três membros em roedores: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 (Massagué, 1998).

Os TGF- $\beta$ s sinalizam através de uma família de glicoproteínas transmembrana serina/treonina cinases que baseadas nas suas propriedades estruturais e funcionais pode ser dividida em duas subfamílias: os receptores tipo I (TGFR-I; aproximadamente 53 KDa) e os receptores tipo II (TGFR-II; 70-100 KDa). Existem ainda os receptores tipo III (TGFR-III; 200-4000 KDa), betaglicana e endoglicana (Lopez-Casillas et al., 1991) que modulam o acesso do ligante aos receptores I e II (Eickelberg et al., 2002; Letamendía et al., 1998). Estes últimos são os responsáveis propriamente ditos pela transdução do sinal (Böttner et al., 2000; Massagué, 1992; Massagué, 1998; Massagué & Chen, 2000; Shi & Massagué, 2003; Wrana et al., 1994).

A ativação da cascata de sinalização pela subfamília TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, 2 e 3) é dada pela conexão do ligante ao receptor tipo II que promove uma auto-fosforilação seguida de fosforilação do receptor tipo I (Clarke & Liu, 2008; Massagué, 1998) (**Figura 1**). Wrana e colaboradores (1992) mostraram uma interdependência entre os receptores: o receptor I requer o receptor II para ligar-se ao TGF- $\beta$ , e o receptor II requer o receptor I para sinalizar. Uma vez fosforilado, o receptor tipo I dá início a uma cascata de sinalização que envolve os membros da família Smad. Esta via de sinalização tem sido bem caracterizada e é considerada a via clássica ou canônica pela qual sinalizam os membros da família TGF- $\beta$ . As proteínas Smad 2 e/ou 3 são fosforiladas e associam-se com a Smad 4 formando um complexo que transloca para o núcleo da célula (**Figura 1**). No núcleo, com a cooperação de fatores de transcrição e co-ativadores, as proteínas Smads fazem com que os genes alvos específicos sejam transcritos (Massagué, 1998; Miyazono, 2000; Moustakas et al., 2001; Shi & Massagué, 2003; Wrana & Attisano, 2000).

Além da via canônica de Smad, o TGF- $\beta$  pode sinalizar por vias chamadas não-canônicas, como PKA (*protein kinase A*), Jun-K (*Jun-N-terminal kinase*) e p38K (*p38 kinases*), e MAPK/PI3K (*MAP e PI3 kinases*) (Derynck & Zhang, 2003). O TGF- $\beta$ 1 inibe a morte de neurônios hipocámpais através da ativação das vias de MAPK, que inativa Bad, uma proteína pró-apoptótica (Zhu et al., 2002). Em 2004, o mesmo grupo mostrou que, em neurônios, o TGF- $\beta$ 1 ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*), que regula a transcrição de genes anti-apoptóticos, através da via de PI3K (Zhu et al., 2004).



**Figura 1: Sinalização clássica do TGF-β1.** (1) O fator de crescimento se liga diretamente ao receptor tipo II (TGFRII), e este forma um complexo com o receptor tipo I (TGFRI). (2) Quando recrutado para o complexo, o TGFRI é fosforilado e ativado pelo TGFRII. (3) O TGFRI ativado fosforila as proteínas citoplasmáticas Smad 2 e/ou 3. (4) As Smads 2/3 podem agora associar-se com a proteína Smad 4, formando um complexo que transloca para o núcleo. (5) Este complexo nuclear promove a transcrição de genes alvos específicos com o auxílio de co-fatores e fatores ligadores de DNA. (6) Após a transcrição gênica, o complexo é desfeito pela ação de fosfatases e Smad 2/3 e Smad 4 voltam para o citoplasma. Adaptado de Clarke & Liu, 2008.

### 1.3.2. Ações do TGF- $\beta$ 1 no SN

O papel do TGF- $\beta$ 1 no SN começou a ser estudado há quase duas décadas (Flanders et al., 1991; Finch et al., 1993; Kriegstein et al., 1995). Nos últimos anos, essas moléculas e suas vias de sinalização têm ganhado especial atenção dos neurobiologistas.

No SNC, a expressão de TGF- $\beta$  é freqüentemente aumentada em áreas de disfunção neuronal. Astrócitos e microglia migram para o local da injúria, provavelmente devido à atividade quimiotática do fator, que faz com que estas células expressem então um fenótipo reativo (Flanders et al., 1998).

O excesso de glutamato no meio extracelular é tóxico para os neurônios (Choi, 1988; McCall et al., 1979; Olney, 1971). Experimentos *in vitro* mostraram que o TGF- $\beta$ 1, liberado por astrócitos, possui um papel importante na proteção dos neurônios contra a toxicidade do glutamato (Bruno et al., 1998).

Além dos processos de injúria aguda, os TGF- $\beta$ s estão envolvidos em patologias degenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e ELA. O TGF- $\beta$ 1 pode ser encontrado em placas senis na doença de Alzheimer (van der Wal et al., 1993). Lesné e colaboradores (2003) mostraram que o TGF- $\beta$ 1 potencializa a produção de amilóide- $\beta$  (um peptídeo crucial para o desenvolvimento da doença de Alzheimer) em astrócitos, levando a um aumento na formação de placas senis. Em pacientes parkinsonianos, há um aumento significativo de TGF- $\beta$ 1 em regiões estriatais dopaminérgicas (Nagatsu et al., 2000).

Embora a participação do TGF- $\beta$ 1 em situações patológicas seja relativamente conhecida, pouco se sabe sobre a atuação fisiológica do fator no SN (para revisão veja Gomes et al., 2005, anexo 3).

Um camundongo *knock out* para TGF- $\beta$ 1 foi utilizado para estudar o papel desta citocina na neuroproteção (Brionne et al., 2003). Este trabalho mostrou que o TGF- $\beta$ 1 possui um papel crítico na manutenção da integridade e sobrevivência neuronal e na ativação microglial, e sugere ainda que alguns destes efeitos possam ser resultados da modulação na expressão de moléculas da MEC (Brionne et al., 2003). A expressão dos TGF- $\beta$ s ao longo do desenvolvimento e no adulto, em diversas áreas, sugere que estes fatores tenham ação ampla no SN. Siegenthaler & Miller (2004) demonstraram que o TGF- $\beta$ 1 modula a migração neuronal em culturas organotípicas de cérebros de ratos embrionários.

O TGF- $\beta$ 1 regula a síntese da MEC (McCartney-Francis & Wahl, 1994). O camundongo *knock out* para TGF- $\beta$ 1 apresenta um decréscimo na expressão de laminina, confirmando a atuação deste fator na produção de MEC (Brionne et al., 2003). Esta é importante para diversos processos do desenvolvimento do SNC, como migração neuronal e crescimento axonal. Por exemplo, o TGF- $\beta$ 1 regula a migração no córtex cerebral modulando os níveis de proteínas de MEC (Siegenthaler & Miller, 2004). Assim, o estudo do papel do TGF- $\beta$ 1 na produção destas moléculas e sua participação nos eventos celulares torna-se importante para melhor entendimento dos mecanismos que governam o desenvolvimento do SNC.

Nosso grupo mostrou que o TGF- $\beta$ 1 induz a transformação de células do tipo GR em astrócitos *in vitro* e que neurônios podem ativar a via de Smads nestas células (Stipursky & Gomes, 2007). Recentemente, Mecha e colaboradores (2008) identificaram as isoformas de TGF- $\beta$ s nas camadas germinativas do telencéfalo e medula espinhal, sugerindo um papel para o TGF- $\beta$  na biologia da GR.

Recentemente, um novo papel foi dado ao TGF- $\beta$ 1. Feng & Ko (2008) mostraram que o TGF- $\beta$ 1 secretado pelas células de Schwann é necessário para a

formação das sinapses na junção neuromuscular. O efeito do meio condicionado destas células na sinaptogênese foi abolido quando à ele é adicionado algum inibidor do TGF- $\beta$ 1.

O TGF- $\beta$ 1 possui um amplo espectro de funções, que depende do estado de ativação celular, de sua concentração, do balanço de expressão de outras citocinas e das condições fisiológicas das células (Peralta-Zaragoza et al., 2001). Uma das características mais interessantes do TGF- $\beta$ 1 é sua atuação paradoxal, podendo, por exemplo, induzir a proliferação de um tipo celular e inibir a de outro. Ou ainda atuar em um mesmo grupo celular de forma antagônica de acordo com o estágio de diferenciação destas células, como na carcinogênese, onde pode atuar como um supressor no início da patologia, mas em estágios tardios, pode favorecer a progressão do tumor (Wenner & Yan, 2002). Recentemente, a presença de atividade TGF- $\beta$ /Smad foi demonstrada em gliomas agressivos e altamente proliferativos. O TGF- $\beta$  age como um fator oncogênico regulando a proliferação através do fator derivado de plaquetas (PDGF) (Bruna et al., 2007).

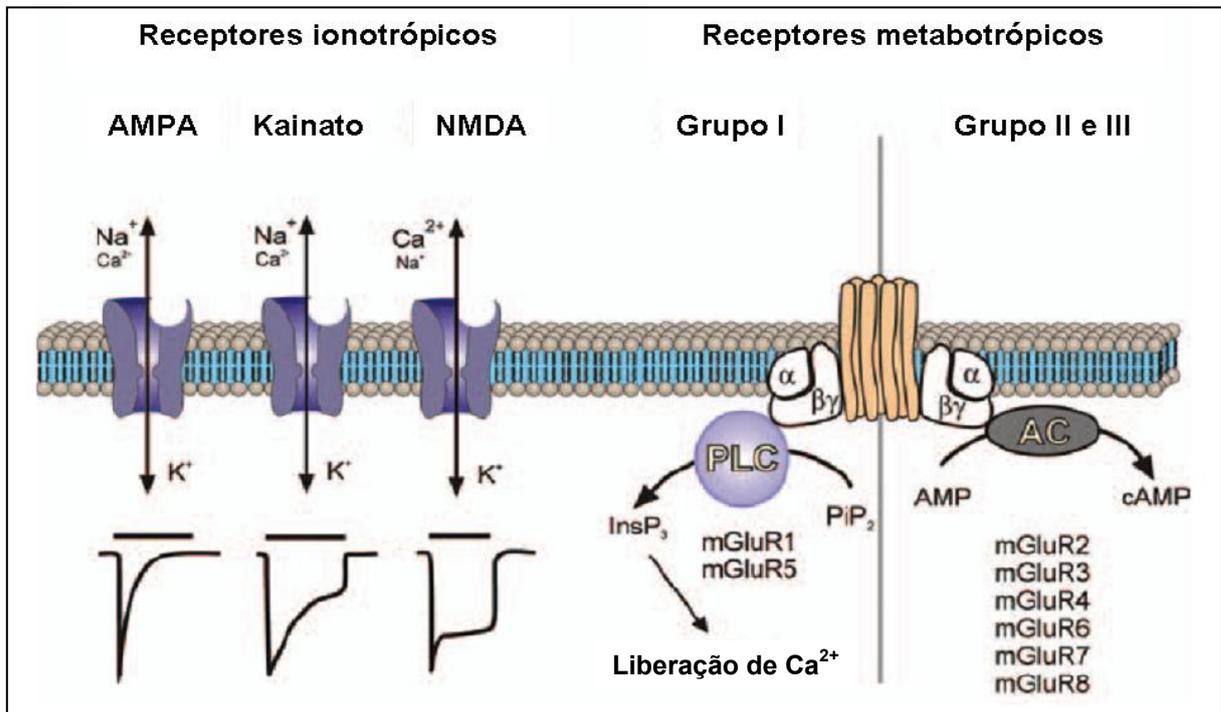
Temos proposto que a interação neurônio-astrocítico no córtex cerebral em desenvolvimento envolve o TGF- $\beta$ 1. A síntese e secreção deste fator pelos astrócitos são induzidas através da ativação de receptores glutamatérgicos (Bruno et al., 1998; Ciccarelli et al., 1997; Corti et al., 2007; Glowinski et al., 1994). Esta ligação entre glutamato, TGF- $\beta$ 1 e maturação astrocitária nos fez imaginar se o glutamato não seria o fator solúvel neuronal presente em nosso modelo, que aumenta os níveis de TGF- $\beta$ 1 em culturas astrocitárias e resulta na ativação do gene de GFAP.

#### 1.4. Glutamato e seus receptores

O glutamato é um aminoácido derivado da glicose (Cutler & Dudzinski, 1974; Gaitonde & Richter, 1966) e principal neurotransmissor excitatório no encéfalo de mamíferos (Fonnum, 1984; Orrego & Villanueva, 1993). A transmissão glutamatérgica é ubíqua no SNC, participando de funções, como aprendizagem, memória e cognição.

O excesso de glutamato é altamente neurotóxico (Choi, 1988; McCall et al., 1979; Olney, 1971) e a concentração extracelular do glutamato deve ser mantida muito baixa para prevenir dano neuronal. O cérebro usa uma série de barreiras físicas para conter o espalhamento do glutamato. Os prolongamentos astrocitários envolvem muitas sinapses glutamatérgicas (Lehre & Danbolt, 1998; Peters et al., 1991), prevenindo a difusão de glutamato de uma fenda sináptica para outra. Estes prolongamentos contêm vários sítios de captação, mais eficazes em captar glutamato do que os locais de captação encontrados nos neurônios glutamatérgicos (Gundersen et al., 1998; Kojima et al., 1999; Lehre & Danbolt, 1998; Rothstein et al., 1996). Esta especialização permite que os astrócitos rapidamente evacuem as fendas sinápticas do glutamato liberado pelos neurônios (Clements et al., 1992).

Os receptores glutamatérgicos incluem duas classes fundamentais: os ionotrópicos (AMPA, NMDA e Kainato) e metabotrópicos (mGluR 1-8) (**Figura 2**).



**Figura 2. Receptores glutamatérgicos.** Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grandes grupos: os ionotrópicos e os metabotrópicos. O primeiro grupo é composto por receptores do tipo NMDA, AMPA e Kainato. Os receptores metabotrópicos podem ser subdivididos em 3 grupos (I, II e III). No total, 8 receptores compõem o grupo dos receptores metabotrópicos (mGluR1 a 8). Adaptado de Verkhratsky & Steinhauser, 2007.

#### **1.4.1. Receptores metabotrópicos**

Os receptores metabotrópicos (mGluR) possuem sete domínios transmembrana, são de ação lenta, mobilizam vias de segundo-mensageiros e regulam uma variedade de vias intracelulares através da ativação de enzimas de membrana (D'Antoni et al., 2008; Nakanishi, 1994). Estão classificados em três grupos I, II e III, de acordo com a homologia na seqüência, perfil farmacológico e vias de transdução (Pin & Duvoisin, 1995; Schoepp et al., 1999). O grupo I inclui mGluR1 e 5, acoplados à via de ativação da fosfolipase C. Os grupos II (mGluR2 e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8) são ligados à inibição da adenilato ciclase (Bruno et al., 2001; Flor et al., 2002). A ativação do grupo II de receptores metabotrópicos em astrócitos está associada à ação neuroprotetora fornecida pela síntese e secreção de TGF- $\beta$ 1 (Bruno et al., 1998; Ciccarelli et al., 1999; Corti et al., 2007; Glowinski et al., 1994).

#### **1.4.2. Receptores ionotrópicos**

Os receptores ionotrópicos são responsáveis pelo componente de ação rápida do SNC. Entre os receptores do tipo ionotrópico (canais iônicos), são descritos três subtipos: receptores AMPA ( *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), e Kainato (KA) (ditos não-NMDA) e NMDA (N-Metil-D-Aspartato) (Mayer, 2005; Mayer & Armstrong, 2004; Wisden & Seeburg, 1993).

#### **Receptores AMPA e Kainato**

A família de receptores AMPA é composta de quatro subunidades: GluR1 – GluR4. Os receptores funcionais são tetrâmeros formados pela união de uma ou mais subunidades, formando receptores homotípicos ou heterotípicos. A existência

de múltiplas subunidades resulta em uma grande diversidade de receptores AMPA (Bleakman et al., 2006).

AMPA e Kainato são descritos como receptores que, quando ativados, promovem a despolarização da célula, pois na maioria das conformações, permitem a entrada de íons  $\text{Na}^+$  (Pláteník et al., 2000).

### **Receptores NMDA**

Estes receptores tipo canal iônico são tetrâmeros que resultam de sete genes que codificam sete subunidades chamadas NR1, NR2A – NR2D e NR3A – NR3B (Hollmann & Heinemann, 1994). O neurotransmissor glutamato liga-se às subunidades NR2 e um co-agonista na subunidade NR1. A ativação do canal requer a ativação de ambos os sítios (Bleakman et al., 2006). Normalmente, para que o receptor seja funcional é necessária a co-expressão de uma subunidade NR1 e uma ou duas subunidades NR2.

Para ser ativado, o receptor NMDA necessita que ocorram dois fenômenos simultâneos. Primeiro deve ocorrer uma despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio de maneira voltagem-dependente. Esta despolarização é gerada pela ativação prévia dos receptores AMPA/Kainato através do glutamato, permitindo a entrada de íons sódio na célula e a saída do magnésio do canal por diferença de potencial. Concomitante a isso é necessária a ligação do glutamato e do co-agonista para a ativação do receptor. Após a saída do íon magnésio e a mudança conformacional gerada pela ligação dos agonistas, há um elevado influxo de cálcio pelo receptor (MacDermott et al., 1986), além da entrada de sódio e saída de potássio em menor proporção. Este aumento nos níveis intracelulares de cálcio leva a inúmeros eventos na célula, como ativação de

proteínas cinases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e aumenta a liberação de neurotransmissores, estando por isso relacionado com a potenciação de longa duração (LTP), aprendizado e plasticidade neural (Collingridge & Bliss, 1987; Olney, 1989; Scatton, 1993; Wood et al., 1990).

Desde os anos 80, a glicina, um neurotransmissor inibitório no tronco encefálico, medula espinhal e retina, tem assumido o papel de co-agonista na ativação do NMDAR (Johnson & Ascher, 1987). Entretanto, Schell e colaboradores (1995) mostraram que a D-serina possui alta afinidade pelo sítio da glicina e vários relatos na última década têm demonstrado que a D-serina é o maior neuromodulador para o NMDAR no sítio da glicina (Miller, 2004).

### **1.5. D-serina**

A distribuição da D-serina no encéfalo em desenvolvimento é heterogênea, com as concentrações mais altas no telencéfalo e no cerebelo em desenvolvimento (Hashimoto et al., 1995). No adulto (oito semanas pós-natal), a concentração mais alta de D-serina é encontrada no córtex cerebral, seguido pelo tálamo, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo (Hashimoto et al., 1995). Este padrão de distribuição foi confirmado por imunohistoquímica para D-serina revelando altas concentrações no prosencéfalo e cerebelo em desenvolvimento, esta distribuição se assemelha a de NMDAR (Schell et al., 1995, 1997).

Análise da marcação para D-serina, mostrou que esta está associada principalmente com astrócitos que envolvem as sinapses (Oliet & Mothet, 2008; Schell et al., 1997). No cerebelo em desenvolvimento, a D-serina está presente na glia de Bergmann e decresce a níveis muito baixos no adulto (Williams et al., 2006; Schell et al., 1997). Recentemente, Williams e colaboradores (2006) mostraram

ainda a presença de D-serina no tipo celular glial radial da retina, a glia de Müller. A marcação para D-serina também foi observada em dendritos e axônios de neurônios corticais (Yasuda et al., 2001). Recentemente, Kartvelishvily e colaboradores (2006) sugeriram que os neurônios corticais embrionários sintetizam D-serina e serina racemase (SR – que converte a L-serina em D-serina). Outros trabalhos também revelam a presença de D-serina e SR em microglia (Williams et al., 2006; Wu et al., 2004b).

O hipocampo foi o primeiro modelo experimental para estudo da função da D-serina. Em culturas de neurônios hipocâmpais, a atividade dos receptores NMDA diminui quando a D-serina é eliminada com D-aminoácido oxidase (DAO) (Mothet et al., 2000). Yang e colaboradores (2005) mostraram que o pré-tratamento com DAO inibe LTP em células piramidais hipocâmpais em culturas ou fatias, confirmando que a D-serina e não a glicina é o ligante endógeno de NMDAR nesta estrutura.

Shleper e colaboradores (2005) mostraram que a D-serina é o ligante endógeno que promove neurotoxicidade via NMDAR no hipocampo. Neste trabalho, os autores mostram que a morte neuronal é prevenida quando fatias são tratadas com serina deaminase, outra enzima que degrada D-serina, enquanto a glicina, mesmo em altas concentrações, não foi capaz de induzir a neurotoxicidade via NMDAR.

Na retina, as células da glia de Muller controlam a neurotransmissão mediada por NMDAR através da síntese e liberação de D-serina (Stevens et al., 2003). Além disso, a habilidade da D-serina em controlar a neurotransmissão por NMDAR tem sido confirmada por estudos utilizando os camundongos deficientes em DAO. Como esperado, com os altos níveis de D-serina, as correntes pós-sinápticas excitatórias

mediadas por NMDAR estão aumentadas em neurônios do corno posterior da medula espinhal (Wake et al., 2001).

### **1.6. Glutamato e D-serina no desenvolvimento do SNC**

A proliferação dos progenitores neurais é modulada de forma diferente pelos diversos tipos de receptores glutamatérgicos. O glutamato aumenta a taxa de proliferação de células progenitoras neurais humanas, ação que pode ser bloqueada por antagonistas de NMDAR, mas não por antagonistas dos receptores AMPA/kainato ou metabotrópicos (Suzuki et al., 2006). Em culturas de células progenitoras neurais de rato, NMDA também mantém a proliferação nas neuroesferas (Mochizuki et al., 2007). A ativação dos receptores NMDA também promove a divisão das células progenitoras do *striatum* (Luk et al., 2003).

No córtex cerebral em desenvolvimento, glutamato tem um efeito anti-proliferativo sobre os progenitores neuronais através dos receptores AMPA/kainato (LoTurco et al., 1995; Haydar et al., 2000). Martins e colaboradores (2006) mostraram que o glutamato reduz a proliferação durante o desenvolvimento embrionário da retina, também com a participação dos receptores AMPA/kainato.

A presença de receptores metabotrópicos mGluR3 e 5 em áreas com potencial neurogênico (Di Giorgi Gerevini et al., 2004) e a expressão de alguns mGluRs em neuroesferas embrionárias murinas (Di Giorgi Gerevini et al., 2005), sugerem a participação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos na modulação das células progenitoras. De fato, em neuroesferas a ativação destes receptores induz a proliferação e sobrevivência (Di Giorgi Gerevini et al., 2005). A ativação de mGluR3 no giro denteado do hipocampo também aumenta a proliferação (Yoshimizu and Chaki, 2004). Evidências recentes estendem o papel do

mGluR3 para a regulação da diferenciação de progenitores. Culturas de células-tronco da ZSV tratadas com agonista de mGluR2/3 induz a diferenciação astrocitária, favorecendo o aparecimento de células positivas para GFAP alongadas (Ciceroni et al., 2006). Em cerebelo, a ativação de mGluR4 reduz a proliferação e induz a diferenciação das células granulares (Canudas et al., 2004).

O papel da D-serina pode ser importante antes do estabelecimento dos contatos sinápticos (Oliet & Mothet, 2008). Durante o desenvolvimento, as células precisam tomar diferentes trajetórias a fim de formar a arquitetura adequada para o funcionamento do SNC, e diversos fatores extrínsecos influenciam esta jornada. Entre estes fatores, encontramos o glutamato, agindo via NMDAR (Yacubova & Komuro, 2003). A participação de NMDAR na migração radial de células granulares no cerebelo em desenvolvimento, ao longo da glia de Bergmann, tem sido bem demonstrada desde os anos 90 (Komuro & Rakic, 1993). O bloqueio de NMDAR presente nas células granulares diminui a migração neuronal. Em contraste, há um aumento quando  $Mg^{2+}$  é removido ou com a aplicação de glicina (Yacubova & Komuro, 2003). Recentemente, foi mostrado que a subunidade NR2B é essencial para a migração das células granulares no cerebelo (Mancini & Atchison, 2007; Tárnok et al., 2008).

Como o pico dos níveis de D-serina no cerebelo acontece na fase do desenvolvimento de 14 dias após o nascimento (P14), quando a migração das células granulares é mais intensa (Schell et al., 1997), pensou-se que ela poderia estar envolvida neste processo. Mais recentemente, foi demonstrado que a D-serina liberada pela glia de Bergmann promove a migração das células granulares através da ativação de NMDAR (Kim et al., 2005).

No córtex cerebral, alguns trabalhos relacionam o NMDAR à migração neuronal. Mas ao contrário do cerebelo, o papel destes receptores parece contraditório. Dois trabalhos que inicialmente estudaram esta relação utilizaram animais com alteração no NMDAR e observaram que, aparentemente, a distribuição das células no córtex cerebral não é prejudicada. O primeiro mostra que mesmo com uma mutação em uma subunidade de NMDAR, a citoarquitetura do córtex cerebral é similar a do selvagem (Kutsuwada et al., 1996). O outro relata que camundongos sem receptores NMDA apresentam uma distribuição laminar normal no córtex visual (Messersmith et al., 1997). Isto poderia apontar para a não participação dos receptores NMDA no processo de migração neuronal. Contudo, Marret e colaboradores (1996) mostraram que no cérebro de hamster neonato, estimulação de NMDAR perturba a migração neuronal. Este dado nos leva a pensar que o estímulo de NMDAR inibiria a migração.

Em 1999, Hirai e colaboradores mostraram, todavia, que o bloqueio dos NMDARs em córtices cerebrais embrionários de rato inibe a migração neuronal. Este dado é similar ao encontrado no cerebelo. Estes autores sugerem que nos trabalhos anteriores, com camundongos mutantes, a citoarquitetura cortical não é alterada devido à aquisição de mecanismos migratórios compensatórios. No mesmo ano, Behar e colaboradores (1999) demonstraram que a migração neuronal cortical é estimulada pela ativação do NMDAR em cultura de fatias organotípicas. Eles mostraram ainda, através de experimentos de quimiotaxia com células dissociadas, que a ação do glutamato é sobre os neuroblastos presentes ainda na zona ventricular que irão migrar para a placa cortical (Behar et al., 1999). Mais recentemente, foi mostrado que o bloqueio de NMDAR durante o período neonatal,

não somente interfere no processo de migração, mas também impede a maturação funcional da rede cortical (Reiprich et al., 2005).

### **1.7. Justificativa**

Nosso grupo tem contribuído para o melhor entendimento das interações neuro-gliais durante o desenvolvimento do SNC. Demonstramos recentemente que neurônios corticais induzem a ativação do gene de GFAP em astrócitos de córtex cerebral e a participação do TGF- $\beta$ 1 neste processo (Gomes et al., 1999a; de Sampaio e Spohr, 2002; Sousa et al., 2004). Dados prévios demonstraram que o neurotransmissor glutamato induz a síntese e secreção de TGF- $\beta$ 1 por astrócitos. Recentemente, evidências demonstrando o envolvimento dos transmissores sinápticos no desenvolvimento do SNC vêm crescendo substancialmente. Com o aparecimento da D-serina como co-agonista do glutamato na ativação dos NMDARs, pesquisadores têm estudado o papel desta molécula na formação do SNC, uma vez que ela parece ser importante mesmo antes do estabelecimento dos contatos sinápticos.

Além disso, a compreensão da interação neuro-glial durante o desenvolvimento pode acrescentar informações para o entendimento de processos patológicos, já que o glutamato e TGF- $\beta$ 1 estão relacionados a doenças neurodegenerativas do SNC, como discutiremos mais adiante nesta tese.

Aqui, investigamos o envolvimento do glutamato associado a D-serina (que juntos ativam NMDAR) na especificação celular de progenitores e migração neuronal. E estudamos ainda, o papel dos receptores metabotrópicos de glutamato na maturação astrocitária *in vitro*, mediado por TGF- $\beta$ 1.

## **2. OBJETIVOS**

---

**2.1. Estudar o papel do glutamato e da D-serina na especificação das células de GR no córtex cerebral.**

**2.1.1.** Verificar a expressão de serina racemase (SR) em progenitores neurais: cultura de glia radial (GR) e neuroesferas;

**2.1.2.** Analisar a ação do glutamato e da D-serina em progenitores neurais: proliferação e morte celular;

**2.1.3.** Estudar o papel da D-serina e do glutamato na especificação da GR em cultura de células dissociadas e neuroesferas;

**2.1.4.** Analisar a ação do glutamato e da D-serina na migração dos neurônios corticais *in vitro*.

**2.2. Estudar o papel do glutamato e TGF- $\beta$ 1 na maturação astrocitária.**

**2.2.1.** Investigar o papel de sinaptossomas e glutamato, na ativação do promotor de GFAP de astrócitos do córtex cerebral *in vitro*;

**2.2.2.** Analisar a participação de TGF- $\beta$ 1 como mediador dos efeitos glutamatérgicos na diferenciação de astrócitos do córtex cerebral *in vitro*;

**2.2.3.** Estudar a participação das vias de sinalizações canônica (Smad) e não-canônicas (MAPK/PI3K) na ativação do promotor do gene de GFAP induzida por glutamato;

**2.2.4.** Estudar o efeito do glutamato no gene de GFAP de astrócitos derivados de outras regiões encefálicas, como cerebelo e mesencéfalo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos suíços e transgênicos mantidos no biotério do Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A utilização dos animais foi aprovada segundo o protocolo DAHEICB 024 (Anexo 4). Os transgênicos contêm o gene da enzima  $\beta$ -Galactosidase (*lacZ*) sob o controle de parte do promotor do gene de GFAP. O transgene possui 2005 pb do promotor (-1913 a + 92 em relação ao sítio de início de transcrição de GFAP) do gene de GFAP murino ligados à seqüência codificante do gene *lacZ* (Galou et al., 1994).

Para cultura primária de astrócitos, utilizamos camundongos transgênicos recém nascidos (P0), período de gliogênese. As co-culturas foram feitas utilizando-se neurônios de camundongos suíços, não transgênicos, com 14 dias (E14) embrionários. E para preparação dos sinaptossomas utilizamos ratos adultos.

Para a cultura enriquecida em GR e cultura de explantes do córtex cerebral utilizamos camundongos E14, por ser o período de pico de migração guiada pela GR. As culturas de progenitores neurais em neuroesferas foram feitas com camundongos embrionários com 12 dias embrionários (E12).

#### **3.2. Cultura primária de células astrocíticas**

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas como já descrito por Gomes et al. (1999b). As estruturas cerebrais (córtex cerebral, cerebelo e mesencéfalo) foram removidas e colocadas em tampão salina fosfato (PBS)

contendo 0,6% de glicose (PBS-Glicose: 8% de cloreto de sódio [NaCl]; 5,36% de fosfato de sódio [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]; 0,4% de fosfato de potássio [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] e 0,9% de cloreto de potássio [KCl], pH 7,6). As meninges foram delicadamente removidas e o tecido mecanicamente dissociado com auxílio de uma pipeta Pasteur. A densidade de plaqueamento utilizada foi de  $3 \times 10^5$  células por poço de 16mm de diâmetro com lamínulas de vidro previamente cobertas com poli-L-ornitina (1,5µg/mL, Sigma Chemical, St. Louis, MO) no caso de se fazer imunocitoquímica posteriormente, ou diretamente no plástico coberto com poliornitina para quantificação do número de células positivas para β-Gal, e de  $4 \times 10^6$  células por garrafa de 25cm<sup>2</sup> também coberta com poliornitina. As células foram mantidas à 37°C em uma atmosfera com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, Califórnia), suplementado com o nutriente F-12 (DMEM F-12) e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies), e contendo penicilina/estreptomicina e fungizona (Invitrogen Life Technologies), foi trocado de 3 em 3 dias.

### **3.3. Co-culturas**

Para as co-culturas, fêmeas suíças no 14º dia gestacional (E14) foram anestesiadas com éter e mortas por deslocamento cervical. Os embriões foram retirados do útero e os hemisférios cerebrais removidos e colocados em PBS-Glicose. As meninges foram delicadamente removidas e o tecido mecanicamente dissociado com auxílio de uma pipeta Pasteur. Os neurônios foram plaqueados numa densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço e de  $2,6 \times 10^6$  células por garrafa sobre culturas gliais confluentes (com cerca de 7 a 10 dias *in vitro*), previamente lavadas 3 vezes com meio sem soro e incubadas por 48 horas em 300µl (poço) ou 3mL

(garrafa) deste meio. Estas co-culturas foram mantidas por 24 horas em meio DMEM F-12 sem soro, à 37°C, numa atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4. Preparação do meio condicionado**

O meio condicionado pela co-cultura foi preparado de acordo com o descrito por De Sampaio e Spohr et al. (2002). As culturas primárias de astrócitos foram mantidas até atingirem a confluência e colocadas em meio DMEM F-12 sem soro por 24 horas. Os neurônios foram então adicionados e após 24 horas, o meio foi recolhido, centrifugado a 1500g por 10 minutos e usado imediatamente ou estocado em alíquotas à -20°C para uso futuro.

### **3.5. Preparação e isolamento de frações sinaptossomais**

O método para isolar sinaptossomas foi o descrito por Dunkley (1986) que consiste na separação de frações por gradiente de Percoll (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Este gradiente é empregado para o fracionamento de organelas celulares e subcelulares de uma variedade de tecidos e tem sido utilizado com sucesso para a obtenção de sinaptossomas.

Para isso, ratos normais foram sacrificados por deslocamento da coluna vertebral e os telencéfalos foram rapidamente removidos. Em seguida, foram imediatamente homogeneizados a 10.000 rpm em solução de sacarose pH 7,6 (32mM de sacarose, 1mM de EDTA e 0,25mM de DTT) na proporção de 1mL por 10 mg de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 3000g (Sorval) por 10 minutos, à 4 °C, obtendo uma fração solúvel denominada de S1. A fração solúvel S1 foi recolhida e aplicada sobre um gradiente descontínuo de Percoll nas concentrações de 23%, 15%, 10%, 3%, diluído em uma solução de sacarose, como descrito

anteriormente, e centrifugado a 17000g (Ultracentrífuga Himac – 50) durante 15 minutos em tubos de policarbonato. A fração sinaptossomal foi coletada com pipeta Pasteur na interface que se situa entre 23% e 15% após a centrifugação, e lavada com tampão Krebs (108,5mM de NaCl, 4,7mM de KCl, 1,2mM de MgCl<sub>2</sub>, 24,9mM de NaHCO<sub>2</sub>, 0,1mM de CaCl<sub>2</sub>, 10mM de glicose) para a retirada do resíduo de Percoll e sacarose. Depois da ressuspensão dos sinaptossomas intactos, a concentração final de proteínas na fração foi determinada pelo método de Bradford. Os sinaptossomas obtidos foram ressuspensos em meio de cultura para uso imediato em co-culturas com astrócitos.

### **3.6. Meio condicionado sinaptossomal**

Fatores sinaptossomais liberados para o meio de cultura (meio condicionado da fração sinaptossomal) foram utilizados em culturas de astrócitos. Para isto, após a preparação de sinaptossomas, o precipitado com a fração sinaptossomal foi transferido para um ependorff com meio de cultura sem soro em condições estéreis, e deixado por 24 horas na estufa à 37<sup>0</sup>C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte à preparação, o meio condicionado foi centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante adicionado ao tapete astrocitário e deixado por 24 horas.

### **3.7. Tratamento das monocamadas astrocitárias**

A monocamada astrocitária derivada do córtex cerebral de camundongos transgênicos foi preparada como descrito anteriormente. Após 24 horas em DMEM F-12 sem soro, culturas astrocitárias confluentes foram incubadas nas seguintes condições: na presença de a) TGF-β1 (10ng/mL, R&D Systems, Buckinghamshire, UK), ou b) glutamato (10μM, 100μM e 1mM, Amersham Biosciences) ou c)

diferentes concentrações de sinaptossomas ou d) meio condicionado (de co-cultura ou sinaptossomal). As culturas foram mantidas por mais 16 horas a 37°C numa atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, e então foi revelada a atividade da enzima β-Gal.

### **3.8. Ensaio de inibição**

Após 24 horas em DMEM F-12 sem soro, as monocamadas astrocíticas foram incubadas na presença de TGF-β1 (10 ng/mL), glutamato (100 μM), neurônios, ou meio condicionado, concomitantemente com inibidores das vias de sinalização específicos por 24 horas, de acordo com o protocolo previamente descrito (de Sampaio e Sporh et al., 2002). Os seguintes inibidores foram utilizados: PD98059, inibidor da via de MAPK (50μM, Calbiochem); LY294002, inibidor da via de PI3K (5μM, Calbiochem); MCPG ((S)-Methyl-4-carboxyphenylglycine), antagonista do mGlu2/3R (10μM, Tocris Cookson). Todos os inibidores foram diluídos em dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma Chemical).

Para os ensaios de neutralização, após 24 horas em DMEM F-12 sem soro, os astrócitos foram mantidos simultaneamente na presença de glutamato (100μM) ou neurônios e 10μg/mL de um anticorpo neutralizante policlonal contra-TGF-β1 humano (R&D Systems, Buckinghamshire, UK) ou uma imunoglobulina não específica como controle.

### **3.9. Coloração com X-Gal**

Para a revelação da atividade da enzima β-Galactosidase, as células foram fixadas por 3 minutos em paraformaldeído 4% em PBS (pH 7,6), e em seguida lavadas 3 vezes com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas na seguinte solução, preparada em PBS: 2mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 4mM de

ferricianeto de potássio, 4mM de ferrocianeto de potássio, 0,4mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosidase (X-Gal, U.S. Biochemical Corp., Ohio) e 0,001% Tween 20. A incubação se estendeu por 16 horas, em ambiente escuro, à 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e analisadas quantitativamente. Como no transgene GFAP-*lacZ* foi inserida uma seqüência sinal de localização nuclear, a marcação para X-Gal foi observada no núcleo (Galou et al., 1994; Gomes et al., 1999a). As células marcadas com a coloração de X-Gal (marcação nuclear azulada) foram contadas em, no mínimo, 5 campos aleatórios por poço à microscopia óptica, com objetiva de 20X. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Os valores obtidos foram comparados e sua significância estatística atestada pelo teste ANOVA.

### **3.10. Cultura enriquecida em glia radial**

As culturas primárias de GR foram realizadas de acordo com Stipursky & Gomes, 2007. Fêmeas suíças no 14º dia gestacional foram anestesiadas e mortas por deslocamento cervical. Os embriões foram retirados do útero e os hemisférios cerebrais removidos e colocados em PBS-Glicose. As meninges foram delicadamente removidas e o tecido mecanicamente dissociado com auxílio de uma pipeta Pasteur. A densidade de plaqueamento utilizada foi de  $2 \times 10^5$  células por poço com lamínulas tratadas com 1,5µg/mL de poliornitina. As células foram mantidas por 24 horas em DMEM F-12 (Invitrogen Life Technologies) suplementado por 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies). Após este período, as culturas de GR foram incubadas por mais 24 horas em DMEM F-12 sem soro, adicionado do tratamento desejado.

### **3.11. Cultura de explante**

Foram utilizados camundongos suíços embrionários com 14 dias (E14). Os hemisférios cerebrais foram isolados, a meninge retirada de forma delicada, córtex cerebral dissecado e, então, o tecido foi fragmentado em pedaços de cerca de 1 mm e plaqueado (um explante por poço), em uma placa de 96 poços previamente tratada com polilisina (Sigma Chemical, 40µg/mL) e laminina (Invitrogen Life technologies, 40µg/mL). O plaqueamento foi feito em meio DMEM/F12 (Invitrogen Life technologies) com soro fetal bovino 10% (MCS) por 30 a 40 minutos. Após este período, o meio foi substituído por neurobasal (Invitrogen Life technologies), com o acréscimo do suplemento B-27 a 2% (Invitrogen Life technologies). A cultura foi tratada com glutamato (100µM, Amersham Biosciences) e/ou D-serina (500µM, Sigma Chemical). As células foram mantidas em cultura por aproximadamente 48 horas em estufa à 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Para análise da migração celular, os explantes foram fotografados após 48 horas em microscópio óptico invertido NIKON TE2000. Em cada explante foram consideradas as 10 células com o maior raio de migração. Cada experimento foi realizado no mínimo três vezes e em triplicata. Para a análise da distância de migração foi utilizado o programa Image J. (de acordo com o descrito por Santiago et al., 2001).

### **3.12. Cultura de progenitores neurais**

Foram utilizados camundongos suíços embrionários com 12 dias (E12). O córtex cerebral foi dissecado e transferido para um tudo onde foi gentilmente dissociado de forma mecânica com pipeta Pasteur. Cerca de 1 milhão de células por placa de petri foram plaqueadas com meio DMEM/F12 (Invitrogen Life technologies)

suplementado com 2% de B-27 (Invitrogen Life technologies), 10ng/mL de FGFb (R&D systems) e 10ng/mL de EGF (Invitrogen Life technologies). As células foram mantidas em cultura por aproximadamente 48 horas em estufa à 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. Dois terços do meio foram trocados a cada 2 dias até as neuroesferas atingirem 100µm de diâmetro, tamanho ideal para tratamento e processamento.

### **3.13. Imunocitoquímica e Imunohistoquímica**

A técnica de imunocitoquímica utilizada foi a descrita por Sousa et al., 2004. Após atingir a confluência, as células foram lavadas e fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 4% - sacarose 4% (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas SA, Rio de Janeiro, RJ). Posteriormente, as células foram lavadas, permeabilizadas com PBS Triton X-100 a 0,2% por 5 minutos e o bloqueio dos sítios inespecíficos feito com 5% de PBS/BSA (BSA: *bovine serum albumine*; albumina de soro bovino) ou 10% de NGS (NGS: *normal goat serum*; soro normal de cabra) por 1 hora. As células foram incubadas por 12 horas à 4°C com anticorpo primário contra GFAP (**Tabela 1**). Antes desta incubação, a atividade da peroxidase endógena foi eliminada com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos, seguida de várias lavagens com PBS. Após a reação com o anticorpo primário, as células foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (**Tabela 2**). A atividade da peroxidase foi revelada utilizando como cromógeno a 3,3'-diaminobenzidina (DAB peroxidase; Vector Laboratories, Inc.). As células foram desidratadas em álcool etílico (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas AS) e as lamínulas montadas em Entellan (Sigma Chemical). As imagens foram obtidas em microscópio óptico NIKON TE300, utilizando o contraste de fase. Os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário durante a reação.

Para a marcação por imunofluorescência utilizou-se o protocolo descrito em Gomes et al., 1999a. Após fixação como já descrito anteriormente, as células foram lavadas 3x em PBS, permeabilizadas em PBS/Triton X-100 0,2% por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a permeabilização, as células foram imunobloqueadas em 5% de PBS/BSA, para evitar marcação inespecífica, por 1 hora. Para a imunohistoquímica, cortes de 12 $\mu$ m em criostato de neuroesferas foram permeabilizados com PBS Triton X-100 0,3% por 5 minutos e o bloqueio dos sítios inespecíficos feito com PBS/NGS 10% por 1 hora. Em seguida as células ou o corte foram incubados por 12-16 horas à 4<sup>o</sup> C em câmara úmida com os anticorpos primários específicos diluídos em PBS/BSA 1%. Após a incubação com os anticorpos primários (**Tabela 1**), as células foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários (**Tabela 2**) por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. Os controles negativos foram obtidos omitindo-se os anticorpos primários. Os núcleos foram corados com DAPI (4'6-Diamidino -2- phenylindole; Sigma Chemical). As lâminas foram montadas utilizando *N*-propil galato (Sigma Chemical) e visualizadas em microscópio Nikon TE 300. Para as análises quantitativas, foram contados, no mínimo, 5 campos aleatórios por lamínula. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representaram a média de 3 experimentos independentes. Os valores obtidos foram comparados e sua significância estatística atestada pelo teste ANOVA.

<b>Antígeno</b>	<b>Feito em</b>	<b>Reconhece</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>
GFAP	Coelho	Camundongo	1:500	Dako Cytomation
$\beta$ -TubulinaIII	Camundongo	Camundongo	1:1000	Promega Corporation
Smad 4	Camundongo	Camundongo	1:5	Santa Cruz Biotechnology
GLAST	Porquinho da Índia	Camundongo	1:100	Chemicon International
Nestina	Camundongo	Camundongo	1:200	Chemicon International
Serina Racemase	Coelho	Camundongo	1:200	Purificado no laboratório do Professor Rogério Panizzutti
Serina Racemase	Cabra	Camundongo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Ki67	Coelho	Camundongo	1:100	ABCam
Caspase-3 ativada	Coelho	Camundongo	1:50	Cell Signaling
BLBP	Coelho	Camundongo	1:200	Chemicon International

**Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados na imunocitoquímica e imunohistoquímica.**

<b>Conjugado à</b>	<b>Feito em</b>	<b>Reconhece IgG de</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>
Peroxidase	Cabra	Coelho	1:200	Amersham Biosciences
AlexaFluor488	Cabra	Coelho	1:200	Molecular Probes
AlexaFluor488	Cabra	Camundongo	1:300	Molecular Probes
AlexaFluor488	Burro	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology
AlexaFluor488	Cabra	Porquinho da Índia	1:400	Chemicon International
AlexaFluor546	Cabra	Coelho	1:2000	Molecular Probes
AlexaFluor546	Cabra	Camundongo	1:500	Molecular Probes
AlexaFluor546	Burro	Cabra	1:200	Molecular Probes

**Tabela 2 – Anticorpos secundários utilizados na imunocitoquímica e imunohistoquímica.**

### 3.14. *Western blot*

A análise dos níveis de proteínas específicas foi realizada como descrito em Sousa et al., 2006 (Anexo 2). Os hemisférios de camundongos embrionários (E14) e recém-natos (P0) foram removidos, os telencéfalos dorsais separados e colocados em tampão de amostra 2x (100mM de Tris-Cl [pH 6,8], 4% de SDS [dodecil sulfato de sódio], 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol e 200mM de DTT [dithiothreitol]). Os lisados foram recolhidos em eppendorfs, mantidos por 1 minuto à 100°C e 4 minutos à 95°C, antes de serem analisados por eletroforese em mini gel de acrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi aplicado um total de 10µg de amostra por poço no gel e as proteínas separadas eletroforeticamente a 100V. Após a separação, as proteínas foram eletricamente transferidas por 1 hora a 2mA/cm<sup>2</sup> para a membrana de PVDF (*Hybond-P polyvinylidene difluoride*) (Amersham Biosciences). A membrana foi imunobloqueada em tampão Tris salina-Tween (TBS-T: 20mM de Tris-Cl pH7,6 e 137mM de NaCl, com 0,1% de Tween 20 [Merk & Co., Whitehouse Station, NJ, USA]) contendo 5% de leite em pó desnatado por 12 horas a 4°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 1x em TBS-T, e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo primário (**Tabela 3**) diluído em TBS-T com 5% leite. Após este período, a membrana foi lavada e incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (**Tabela 4**) diluído em TBS-T com 5% de leite.

Após 3 lavagens, as proteínas foram visualizadas usando-se um sistema de detecção de quimioluminescência como substrato (Super Signal: West Pico Luminol Enhancer Solution, West Pico Stable Peroxide Solution; Pierce).

<b>Antígeno</b>	<b>Feito em</b>	<b>Reconhece</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>
Serina Racemase	Coelho	Camundongo	1:500	Purificado no laboratório do Professor Rogério Panizzutti
Phospho-Smad 2	Coelho	Camundongo	1:500	Cell Signaling
$\alpha$ -Tubulina	Camundongo	Camundongo	1:1000	Sigma Chemical

**Tabela 3 – Anticorpos primários utilizados no *Western blot*.**

<b>Conjugado à</b>	<b>Feito em</b>	<b>Reconhece IgG de</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>
Peroxidase	Cabra	Coelho	1:1000	Amersham Biosciences
Peroxidase	Cabra	Camundongo	1:1000	Amersham Biosciences

**Tabela 4 – Anticorpos secundários utilizados no *Western blot*.**

### **3.15. Extração de RNA**

O RNA foi extraído utilizando-se o protocolo do Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen Life Technologies), conforme descrito pelo fabricante. Para cada garrafa de 25 cm<sup>3</sup>, utilizamos 1 mL de Trizol<sup>®</sup>. Após, no mínimo, 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados à mistura 200 $\mu$ l de clorofórmio. A amostra foi, então, homogeneizada e submetida à centrifugação por 15 minutos à 14000g à 4°C. A fase aquosa, contendo o RNAm, foi separada e a ela adicionados 500 $\mu$ l de clorofórmio novamente homogeneizado e centrifugado à 14000g à 4°C. A fase aquosa, contendo o RNAm, foi separada novamente e a ela adicionados 500 $\mu$ l de álcool isopropílico. A amostra foi incubada por, no mínimo, 30 minutos à -70°C (ou até 3 dias à -70°C). Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 14000g à 4°C e o precipitado lavado com etanol 70%. Após secar por aproximadamente 30 minutos à

temperatura ambiente, o RNAm foi ressuspenso em 15µl de água livre de RNase. Posteriormente, dosamos a quantidade de RNA na amostra.

### **3.16. Síntese de DNAc**

RNA total, extraído como descrito anteriormente, foi utilizado para a confecção de DNAc. Com esse objetivo, 1 µg de RNA foi incubada com 0,5 µg de oligonucleotídeo dT (Oligo dT<sub>12-18</sub>; Invitrogen Life technologies), por 5 minutos à 70°C. Posteriormente, a mistura foi estocada no gelo e a ela adicionados os seguintes reagentes: 4 µl de tampão 5x; 2µl de DTT (0,1M); 1 µl de dNTPs (10 mM cada); 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 1 µl da enzima Super Script II transcriptase reversa (200u/µl) e 5,8µl de água livre de RNase. Após este tempo, a reação foi incubada à 42° C por 50 minutos e à 70°C por 15 minutos. Após este período, o DNAc foi estocado à -20° C até a sua utilização nos processos de amplificação por PCR.

### **3.17. Reação de RT-PCR**

A reação de polimerização em cadeia foi feita utilizando-se oligonucleotídeos complementares ao gene de GAPDH (que codifica enzima que participa da glicólise) (F: 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' e R: 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3') como controle positivo e quantitativo das nossas condições; e ao gene de BLBP (F: 5' AGA CCC GAG TTC CTC CAG TT-3' e R: 5' ATC ACC ACT TTG CCA CCT TC 3'). Ao cDNA (10-100 ng) foram adicionados os seguintes reagentes: 2 µl do tampão de PCR sem Mg 10x; 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,4µL de cada dNTP (10 mM cada) (Amersham Biosciences); 0,1 µl da enzima Taq DNA polimerase (5u/µl) (Invitrogen Life Technologies); oligonucleotídeo na concentração final de 0,5mM. Como controle negativo, foi feito PCR de uma amostra de RNAm não incubada

previamente com a transcriptase reversa e de uma amostra onde o DNA ou RNA molde foi omitido. O RT-PCR foi realizado em ciclos, nas seguintes temperaturas: um primeiro ciclo à 94°C por 3 minutos para uma primeira desnaturação, seguida de 25 a 35 ciclos de 50 segundos à 94°C (para desnaturação), 50 segundos de 55 a 58°C (dependendo do oligonucleotídeo) (para o anelamento dos oligonucleotídeos às fitas de DNA), 1 minuto e 30 segundos (para a polimerização das novas fitas), e um último ciclo à 72°C por 5 minutos (para aumentar a eficiência da polimerização). Os produtos de DNA do PCR foram analisados eletroforéticamente em gel de agarose 2% e visualizados por coloração com brometo de etídio 0,5µg/mL.

## 4. RESULTADOS

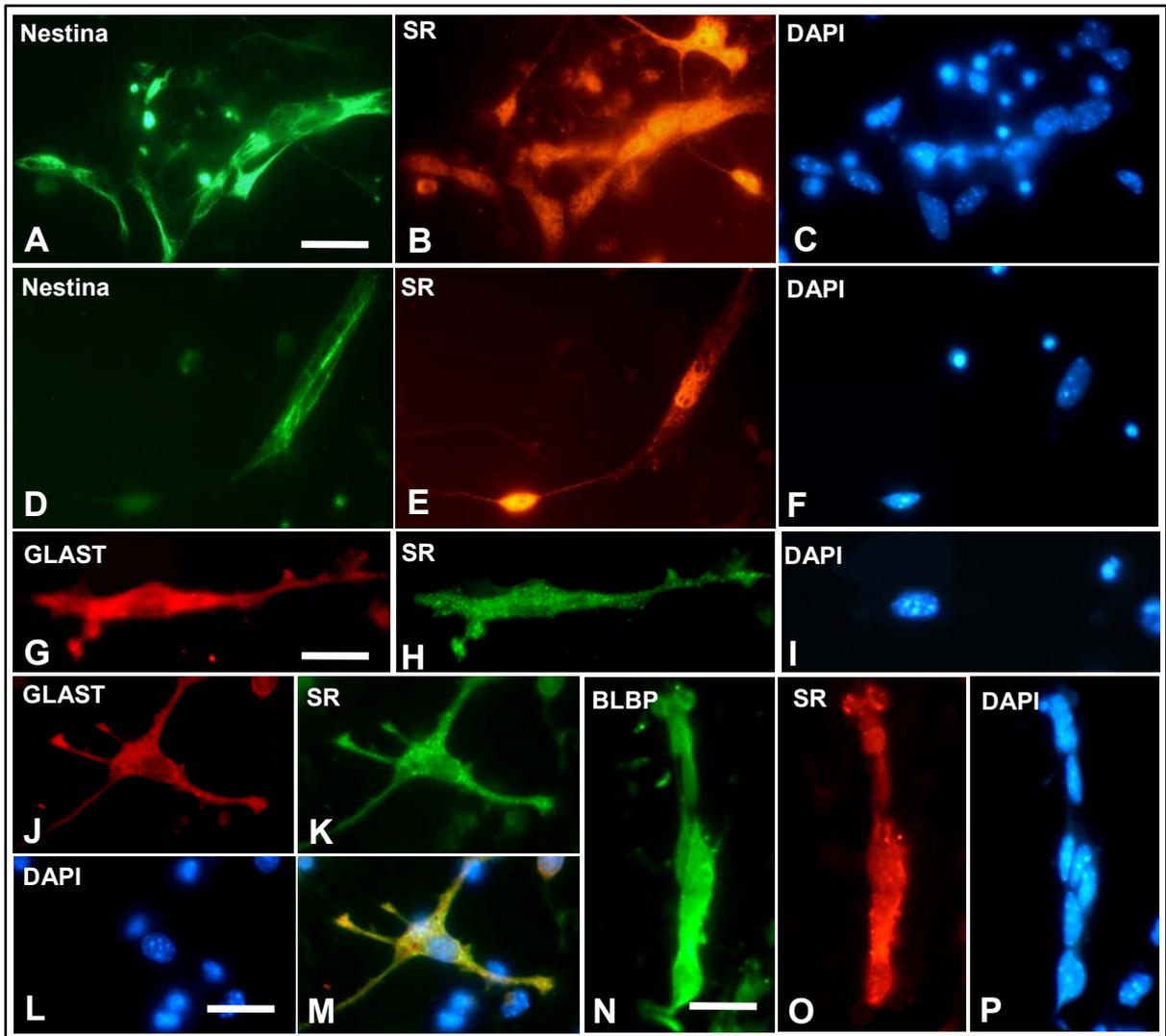
---

### PARTE 1: PAPEL DO GLUTAMATO E DA D-SERINA NA ESPECIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DE GLIA RADIAL (GR) NO CÓRTEX CEREBRAL

Com o objetivo de analisarmos a ação de glutamato e D-serina em progenitores do córtex cerebral, utilizamos duas metodologias: 1) cultura enriquecida em glia radial, que tem sido utilizada como metodologia em nosso laboratório para estudar esta população *in vitro* (Stipursky & Gomes, 2007). Esta cultura é mista e possui cerca de 35% de células de GR (positivas para nestina e GLAST), 35% de neurônios (positivos para  $\beta$ -TubulinIII), 10% de progenitores (positivos para nestina e negativos para GLAST) e 5% de astrócitos (positivos para GFAP). 2) cultura de progenitores cultivados sob a forma de neuroesferas.

#### 4.1. Serina Racemase (SR) é expressa em células de GR *in vitro*

A SR, enzima responsável pela conversão de L-serina em D-serina, está presente na glia de Bergmann no cerebelo em desenvolvimento, majoritariamente no período de intensa migração cerebelar (Boehning & Snyder, 2003). Neste trabalho, investigamos se no córtex cerebral, durante o período de migração neuronal, as células de GR sintetizam SR. Para analisar esta questão, utilizamos uma cultura enriquecida em células de GR (Stipursky & Gomes, 2007) do córtex cerebral de camundongos E13,5. Como podemos observar na **Figura 3**, identificamos por imunocitoquímica, diversas células duplamente marcadas para SR e antígenos específicos de GR (Nestina (**Figura 3A-F**), GLAST (**Figura 3G-M**) e BLBP (**Figura 3N-P**)). Estes dados demonstram que células de GR expressam SR *in vitro*.



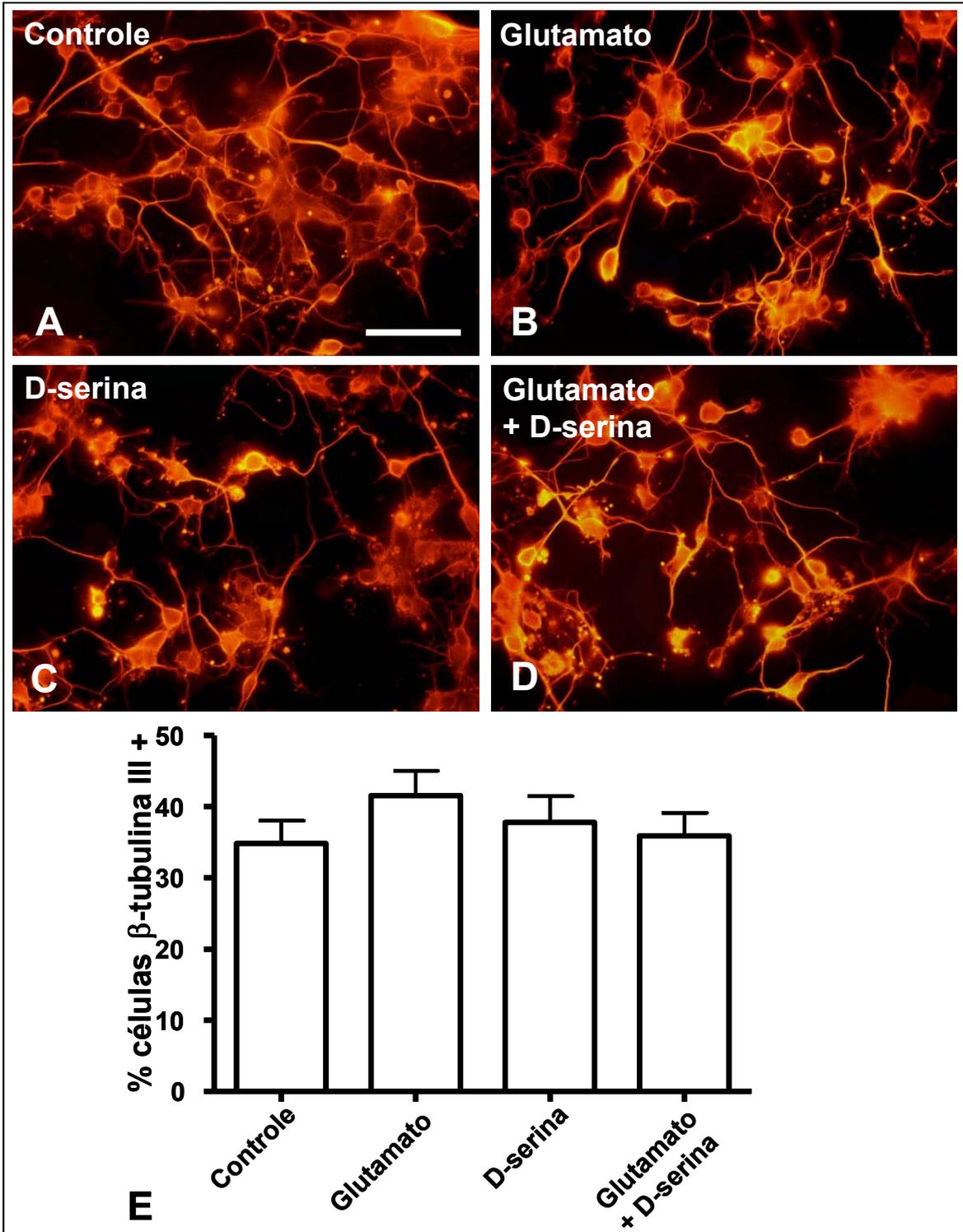
**Figura 3 – Distribuição de Serina Racemase (SR) em células de GR *in vitro*.** Culturas enriquecidas em GR foram mantidas por 48 horas, fixadas e imunomarcadas para SR (B, E, H, K, O) e para marcadores de GR: Nestina (A, D), GLAST (G, J) e BLBP (N). C, F, I, L, P mostram a marcação dos núcleos dos mesmos campos por DAPI. M mostra a sobreposição de J, K e L. Barras: 20µm

## **4.2. Glutamato e D-serina induzem o aumento na população de células de GR em cultura**

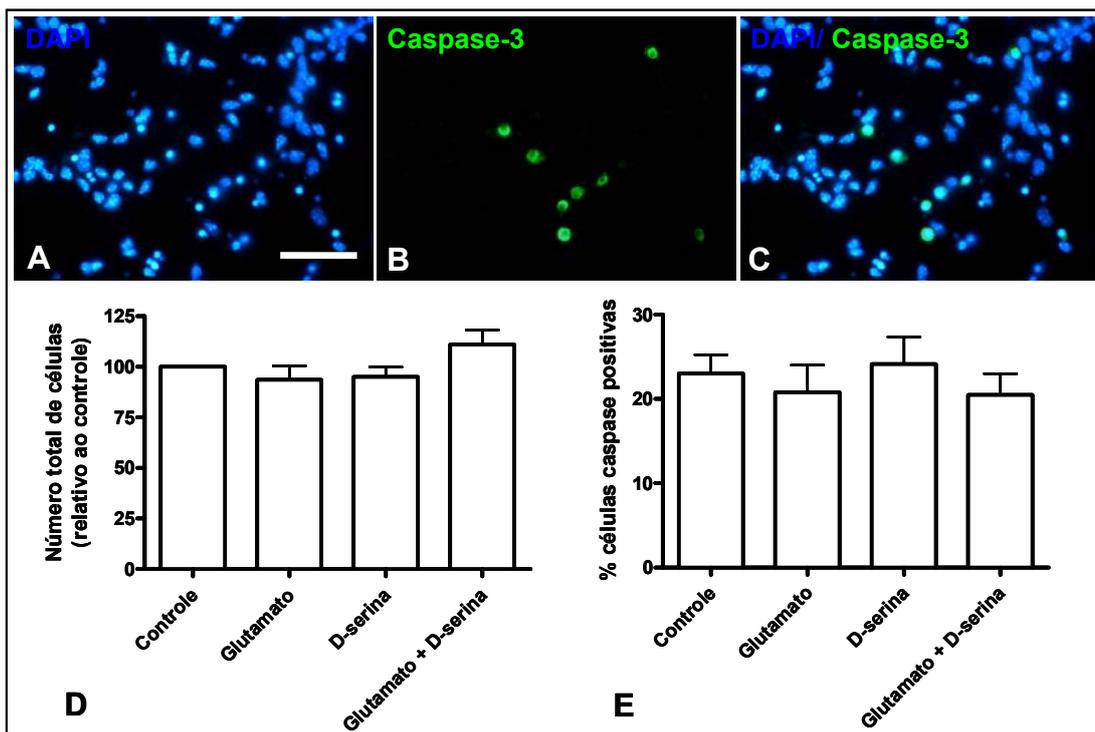
No cerebelo, receptores NMDA participam na migração neuronal e a D-serina é essencial para promover este processo (Komuro & Rakic, 1993; Kim et al., 2005). No córtex cerebral, dados mostram que alterações na função dos receptores NMDA podem levar a um distúrbio migratório (Marret et al., 1996; Kutsuwada et al., 1996; Messersmith et al., 1997; Hirai et al., 1999). Nesta estrutura, os neurônios migram através das células da GR para atingirem suas posições na placa cortical (Nadarajah et al., 2003; Nadarajah, 2003, Ghashghaei et al., 2007). Uma das razões pela qual uma molécula pode influenciar o processo de migração no córtex cerebral é alterar a identidade e morfologia das células da GR. Com o objetivo de estudarmos o papel do glutamato e da D-serina na morfologia e no grau de diferenciação da GR, utilizamos uma cultura enriquecida em células de GR (Stipursky & Gomes, 2007), tratadas por 24 horas com 100 $\mu$ M de glutamato e/ou 100 $\mu$ M de D-serina.

Sabe-se que o excesso de glutamato no meio extracelular é tóxico para neurônios (Choi, 1988; McCall et al., 1979; Olney, 1971). Com o objetivo de verificar se o glutamato adicionado à cultura não estava causando nenhum dano a população neuronal, quantificamos o número de células positivas para  $\beta$ -tubulinaIII (**Figura 4A-E**). Não observamos diferença significativa no número de células marcadas, indicando que não houve prejuízo aos neurônios devido ao tratamento glutamatérgico.

Analisamos também o número total de células em cultura através da quantificação das células marcadas com DAPI e a morte celular através da marcação com caspase-3 ativada (**Figura 5A-E**).



**Figura 4 – Influência dos neuromoduladores na população neuronal.** Culturas enriquecidas em GR foram tratadas: meio sem soro (controle - **A**), 100 $\mu$ M de glutamato (**B**), 100 $\mu$ M de D-serina (**C**), 100 $\mu$ M de glutamato/D-serina (**D**). Após 24horas foram fixadas, imunomarcadas para  $\beta$ -tubulinaIII e as células positivas para a marcação foram quantificadas (**E**). Não há diferença significativa no número de neurônios. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Barra: 50 $\mu$ m.



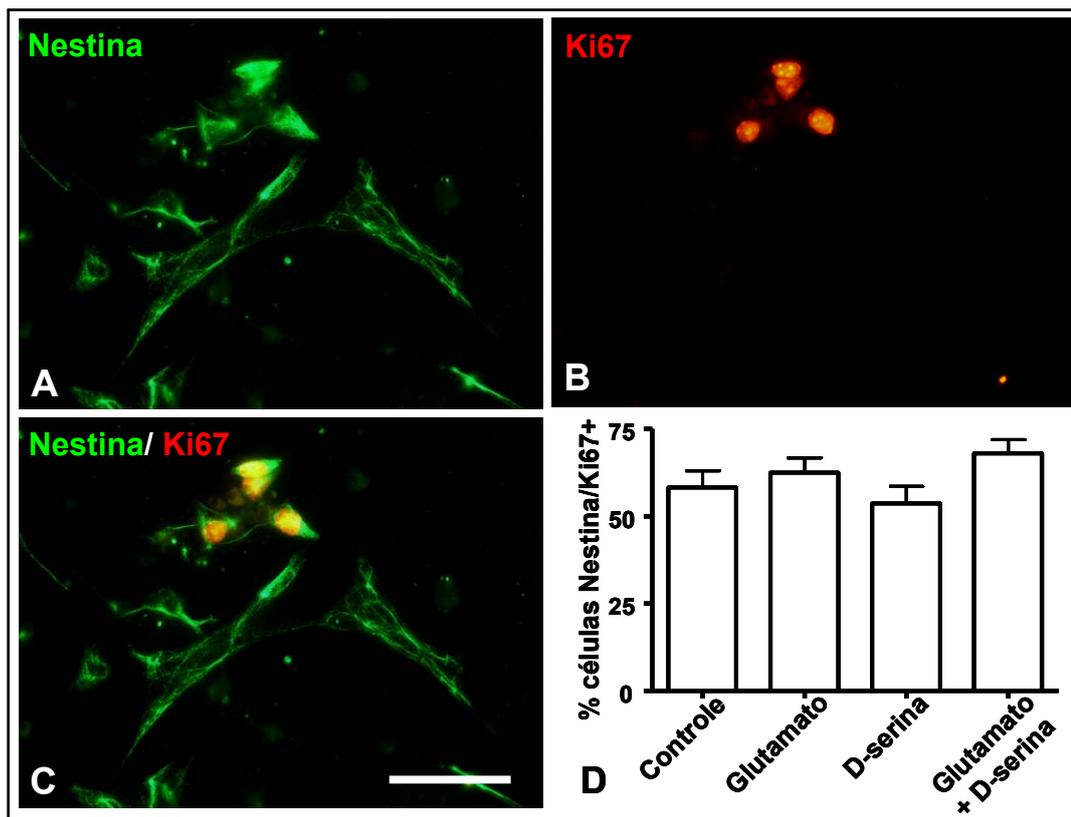
**Figura 5 – Efeito dos neuromoduladores no número total de células e morte celular.** O número total de células nas culturas enriquecidas em GR foi analisado após 48 horas de cultura, incluindo as 24 horas de tratamento. As células foram fixadas, o núcleo marcado com DAPI (A) e o número total de células quantificado (D). As células também foram imunomarcadas para caspase-3 (B) e quantificadas (E) para análise da morte celular. As imagens correspondem a situação controle. Não há diferença significativa em ambas situações. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Barra: 50μm.

O número total de células e a morte celular não foram alterados em resposta ao tratamento com glutamato e/ou D-serina.

Alguns trabalhos têm mostrado a participação do glutamato na proliferação de progenitores humanos e murinos, através de receptores do tipo NMDA (Luk et al., 2003; Mochizuki et al., 2007; Suzuki et al., 2006) e AMPA/kainato (Haydar et al., 2000; LoTurco et al., 1995). Baseados nestes dados que o glutamato pode, através de seus diferentes receptores, alterar a taxa de proliferação, analisamos a proliferação dos precursores neste modelo de cultura (**Figura 6A-D**). Após 24 horas do tratamento com glutamato e/ou D-serina, as células foram fixadas e imunomarcadas para Ki67, marcador de proliferação celular. Não verificamos, neste modelo de cultura, alteração significativa na proliferação dos precursores do córtex cerebral em resposta ao tratamento por glutamato e/ou D-serina.

Com o objetivo de analisar o efeito dos neuromoduladores glutamato e D-serina na população de progenitores radiais, cultivamos as células por 24 horas, tratamos com glutamato e/ou D-serina e após mais 24 horas, marcamos as células com anticorpo anti-nestina (**Figura 7A-D, G**). Não observamos alteração no número de células positivamente marcadas para nestina, sugerindo que esses neurotransmissores não influenciem o destino fenotípico dessas células.

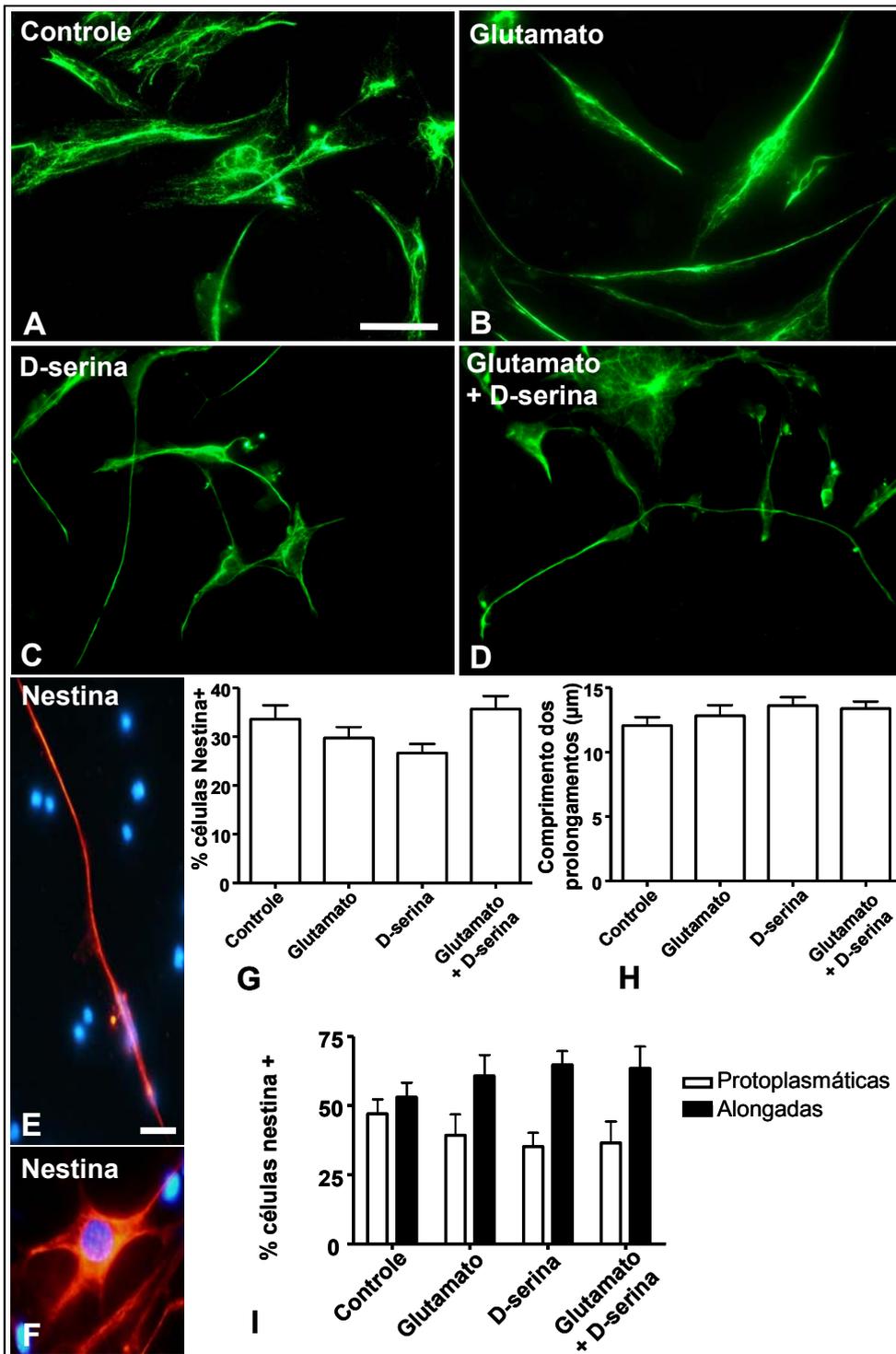
A GR apresenta *in vivo* uma morfologia bipolar com seus prolongamentos se estendendo da zona ventricular até a pia-máter (Malatesta et al., 2003; 2008). Essa morfologia radial é essencial para a migração e correto posicionamento neuronal. Neste contexto, analisamos o efeito de D-serina e glutamato na morfologia da GR. Observamos a presença de populações de precursores distintas morfologicamente, sendo um tipo mais alongado (**Figura 7E**) e o outro mais protoplasmático (**Figura 7F**).



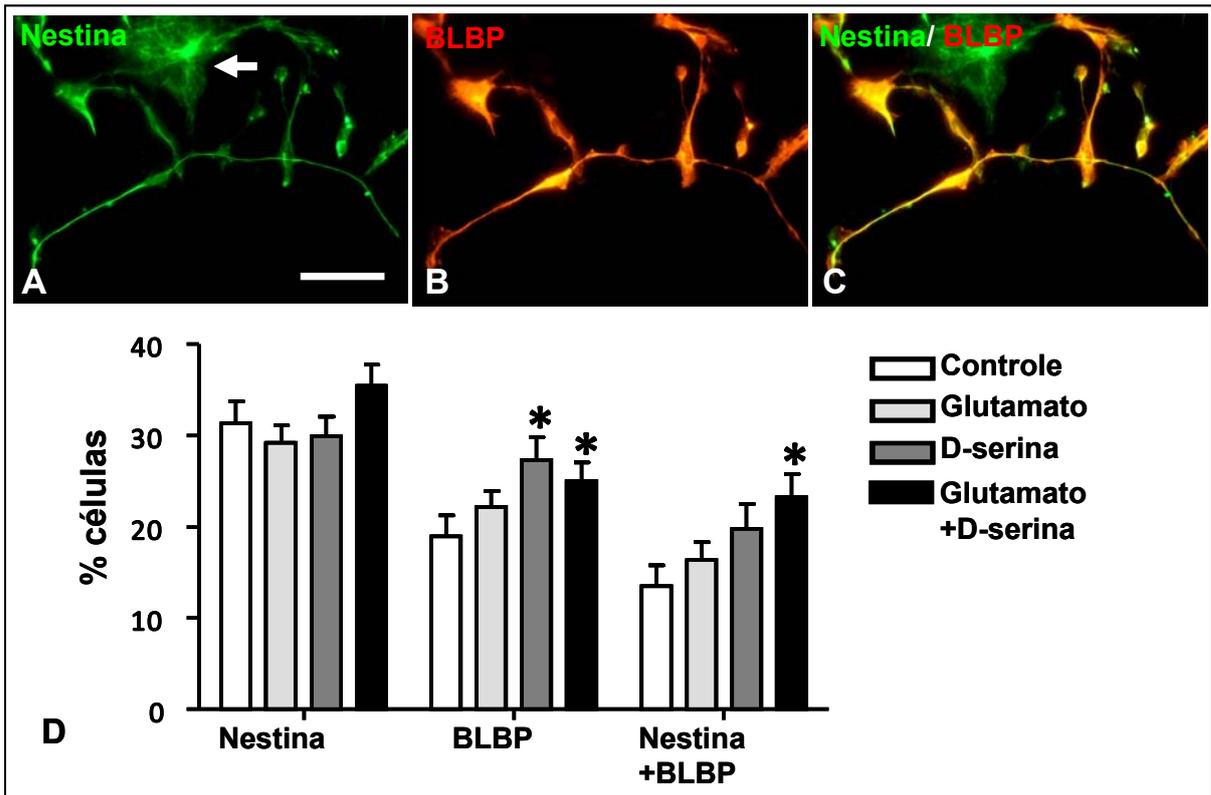
**Figura 6 – Ação de glutamato/D-serina na proliferação dos precursores.** Culturas enriquecidas em GR foram mantidas 24 horas em meio com soro, seguida de 24 horas em meio sem soro suplementado com glutamato e/ou D-serina. As células foram fixadas e imunomarcadas para nestina (A) e Ki67 (B). A sobreposição de A com B é mostrada em C. O número de precursores proliferando foi analisado (D) e os resultados mostram que não há diferença significativa. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Barra: 50 $\mu$ m.

A quantificação destes tipos celulares distintos revelou uma indução ao fenótipo radializado na presença de glutamato e/ou D-serina (**Figura 7I**). Enquanto no controle, observamos uma proporção de células protoplasmáticas:alongadas de aproximadamente 1:1, em presença dos neuromoduladores, o número de células alongadas aumenta, e a proporção passa para 1:1,5. A adição concomitante de D-serina e glutamato não teve ação sinérgica sugerindo que os neuromoduladores agem na mesma população celular e que a via de sinalização dos dois moduladores deva ser a mesma. Analisamos, ainda, a extensão das células alongadas, medindo da ponta de um prolongamento, passando pelo corpo celular e até a ponta do outro prolongamento. Não observamos diferença significativa no comprimento dos prolongamentos das células alongadas (**Figura 7H**).

Uma vez que a presença destes neuromoduladores altera a radialização dos precursores, nos perguntamos se estes não poderiam estar induzindo um aumento na população de células marcadas para BLBP (marcador de células de GR). A quantificação revelou que há um aumento de células positivas para BLBP e daquelas duplamente marcadas para nestina e BLBP na presença de ambos os neuromoduladores (**Figura 8A-D**), indicando a possível transição destes precursores positivos para nestina para o fenótipo de GR e, conseqüentemente, estes precursores tornam-se mais radializados. Observamos ainda um aumento de células positivas para BLBP quando tratamos somente com D-serina, possivelmente, o glutamato necessário para a ativação de NMDAR está sendo fornecido pelos neurônios em cultura. Em conjunto, esses dados sugerem que os neuromoduladores D-serina e glutamato possam induzir a transição progenitor neuroepitelial-GR.



**Figura 7 – Glutamato e D-serina induzem a radialização de progenitores neurais.** Culturas enriquecidas em GR foram mantidas 24 horas em meio com soro, seguidas de 24 horas em meio sem soro com os seguintes tratamentos: meio sem soro (controle - A), 100µM glutamato (B), 100µM D-serina (C) ou ambos (D). As células foram fixadas, imunomarcadas para nestina e o número total de células marcadas foi quantificado (G). Em I temos a análise da porcentagem de células marcadas para nestina com morfologia alongada (E) ou protoplasmática (F). H mostra a medida dos prolongamentos das células alongadas. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Barras: 50µm (A) e 20µm (E).

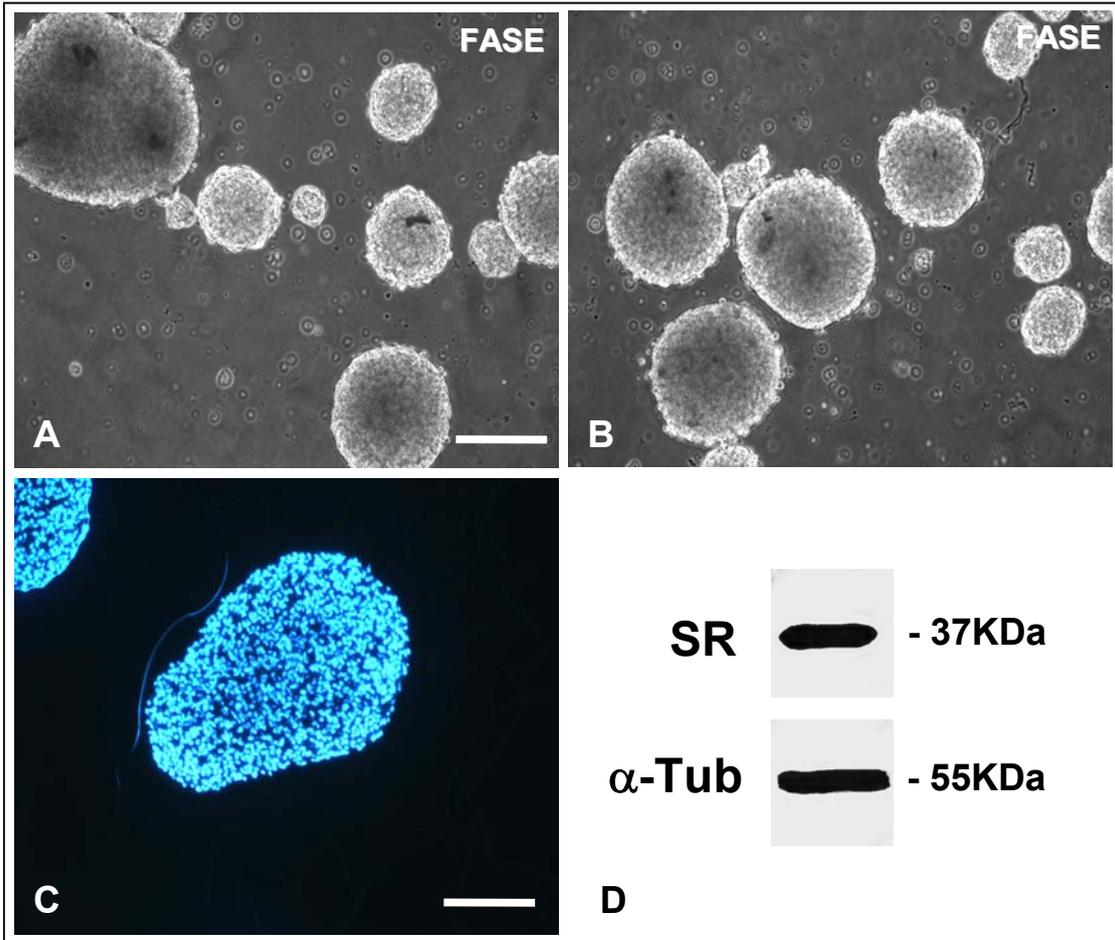


**Figura 8 – Ação de glutamato/D-serina na especificação da população de GR.** Culturas enriquecidas em GR foram mantidas 24 horas em meio com soro, seguida de 24 horas em meio sem soro suplementado com glutamato e/ou D-serina. As células foram fixadas e imunomarcadas para nestina (A) e BLBP (B). A sobreposição é mostrada em C. A população de GR foi quantificada (D). Como já mostrado anteriormente, não há diferença no número de precursores, contudo quando co-localizamos a marcação de nestina com BLBP, parece haver um aumento com a adição de glutamato e D-serina. Além disso, estes induzem um aumento no número de células BLBP-positiva. Este dado aponta para a transição dos precursores para a formação da população de GR. Em A, podemos observar uma célula protoplasmática nestina-positiva e BLBP-negativa (seta). Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Barra: 50µm. \* p<0,05.

### **4.3. A especificação de células de GR em neuroesferas é induzida por glutamato e D-serina**

Verificamos que em culturas mistas, glutamato e D-serina induzem o fenótipo radial. Imaginamos então, se estes induziriam o aparecimento de células de GR em cultura de progenitores sob a forma de neuroesferas. Parte desta tese se propôs a estabelecer esse modelo de estudo no laboratório. Para o preparo destas culturas, fêmeas de camundongos suíços no 12º dia gestacional (E12) foram anestesiadas e mortas por deslocamento cervical. Os embriões foram retirados do útero, os hemisférios cerebrais removidos, o córtex dissecado e o tecido mecanicamente dissociado com auxílio de uma pipeta Pasteur. As células foram cultivadas, então, em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de B-27, FGFb (10ng/mL) e EGF (10ng/mL). Dois terços do meio são trocados a cada dois dias. Após duas semanas de cultivo, neuroesferas com média de 100µm de diâmetro podem ser observadas (**Figura 9A-B**) e estas podem ser tratadas e processadas para uma análise por imunohistoquímica. Na **Figura 9C**, podemos observar uma neuroesfera após o período de cultivo, que foi crio-protégida, cortada a 12µm de espessura e marcada com DAPI. Verificamos, então, a presença da enzima SR nestas neuroesferas através do *Western blot* (**Figura 9D**).

Para analisarmos se a população de GR estaria sendo modulada nestas esferas, adicionamos glutamato (100µM) e D-serina (100µM). Após 24 horas adicionamos mais uma dose da mesma concentração destes aminoácidos. Após mais um período de 24 horas, as neuroesferas foram fixadas, processadas para cortes em criostato, fatiadas em 12µm de espessura e imunomarcadas para BLBP (**Figura 10A-B**).



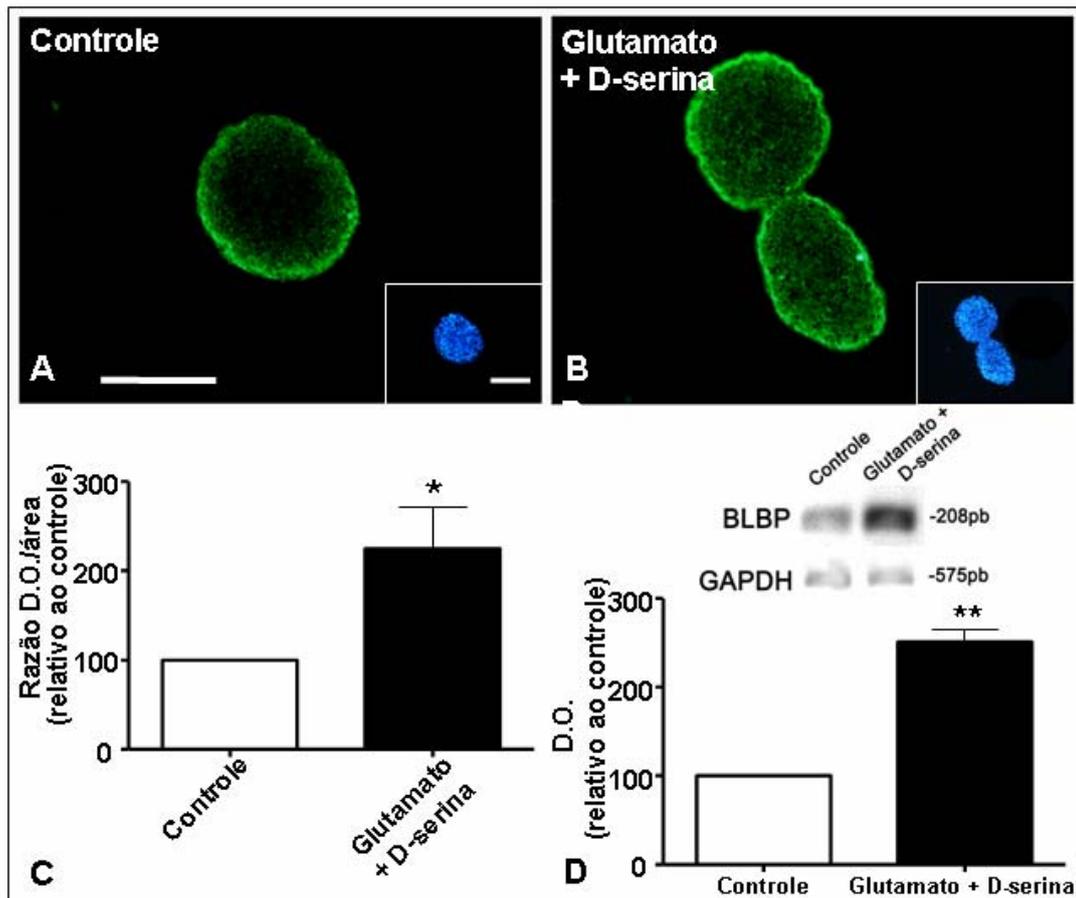
**Figura 9 – Progenitores neurais cultivados em neuroesferas expressam Serina Racemase (SR).** Neuroesferas foram formadas a partir dos progenitores de camundongos E12 em presença de 10ng/ml FGFb, 10ng/ml de EGF e 2% B-27 (A, B). Após 2 semanas em cultura, as neuroesferas foram fixadas, crioprotegidas e cortadas em 12 $\mu$ m de espessura possibilitando a análise por imunomarcadores. Em C, a marcação com DAPI. Após as 2 semanas de cultivo, a presença de Serina Racemase (SR) nas esferas foi verificada através do *Western blot* (D). A proteína  $\alpha$ -Tubulina foi utilizada como controle de carregamento protéico. Barras: 100 $\mu$ m (A) e 50 $\mu$ m (C).

Avaliamos, então, a densidade óptica da imunomarcação e dividimos pela área da neuroesfera para obter uma razão que quantificasse a densidade de marcação para BLBP em cada neuroesfera. A análise da densitometria revelou um aumento de cerca de 120% na quantidade de BLBP após o tratamento (**Figura 10C**) indicando um direcionamento para a especifica o dos progenitores em células de GR. Para confirmar este dado, processamos as esferas após o devido tratamento para a análise por RT-PCR. Como podemos observar na **Figura 10D**, há um aumento de cerca de 150% nos níveis de RNAm para BLBP após o tratamento com glutamato e D-serina, confirmando o dado citado anteriormente.

Estes últimos resultados corroboram a hipótese de que glutamato e D-serina induzem um fenótipo de GR, modulando os níveis de BLBP, conforme já mostrado em culturas enriquecidas em GR (vide **Figuras 7 e 8**).

#### **4.4. Efeito de glutamato e D-serina na migra o neuronal em explantes de córtex cerebral**

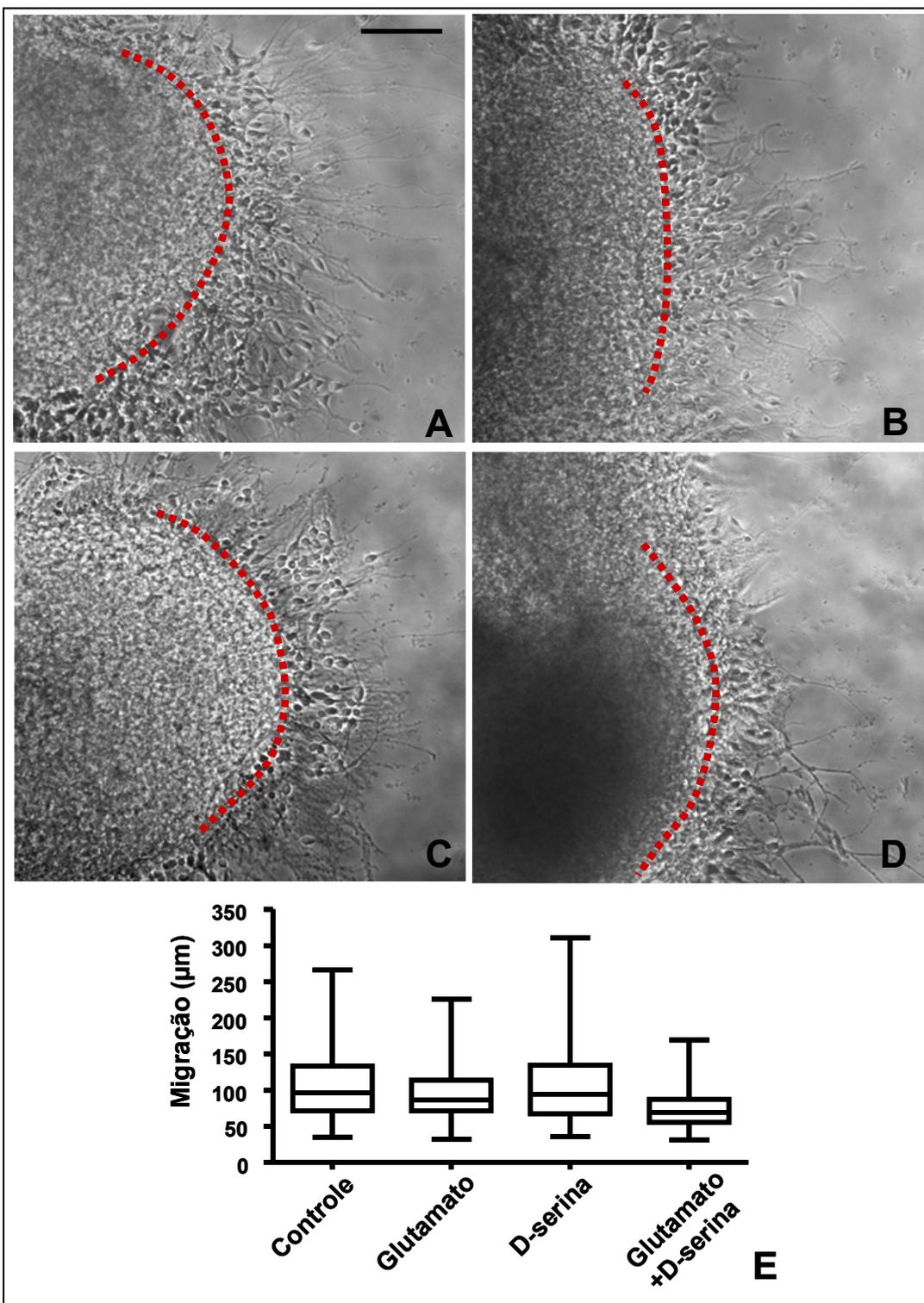
Nossos dados mostrando que o glutamato e a D-serina atuam na especifica o da GR sugerem um possível envolvimento destas moléculas com a migra o neuronal, uma vez que esta   guiada pelas células de GR. Conforme já apresentado na introdu o desta tese, dados na literatura mostrando o envolvimento do NMDAR no processo de migra o do córtex cerebral em roedores parecem controversos (Marret et al., 1996; Kutsuwada et al., 1996; Messersmith et al., 1997; Hirai et al., 1999). A a o direta da D-serina na migra o no córtex cerebral ainda não foi estudada.



**Figura 10 – Glutamato e D-serina aumentam os níveis de BLBP em neuroesferas.** Após 2 semanas em cultura, neuroesferas foram tratadas por 24 horas com meio sem soro (controle) ou 100 μM de glutamato e 100 μM de D-serina. Mais 100 mM de glutamato e 100 μM de D-serina foi adicionado à cultura e após 24 horas, as células foram fixadas, cortadas em 12 μm e imunomarcadas para BLBP (A, B). As imagens inseridas correspondem a marcação para DAPI. A análise da densitometria de cada esfera, mostrou que glutamato e D-serina induzem a expressão de BLBP (C). Em D, os níveis de RNAm para BLBP foram analisados por RT-PCR. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. Glutamato e D-serina modulam positivamente os níveis de BLBP em neuroesferas. Barras: 100 μm. \* p<0,05; \*\* p<0,01.

Desta forma, com o objetivo de analisar o papel dos neuromoduladores, glutamato e D-serina, na migração neuronal no córtex cerebral, utilizamos explantes de córtex cerebral de camundongos embrionários com 14 dias (E14). Estes explantes foram plaqueados em um tapete de laminina e tratados com 100 $\mu$ M de glutamato e/ou 500 $\mu$ M de D-serina por 48 horas. Após este período, medimos o raio de migração através das células mais distantes do explante. Como podemos observar na **Figura 11A-E**, nenhuma alteração na migração foi observada através desta metodologia.

Em média, a migração nos explantes de córtex cerebral foi de 100 $\mu$ m. Este raio de migração é bastante inferior ao atingido pelos explantes cerebelares (que varia de 350 a 400 $\mu$ m sem nenhum tratamento específico, de acordo com Eller et al., dados não publicados). Devido à pouca saída de células dos explantes de córtex cerebral, não podemos afirmar que os neuromoduladores não possuam ação na migração neuronal do córtex cerebral. Experimentos posteriores, utilizando outras metodologias, como o cultivo de fatias organotípicas, nos esclarecerão se este é um artefato da técnica ou se realmente em córtex cerebral, glutamato e/ou D-serina não são capazes de modular a migração neuronal.

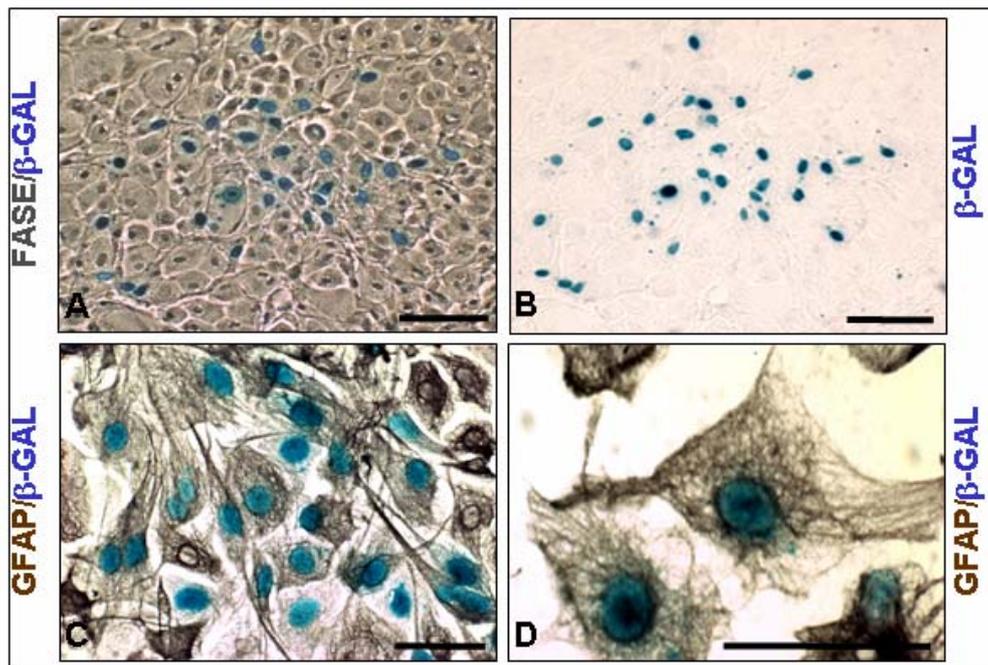


**Figura 11 – Ação de glutamato/D-serina na migração neuronal em explantes corticais.** Explantes de cerca de 1mm do córtex cerebral de camundongos suíços embrionários com 14 dias (E14) foram plaqueados sobre um tapete de laminina e tratados por 48 horas: meio sem soro (controle - **A**), 100µM glutamato (**B**), 500µM D-serina (**C**) ou ambos (**D**). O raio de migração foi medido através das células mais distantes do explante (**E**). Nenhuma diferença significativa foi observada. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. Barra: 100µm.

**PARTE 2: PAPEL DO GLUTAMATO NA MATURAÇÃO ASTROCITÁRIA ATRAVÉS DA VIAS DE TGF- $\beta$ 1 (OS RESULTADOS APRESENTADOS NESTA PARTE FORAM RECENTEMENTE PUBLICADOS, VIDE ANEXO1)**

**4.5. Ativação do transgene GFAP-*lacZ* em culturas astrocitárias**

Para verificar a expressão do gene *lacZ* regulado pelo promotor de GFAP, culturas confluentes primariamente astrocitárias derivadas de córtex cerebral de camundongos transgênicos foram incubadas com meio sem soro por 2 dias. Após esse período, foi feita a revelação da atividade de  $\beta$ -Gal e imunocitoquímica para GFAP. A atividade da  $\beta$ -Galactosidase pode ser detectada através da coloração azul nuclear resultante da reação com o substrato X-Gal (**Figura 12A-D**). Nestas condições, cerca de 95% das células na monocamada foram marcadas para GFAP representando um fenótipo tipicamente astrocitário (**Figura 12C e D**). Como pode ser observado, existem populações de astrócitos que são positivas para  $\beta$ -Gal e GFAP, e populações de astrócitos, negativas para  $\beta$ -Gal e positivas para GFAP. Tal fenômeno se deve, provavelmente, à heterogeneidade das subpopulações astrocitárias existentes na cultura. Como o transgene é constituído por parte do promotor do gene de GFAP, é possível que, em determinadas subpopulações de astrócitos, a expressão do gene de GFAP requeira o promotor na sua íntegra. É importante ressaltar que não foram observadas células positivas para  $\beta$ -Gal e negativas para GFAP, corroborando com os dados *in vivo* de que, nesta fase do desenvolvimento, a expressão do transgene é astrócito-específica (Galou et al., 1994) e, portanto se presta à análise quantitativa que propusemos. Estes resultados mostram que, *in vitro*, o promotor de GFAP está sendo ativado especificamente nas células que expressam GFAP.

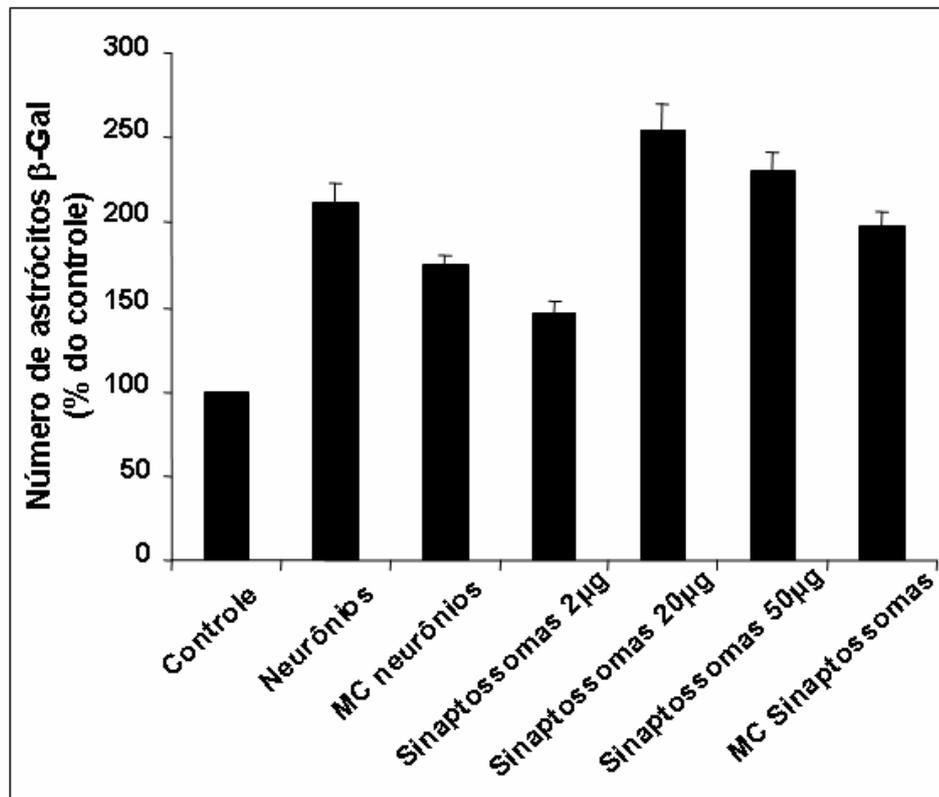


**Figura 12 – Expressão do gene repórter (*lacZ*) sob a regulação do promotor de GFAP *in vitro*.** Astrócitos derivados do córtex cerebral foram mantidos em cultura por 10 dias em meio com soro e mais 2 dias em meio sem soro. A expressão de  $\beta$ -Galactosidase foi revelada através do X-Gal (núcleo azul: **A-D**), previamente à imunocitoquímica para GFAP (marcação citoplasmática marrom: **C** e **D**). Notar que a grande maioria das células é marcada para GFAP, enquanto apenas uma subpopulação astrocitária é  $\beta$ -Gal-positiva. **B** mostra foto em campo claro da imagem em contraste de fase em **A**. Barras: 100 $\mu$ m (**A** e **B**) e 50 $\mu$ m (**C** e **D**).

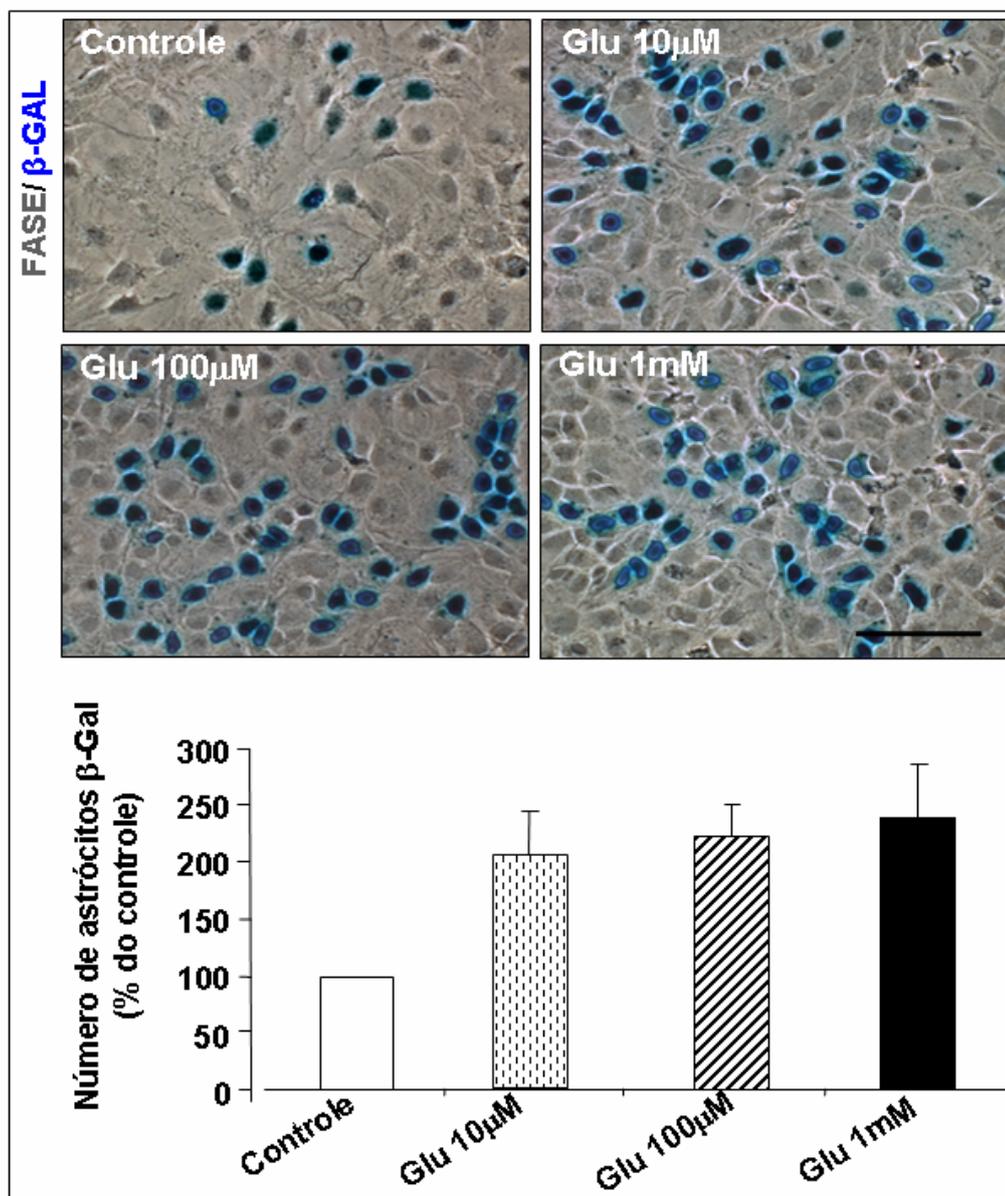
#### 4.6. Glutamato ativa o promotor de gene de GFAP de astrócitos transgênicos

Nosso grupo mostrou previamente que neurônios ativam o promotor do gene de GFAP de astrócitos corticais através da secreção de moléculas solúveis (Gomes et al., 1999a). Para avaliar se este efeito é devido a neurotransmissores, utilizamos um experimento com sinaptossomas, considerados uma ferramenta útil para o estudo do efeito de neurotransmissores (Dunkley et al., 1988). As terminações dos neurônios quando isoladas formam esferas (sinaptossomas) que conservam no seu interior os neurotransmissores presentes nos terminais sinápticos. Quando os astrócitos corticais, derivados do camundongo transgênico GFAP-*lacZ*, foram cultivados na presença de neurônios, sinaptossomas ou meio condicionado pelos sinaptossomas, observamos um aumento, em média, de 120% no número de astrócitos positivos para  $\beta$ -Gal (**Figura 13**), sugerindo a participação de neurotransmissores na ativação do promotor do gene de GFAP.

Um grupo de pesquisadores tem mostrado que o glutamato aumenta a produção de TGF- $\beta$ 1 em astrócitos (Bruno et al., 1998; Ciccarelli et al., 1997; Corti et al., 2007; Glowinski et al., 1994). Como nosso grupo mostrou a participação do TGF- $\beta$ 1 na ativação do promotor do gene de GFAP, imaginamos se o neurotransmissor presente nos sinaptossomas responsável pela ativação do gene de GFAP não seria o glutamato. Com este objetivo, as monocamadas astrocitárias foram tratadas com diferentes concentrações de glutamato (10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 1mM). Após 24 horas, observamos um aumento no número de astrócitos positivos para  $\beta$ -Gal em cerca de 125 a 150% (**Figura 14**). Nenhuma diferença significativa estatisticamente foi encontrada entre as três diferentes concentrações de glutamato. Estes resultados sugerem este neurotransmissor como um dos moduladores do gene de GFAP, conseqüentemente, da maturação astrocitária.



**Figura 13 – Sinaptossomas ativam o promotor do gene de GFAP em astrócitos transgênicos.** Astrócitos derivados do córtex cerebral de camundongos transgênicos recém-nascidos foram cultivados por 24 horas nas seguintes condições: sozinhos (controle) ou na presença de neurônios corticais embrionários, meio condicionado por neurônios, diferentes concentrações de sinaptossomas ou meio condicionado por sinaptossomas. Após a detecção da atividade da  $\beta$ -Gal, as células positivas para  $\beta$ -Gal foram quantificadas. Todos os grupos são estatisticamente diferentes do controle ( $p < 0,01$ ).



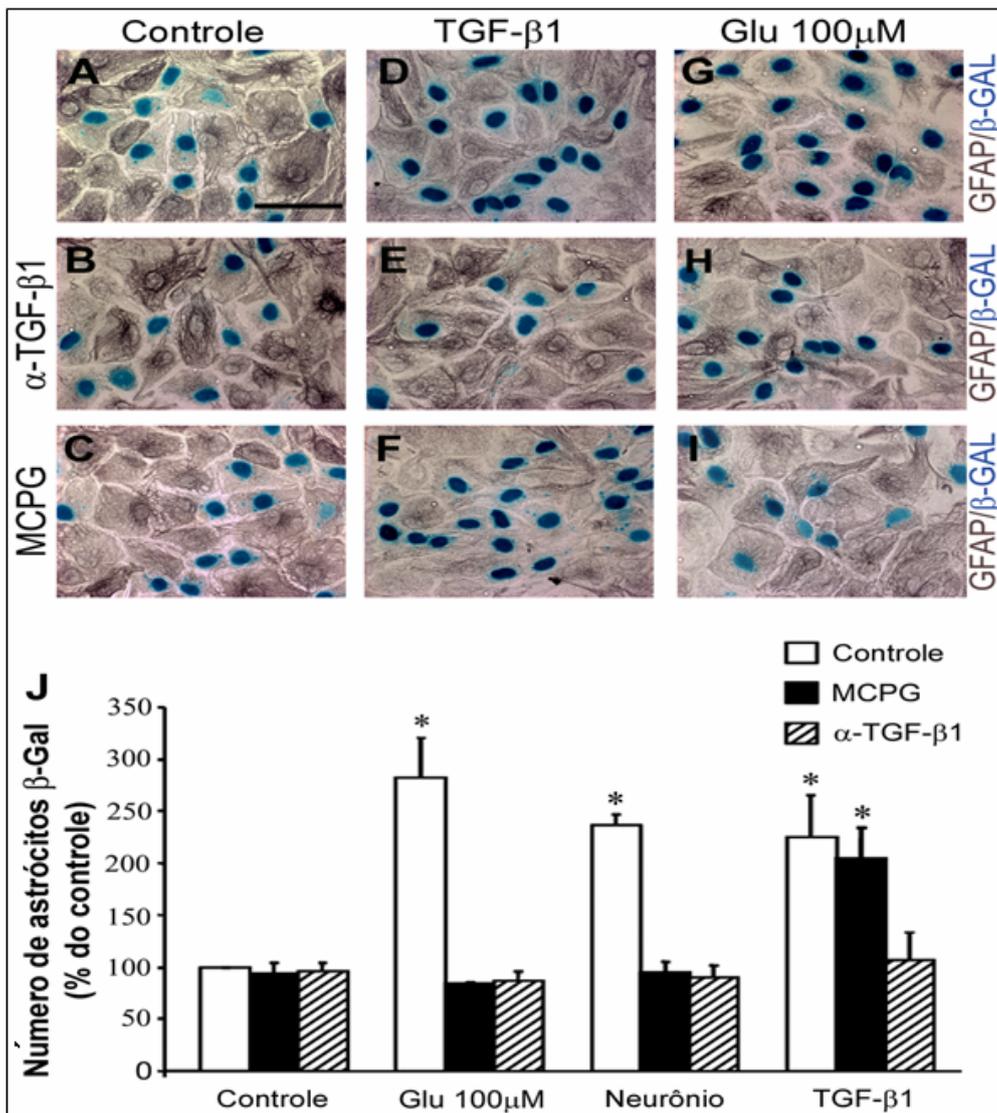
**Figura 14 – Indução do promotor do gene de GFAP por glutamato.** Astrócitos corticais de animais transgênicos neonatos foram cultivados sozinhos (Controle) ou na presença de diferentes concentrações de glutamato (Glu 10 $\mu$ M, Glu 100 $\mu$ M e Glu 1mM). Após 24 horas, o número de células  $\beta$ -Gal positivas foi quantificado. Nas três concentrações de glutamato, há indução do gene de GFAP. Todos os grupos são estatisticamente diferentes do controle e iguais entre si ( $p < 0,01$ ).

#### 4.7. Ativação do gene de GFAP é mediada por TGF- $\beta$ 1

A ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo II (mGlu2/3) induz a síntese e secreção de TGF- $\beta$ 1 em astrócitos (Bruno et al., 1998; Ciccarelli et al., 1997; Corti et al., 2007; Glowinski et al., 1994). Associado a isso, previamente demonstramos que a ativação do promotor do gene de GFAP por neurônios corticais é mediada pela secreção de TGF- $\beta$ 1 pelos astrócitos em resposta a moléculas solúveis neuronais. Nesta tese, analisamos o papel do TGF- $\beta$ 1 como mediador do efeito de glutamato sobre o gene de GFAP.

Para isso, astrócitos corticais de camundongos transgênicos foram cultivados sozinhos ou com 100 $\mu$ M de glutamato, neurônios corticais ou 10ng/mL de TGF- $\beta$ 1. Estes, como já descrito, ativam o promotor do gene de GFAP. Simultaneamente, adicionamos 10 $\mu$ g/mL de anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$ 1 ( $\alpha$ -TGF- $\beta$ 1) ou 500 $\mu$ M de antagonista dos receptores mGlu2/3 (MCPG), para boquear a ação do TGF- $\beta$ 1 e do glutamato, respectivamente. Depois de 24 horas, as células  $\beta$ -Gal positivas foram quantificadas. Glutamato, neurônios e TGF- $\beta$ 1 aumentaram o número de células  $\beta$ -Gal positivas (**Figura 15**). A adição do  $\alpha$ -TGF- $\beta$ 1 evitou este aumento (**Figura 15**), confirmando a participação direta deste fator na maturação astrocitária. Por outro lado, a adição do antagonista de receptor de glutamato, MCPG, evitou completamente a ação dos neurônios e do glutamato, embora não tenha inibido a ação do TGF- $\beta$ 1 na ativação do promotor do gene de GFAP (**Figura 15**).

Para confirmar que o TGF- $\beta$ 1 é um mediador do glutamato na ativação do gene de GFAP em astrócitos corticais, nós analisamos a translocação nuclear de Smad 4 em resposta ao glutamato, um marco da ativação da via de TGF- $\beta$ 1.

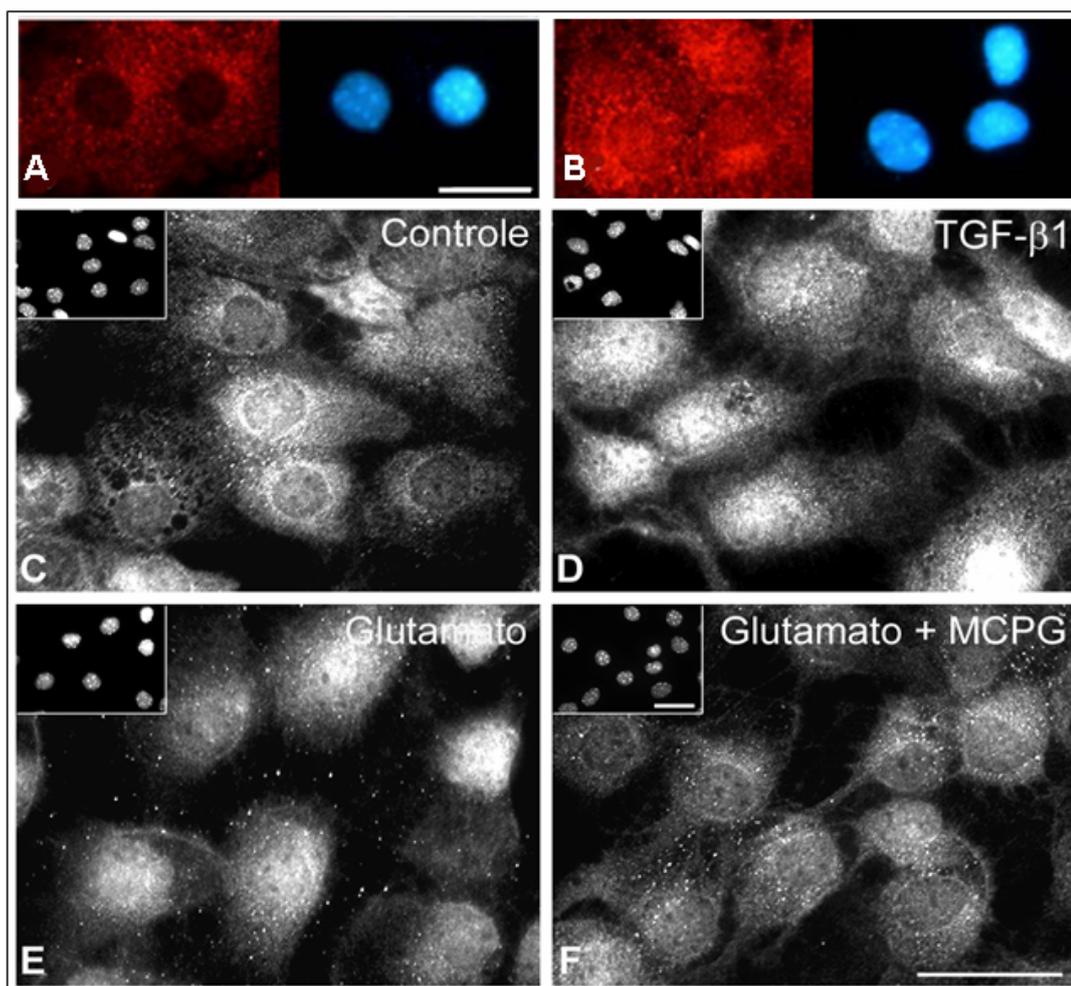


**Figura 15 – Ativação do gene de GFAP por glutamato é mediada por TGF-β1.** Astrócitos do córtex cerebral de animais transgênicos neonatos foram cultivados sozinhos (A-C) ou na presença de 10ng/ml de TGF-β1 (D-F), 100μM de glutamato (G-I) ou neurônios E14, na presença ou ausência de 10μg/ml de anticorpo neutralizante contra TGF-β1 (α-TGF-β1) ou 500μM de MCPG (antagonista de mGluR2/3). Depois de 24 horas, a atividade da β-Gal foi revelada (marcação azul) antes da imunocitoquímica para GFAP (marcação cinza) e o número de astrócitos β-Gal positivos foi analisado (J). \*p<0,001 (em comparação ao controle). Glutamato, neurônios e TGF-β1 aumentam o número de astrócitos β-Gal positivos. Este efeito é inibido na presença de α-TGF-β1 ou MCPG, com uma exceção: o MCPG não inibiu a ativação do gene de GFAP induzida por TGF-β1. Barra: 100μm.

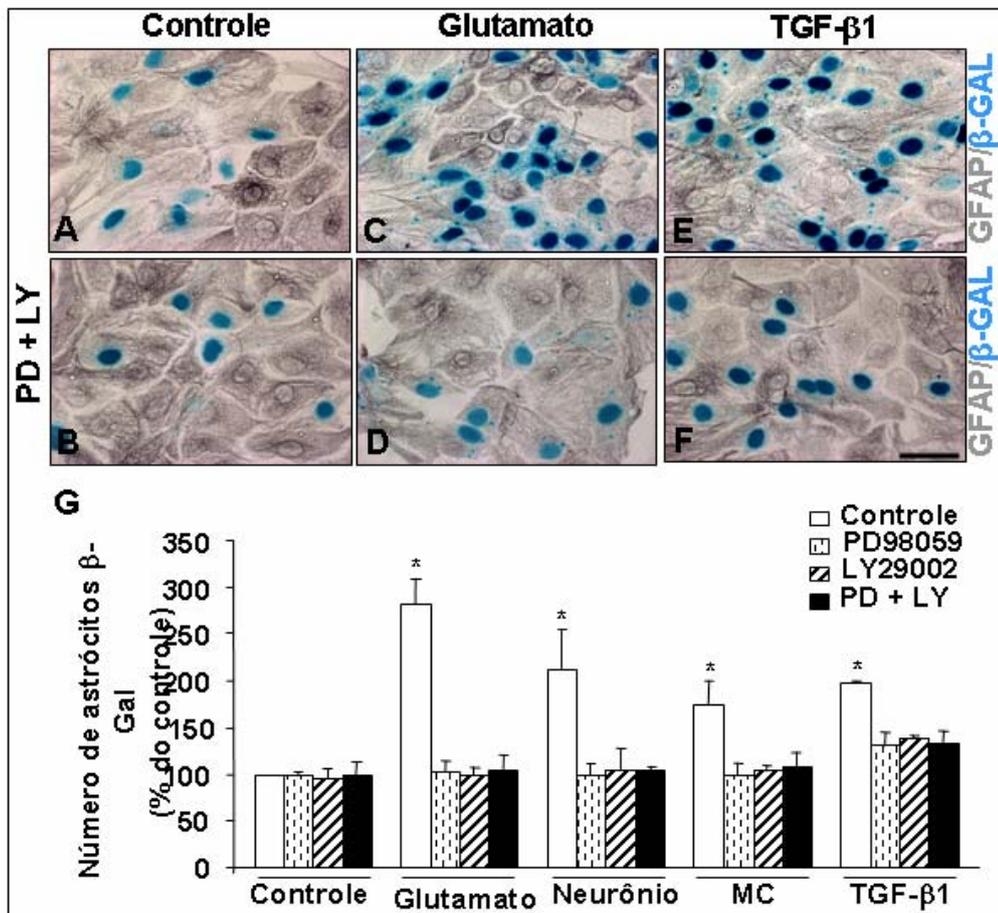
Como observado da **Figura 16A e C**, astrócitos na situação controle possuem uma marcação para Smad 4 predominantemente citoplasmática. O tratamento com TGF- $\beta$ 1 (**Figura 16B e D**) ou glutamato (**Figura 16E**) por 24 horas induz a translocação nuclear de Smad 4, mostrando que o glutamato ativa a via TGF- $\beta$ 1/Smad em astrócitos corticais. Além disso, adição de MCPG, antagonista do receptor de glutamato, impede a translocação de Smad 4 induzida por este (**Figura 16F**). Juntos, estes dados mostram o papel do TGF- $\beta$ 1 como um mediador do efeito de neurônios/glutamato na maturação astrocitária.

#### **4.8. Ativação do promotor do gene de GFAP envolve as vias de MAPK/PI3K**

A secreção de TGF- $\beta$ 1 por astrócitos é induzida por glutamato através da ativação de receptores mGlu pelas vias MAPK/PI3K (D'Onofrio et al., 2001). Desta forma, investigamos as vias de sinalização envolvidas na ativação do gene de GFAP utilizando inibidores de MAP e PI3K. Astrócitos corticais de animais transgênicos foram cultivados sozinhos ou com 100 $\mu$ M de glutamato, neurônios, meio condicionado (MC) de co-culturas ou 10ng/mL de TGF- $\beta$ 1, na presença ou ausência de 50 $\mu$ M de PD98059 (inibidor de MAPK) ou 5 $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) ou ambos. Como mostrado na **Figura 17**, neurônios, MC, glutamato e TGF- $\beta$ 1 aumentam o número de astrócitos positivos para  $\beta$ -Gal. A adição dos inibidores de MAPK e PI3K evita este aumento em todas as condições estudadas (**Figura 17**). Este dado é consistente com o dado prévio de que a indução da síntese e secreção de TGF- $\beta$ 1 por glutamato envolve as vias MAPK/PI3K (D'Onofrio et al., 2001). Adição destes inibidores não tem efeito na viabilidade das células, percebido pela integridade e número de células.



**Figura 16 – Ativação da via de TGF- $\beta$ 1 por glutamato.** Astrócitos do córtex cerebral de camundongos recém-natos foram cultivados sozinhos (A e C) ou na presença de 10ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (B e D), 100 $\mu$ M de glutamato (E) ou glutamato com 500 $\mu$ M de MCPG (antagonista de mGluR2/3) (F). Após 24 horas, a imunomarcagem para Smad 4 revelou uma localização citoplasmática no controle (A e C) e uma disposição nuclear após o tratamento com TGF- $\beta$ 1 (B e D) ou glutamato (E). Adição de MCPG impede a translocação nuclear de Smad 4 induzida por glutamato (F). As marcações em azul de A e B e as imagens inseridas (C-F) mostram a marcação nuclear por DAPI. Barras: 20 $\mu$ m (A) e 30 $\mu$ m (F)



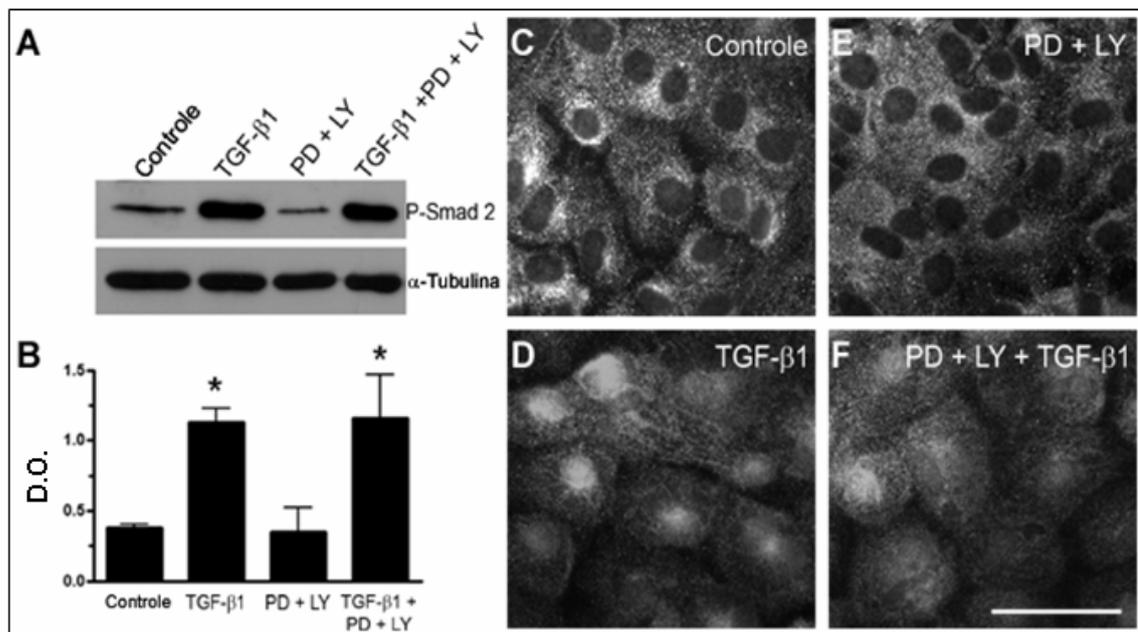
**Figura 17 – Ativação do gene de GFAP por glutamato ou TGF-β1 é mediada pelas vias de MAPK/PI3K.** Astrócitos do córtex cerebral de camundongos transgênicos neonatos foram cultivados sozinhos (A-B), na presença de 100μM de glutamato (C-D), neurônios, meio condicionado (MC), ou 10ng/ml de TGF-β1 (E-F); na presença (B, D e F) ou ausência (A, C e E) de PD98059 (50μM) + LY294002 (5μM). A atividade da β-Gal foi revelada (marcação azul) antes da imunocitoquímica para GFAP (marcação cinza). Após as 24 horas em cultura, o número de células positivas para β-Gal foi quantificada (G). \*p<0,001 (em comparação ao controle). Glutamato, neurônios, MC e TGF-β1 aumentam o número de astrócitos positivos para β-Gal. Adição dos inibidores de MAPK e PI3K impede a ativação do gene de GFAP por glutamato, neurônios (ou o MC) e TGF-β1. Barra: 50μm.

O promotor do gene de GFAP não foi ativado por TGF- $\beta$ 1 na presença destes inibidores, sugerindo a participação de MAPK/PI3K também na ação deste fator. Uma vez que foi mostrado que estas vias modulam a via de Smad (Derynck & Zhang, 2003; Dziembowska et al., 2007), nós investigamos se o efeito observado foi devido a um bloqueio secundário da via canônica (Smad) por estes inibidores. Nós analisamos os níveis de fosforilação de Smad 2 (P-Smad 2) por *Western blot*. O tratamento de astrócitos com 10ng/mL de TGF- $\beta$ 1 aumenta 2,8 vezes os níveis de P-Smad 2. Este aumento se manteve na presença de 50 $\mu$ M de PD98059 (inibidor de MAPK/ErK) ou 5 $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) (**Figura 18A e B**). Na ausência de TGF- $\beta$ 1, as vias MAPK/PI3K não alteram os níveis de P-Smad 2. Consistente com os dados do *Western blot*, o tratamento dos astrócitos com estes inibidores não bloqueou a translocação nuclear de Smad (**Figura 18C-F**), sugerindo que as vias de MAPK/PI3K não modulam a fosforilação de Smad 2 induzida por TGF- $\beta$ 1.

Estes dados revelam que a indução do gene de GFAP por glutamato/ TGF- $\beta$ 1 envolve as vias de MAPK/PI3K e que é possível que a via de Smad não esteja envolvida.

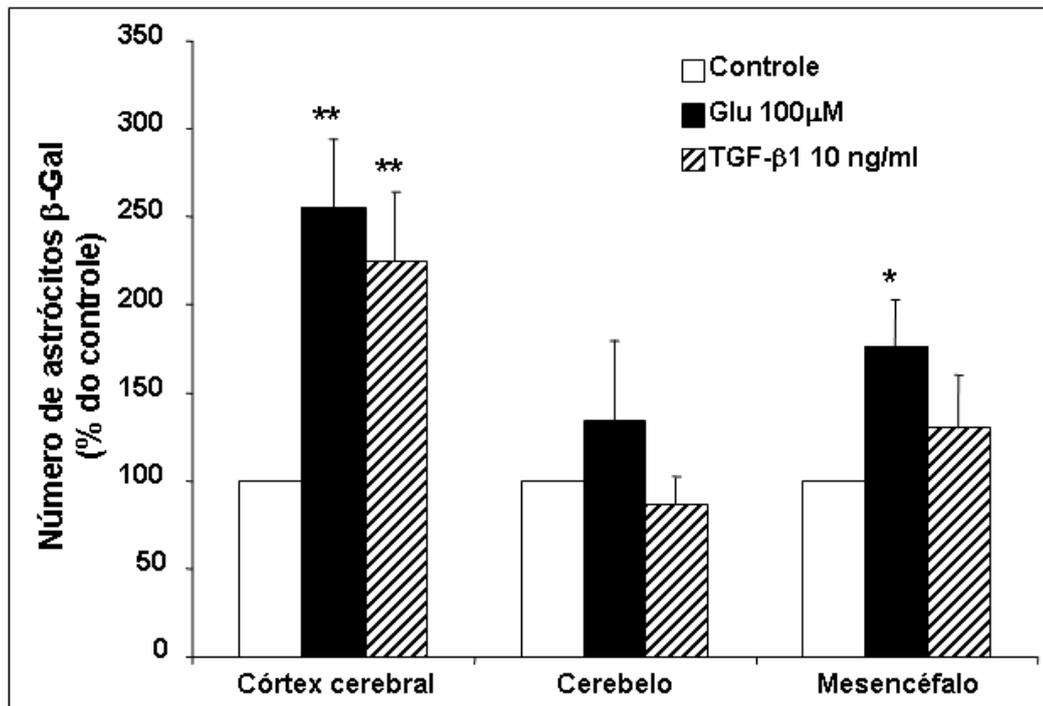
#### **4.9. O gene de GFAP é diferentemente modulado em regiões distintas do encéfalo**

Uma vez que mostramos anteriormente que a ativação do gene de GFAP por TGF- $\beta$ 1 é modulada diferentemente em regiões distintas do SNC (Sousa et al., 2004), nos perguntamos se haveria uma diferente modulação deste promotor pelo glutamato em diferentes regiões do encéfalo.



**Figura 18 – A fosforilação de Smad2 é independente das vias de MAPK/PI3K em astrócitos.** Astrócitos corticais de camundongos foram cultivados sozinhos (Controle) ou na presença de 10ng/ml de TGF- $\beta$ 1; 50 $\mu$ M de PD98059 + 5 $\mu$ M de LY294002 (PD + LY); ou simultaneamente na presença de ambos os inibidores + TGF- $\beta$ 1 (PD + LY + TGF- $\beta$ 1) por 30 minutos. *Western blot* representativo (A) e análise da densidade óptica (B) mostrando a fosforilação de Smad 2 (P-Smad 2). O nível de  $\alpha$ -Tubulina foi utilizado como controle de carregamento. A inibição da via não-canônica de TGF- $\beta$ 1, vias de MAPK/PI3K, não bloqueia a fosforilação de Smad 2 em resposta ao TGF- $\beta$ 1. \* $p < 0,05$  (em comparação ao controle). A imunomarcação para Smad 4 (C-F) revela uma localização citoplasmática no controle (C) e distribuição nuclear com TGF- $\beta$ 1 (D). A adição de PD + LY não afeta a translocação de Smad4 (E-F). Barra: 100 $\mu$ m.

Para responder a esta questão, astrócitos de córtex cerebral, cerebelo e mesencéfalo de camundongos transgênicos recém-natos foram cultivados sozinhos ou na presença de 100 $\mu$ M de glutamato ou 10ng/mL de TGF- $\beta$ 1 por 24 horas. Glutamato e TGF- $\beta$ 1, que aumentam o número de astrócitos positivos para  $\beta$ -Gal em córtex cerebral, como já previamente descrito, não tiveram nenhum efeito sobre astrócitos cerebelares, e somente o glutamato teve efeito sobre os astrócitos mesencefálicos (75% de aumento de astrócitos positivos para  $\beta$ -Gal) (**Figura 19**). Estes resultados demonstram que o gene de GFAP é, também, diferentemente modulado pelo glutamato em diferentes regiões encefálicas.



**Figura 19 – Genes de GFAP de regiões encefálicas distintas são diferentemente modulados por glutamato.** Astrócitos de córtex cerebral, cerebelo e mesencéfalo de camundongos transgênicos neonatos foram cultivados sozinhos (controle), na presença de 100μM de glutamato ou 10ng/ml de TGF-β1 por 24 horas. Após a detecção da atividade de β-Gal, as células marcadas foram quantificadas. \*p<0,05; \*\*p<0,01 (em comparação ao controle). Glutamato e TGF-β1 afetam de forma diferente as subpopulações astrocitárias. Ambos ativam o gene de GFAP no córtex cerebral, nenhum deles possui efeito no cerebelo e somente o glutamato age no mesencéfalo.

## 5. DISCUSSÃO

---

Nosso grupo tem contribuído para o melhor entendimento das interações celulares durante o desenvolvimento do SNC mostrando o papel de neurônios na diferenciação astrocitária. Demonstramos que neurônios corticais induzem a secreção de TGF- $\beta$ 1 por astrócitos, resultando na ativação do promotor de GFAP (de Sampaio e Spohr et al., 2002). Minha dissertação de mestrado investigou este evento em outras regiões do SNC e em diferentes idades no córtex cerebral. Nós relatamos que a influência neuronal na diferenciação astrocitária, no que diz respeito à expressão de GFAP, é regionalmente modulada, sugerindo que os mecanismos de ativação do gene de GFAP e a diferenciação astrocitária diferem ao longo do SNC (Sousa et al., 2004).

Esta tese apresenta uma complementação a este trabalho que vem sendo desenvolvido em nosso laboratório desde o final da década de 90, trazendo maior riqueza e compreensão aos mecanismos envolvendo o desenvolvimento do córtex cerebral, como a especificação de um tipo celular considerado como “as progenitoras do SNC”, as células da GR e, posteriormente, na maturação dos astrócitos, tão importantes para o funcionamento adequado do SNC.

Mostramos aqui, a participação do neurotransmissor glutamato em etapas do desenvolvimento do córtex cerebral. Inicialmente, demonstramos que glutamato e o co-agonista de NMDARs, D-serina, influenciam o fenótipo de GR em culturas de progenitores (culturas enriquecidas em GR e neuroesferas). A adição de glutamato e D-serina em culturas de córtex cerebral embrionário induzem os progenitores a assumirem uma morfologia radializada e aumentam o número de células positivas para BLBP. Em neuroesferas, glutamato e D-serina aumentam a expressão e os

níveis de BLBP. Estes dados sugerem a participação destes neuromoduladores na especificação e manutenção da GR no embrião num período em que estas células são importantes para a migração e formação do córtex cerebral.

Posteriormente, mostramos a participação do glutamato, agora através dos receptores metabotrópicos do grupo II, na maturação astrocitária. Utilizamos um modelo de interação neurônio-glia com cultura de astrócitos derivados de camundongos transgênicos recém-natos. Esses animais contêm o gene da enzima bacteriana  $\beta$ -Galactosidase sob a regulação de parte do promotor do gene de GFAP. Nessas condições, a grande maioria das células expressa GFAP embora apenas uma subpopulação expresse  $\beta$ -Gal. O fato de encontrarmos células positivas para GFAP e negativas para  $\beta$ -Gal deve-se provavelmente ao fato de que as culturas são formadas por células heterogêneas. É possível que as células positivas para GFAP e negativas para  $\beta$ -Gal requeiram o promotor de GFAP íntegro para a transcrição do gene repórter. Como já foi mencionado, o camundongo com o qual trabalhamos possui somente parte do promotor de GFAP regulando o gene da enzima bacteriana  $\beta$ -Galactosidase (Galou et al., 1994). É importante ressaltar que não observamos em nossas culturas, células positivas para  $\beta$ -Gal e negativas para GFAP reiterando a especificidade astrocitária do transgene. Demonstramos que o glutamato ativa o promotor de gene de GFAP em astrócitos do córtex cerebral através da secreção de TGF- $\beta$ 1 pelos próprios astrócitos, com a participação das vias de MAPK/PI3K. Além disso, a ativação direta do gene de GFAP induzida por TGF- $\beta$ 1 envolve as vias não-canônicas de MAPK/PI3K e possivelmente a via canônica de Smad. Este evento é específico de certas regiões, uma vez que a modulação do gene de GFAP por glutamato ocorre de forma diferente em regiões encefálicas distintas, confirmando a heterogeneidade glial, já mostrada em minha dissertação de mestrado.

## **PARTE 1: PAPEL DO GLUTAMATO E DA D-SERINA NA ESPECIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DE GR NO CÓRTEX CEREBRAL**

O modelo sináptico onde ocorre a transmissão da informação entre dois neurônios, através dos neurotransmissores liberados do terminal pré-sináptico, vem sendo revisado em razão dos recentes achados envolvendo o papel das células gliais como terceiro elemento das sinapses químicas (Volterra & Meldolesi, 2005; Haydon & Carmignoto, 2006). De acordo com este novo modelo, as células gliais percebem a atividade sináptica através de uma ampla variedade de receptores presentes na sua superfície (Porter & McCarthy, 1997; Verkhratsky & Steinhauser, 2000). A ativação sináptica das células gliais dispara vias intracelulares de segundo mensageiros, incluindo aumento de  $Ca^{2+}$  (Araque et al., 2002; Perea & Araque, 2005). A ativação destas vias induz a liberação de substâncias ativas denominadas gliotransmissores, em analogia aos neurotransmissores, mediando a sinalização astrócito-neurônio (Volterra & Meldolesi, 2005).

Um gliotransmissor que possui um importante papel no SNC é a D-serina (Martineau et al., 2006; Miller, 2004; Mustafa et al., 2004). O papel modulatório da D-serina nos receptores NMDA ocorre mesmo antes do estabelecimento dos contatos sinápticos (para revisão vide Oliet & Mothet, 2008).

A localização da D-serina no encéfalo é heterogênea com altas concentrações no telencéfalo e cerebelo em desenvolvimento (Hashimoto et al., 1995). Análise detalhada da marcação para D-serina mostra que esta está presente em astrócitos em envolvem as sinapses (Schell et al., 1997). No cerebelo em desenvolvimento, D-serina está localizada na glia de Bergmann, mas os níveis vão diminuindo até a fase adulta (Schell et al., 1997). Além das células de origem astrocitária, D-serina está presente em microglia e em células de Schwann (Williams

et al., 2006; Wu et al., 2004a, b). Contudo, a D-serina não está confinada à glia, mas tem sido observada em neurônios do córtex cerebral, do tronco encefálico e do bulbo olfatório (Kartvelishvily et al., 2006; Williams et al., 2006; Yasuda et al., 2001).

A produção da D-serina, resulta da atividade da Serina Racemase (SR), enzima que converte L-serina em D-serina (Mustafa et al., 2004). A distribuição da SR é parecida com a da D-serina. Níveis elevados desta enzima são encontrados no hipocampo e corpo caloso, e em menor quantidade, na amígdala, núcleo subtalâmico e tálamo (De Miranda et al., 2000; Wolosker et al., 1999b; Xia et al., 2004). Assim como a D-serina, a SR está presente em astrócitos, mas evidências recentes sugerem que os neurônios são fontes de serina no encéfalo (Kartvelishvily et al., 2006; Williams et al., 2006).

Nesta tese, mostramos a presença de SR em células de GR em cultura, assim como suas expressões em células progenitoras cultivadas como neuroesferas. Esta enzima já foi mostrada em um tipo de GR na retina, a glia de Muller (Stevens et al., 2003). Além disso, a presença de D-serina na glia de Bergmann no cerebelo durante o período migratório (Schell et al., 1997), período em que estas células têm a mesma função da GR no córtex cerebral, o de orientar a migração neuronal, indica a presença da enzima SR também na glia de Bergmann. Estes trabalhos suportam os nossos dados que indicam que a SR é expressa pela GR no córtex cerebral. Experimentos futuros de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) deverão analisar a funcionalidade desta enzima através da detecção de D-serina no meio condicionado (MC) pelas neuroesferas, após o tratamento com L-serina. Como as culturas enriquecidas em GR não são puras, contendo neurônios, e estes expressam SR, este experimento não pôde ser

realizado nestas culturas, pois isto nos impossibilitaria afirmar que a D-serina presente no MC da cultura é proveniente da GR, e não de outro tipo celular.

Os NMDARs estão relacionados com a proliferação de progenitores neurais. Experimentos *in vitro* mostram que estes receptores induzem a proliferação em neuroesferas humanas e murinas (Mochizuki et al., 2007; Suzuki et al., 2006) e em culturas de células progenitoras do *striatum* (Luk et al., 2003). Estes dados mostram que o NMDAR é importante para manutenção de um grupo de progenitores, uma vez que aumenta a proliferação. Entretanto, em nosso modelo experimental, a adição de glutamato e D-serina não alterou a proliferação dos precursores. Como tem sido proposto que existem diferentes tipos de progenitores no SNC (como as células neuroepiteliais, os progenitores basais, as células da GR; para revisão veja Malatesta et al., 2008), imaginamos se a modulação da proliferação não ocorra em um grupo específico de progenitores, e que em cultura este grupo esteja reduzido a ponto de não percebermos uma alteração significativa após o tratamento.

Na presente tese, mostramos pela primeira vez o papel de glutamato e D-serina na especificação das células de GR.

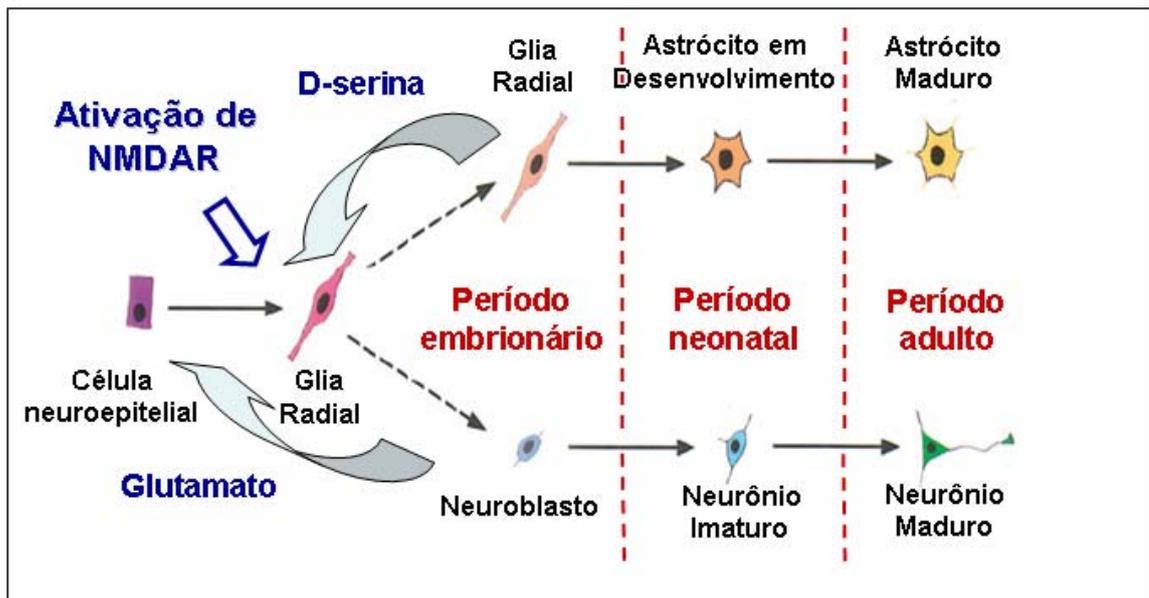
O fato das subunidades do NMDAR serem expressas no córtex cerebral no período embrionário (Sun et al., 1998; Takai et al., 2003; Watanabe et al., 1993), fase em que as células de GR têm sido identificadas como progenitoras nesta região, sugere que elas podem ser alvo destes aminoácidos que ativam os NMDARs.

Mostramos que o glutamato e a D-serina induzem a expressão de BLBP em cultura mista do córtex cerebral de camundongos embrionários e em cultura de progenitores sob a forma de neuroesferas. Além disso, mostramos que, em cultura,

estes transmissores induzem a radialização dos progenitores positivos para nestina. Este dado é consistente com os resultados de Suzuki e colaboradores (2006) que mostraram que o glutamato aumenta o número de células alongadas após a dissociação de neuroesferas derivadas de córtex fetal humano. Um grupo mostrou a participação de Notch na radialização das células de GR (Gaiano et al., 2000; Gaiano & Fishell, 2002). Posteriormente, Anthony e colaboradores (2005) identificaram no gene de BLBP, um sítio de ligação de CBF1, um membro da via de Notch. Além disso, os níveis de BLBP são significativamente reduzidos na ausência dos receptores de Notch, mostrando o papel desta molécula indutora da radialização na expressão de BLBP (Anthony et al., 2005). Estes dados mostram uma relação entre a radialização e a expressão de BLBP, assim como mostramos que glutamato e D-serina induzem ambos, radialização dos progenitores e expressão de BLBP.

A radialização dos progenitores é importante durante o processo de formação do SNC. No início do desenvolvimento, o SNC consiste do tubo neural, que é composto basicamente pelas células neuroepiteliais que formam uma camada pseudoestratificada. Durante esses estágios iniciais do desenvolvimento neural, as células dividem rapidamente. Os primeiros neurônios aparecem e começam um processo migratório que é facilitado pela fina camada de células, sendo suficiente a translocação do corpo celular. Com o espessamento do tecido nervoso, os neurônios utilizam as fibras das células de GR como guias para orientá-los no percurso (Ghashghaei et al., 2007). Sem os prolongamentos radiais, a migração neuronal e, conseqüentemente, a laminação do córtex cerebral e de outras regiões, fica prejudicada. Sabemos que a GR origina neurônios e glia após o período migratório. Existe a hipótese de que haja um balanço entre moléculas que induziriam a diferenciação e outras que participariam na manutenção da GR. No início do

desenvolvimento, diversas moléculas possuem o importante papel de manter as células de GR indiferenciadas, como *Notch*, Neuregulina1, Wnt e meteorina (Ever & Gaiano, 2005; Gaiano et al., 2000; Ghashghaei et al., 2008; Nishino et al., 2004; Schmid et al., 2003; Zhou et al., 2004). Por outro lado, mais tarde no desenvolvimento, a ativação da via Jak-STAT por alguns fatores (Barnabé-Heider et al., 2005; Bonni et al., 1997) e da via de Smad por TGF- $\beta$  (Stipursky & Gomes, 2007), promovem a especificação glial. Embora estes eventos pareçam ocorrer separadamente, é proposta a idéia de que todas estas vias interajam em um dado momento chave do desenvolvimento do SNC, promovendo uma troca das fases progenitora-neuronal-glial. O balanço destas vias, fatores de transcrição, assim como mecanismos genéticos, controlam o tempo de neurogênese e gliogênese (para revisão veja Miller & Gauthier, 2007). Desta forma, este trabalho vem somar a este tão rico e interessante modelo, moléculas que têm ganhado cada vez mais importância no mundo na neurociência, os neuro e gliotransmissores. Sugerimos aqui, a participação do glutamato e da D-serina na manutenção da GR neste período crítico, onde os neurônios precisam destas células para atingir seu local adequado à formação dos circuitos (**Figura 20**).



**Figura 20 – Participação de glutamato e D-serina na transição das células neuroepiteliais para GR.** A GR, formada a partir das células neuroepiteliais, podem originar inicialmente neurônios e, mais tardiamente, células gliais. A transição das células NE para GR parece ser modulada pela ativação dos receptores NMDA por glutamato e D-serina (modificado de Hall et al., 2003).

Durante o processo migratório, neurônios imaturos são influenciados por fatores extrínsecos, secretados pela GR, que modulam sua jornada. Entre estes fatores, tem sido mostrado o papel dos transmissores. Mais notadamente o glutamato, agindo nos receptores NMDA, tem um efeito modulatório positivo nos neuroblastos migratórios (Komuro & Racik, 1993; Yacubova & Komuro, 2003). A participação dos receptores NMDA na migração radial das células granulares imaturas no cerebelo em desenvolvimento, através das fibras da glia de Bergmann, já está bem caracterizado. O bloqueio dos receptores NMDA presentes nas células granulares diminui a taxa de migração. Adicionalmente, o movimento das células granulares é aumentado pela remoção de  $Mg^{2+}$  ou pela aplicação de NMDA ou o co-agonista glicina (Yacubova & Komuro, 2003). Como os neurônios migratórios ainda não formam sinapses antes de completar o percurso até a camada granular interna, foi proposta a hipótese que o glutamato liberado pela glia de Bergmann ativa receptores NMDA imaturos de forma parácrina, e não-sináptica (Yacubova & Komuro, 2003). Como o pico dos níveis de D-serina ocorre ao mesmo tempo do pico de migração das células granulares (Shell et al., 1997) e devido a indispensável presença do co-agonista para a ativação dos receptores NMDA, foi pensado se a D-serina não estaria envolvida neste processo.

Kim e colaboradores (2005) mostraram que a D-serina, liberada pela glia de Bergmann, promove a migração das células granulares através da ativação dos receptores NMDA.

No cérebro, não existem dados relacionando diretamente a D-serina com a migração neuronal. Pode-se sugerir a participação da mesma devido aos estudos com NMDAR. Inicialmente, dois grupos que relacionaram NMDAR com a migração no córtex cerebral, utilizando animais com uma mutação nestes receptores,

observaram a manutenção da estrutura do córtex, sugerindo que a migração neuronal ocorra sem maiores alterações (Kutsuwada et al., 1996, Messersmith et al., 1997). Entretanto, um estudo em hamsters recém-natos, revelou um possível papel inibitório dos NMDARs, uma vez que a estimulação de NMDAR perturba a migração neuronal (Marret et al., 1996). Contudo, os trabalhos mais recentes têm concordado que os NMDARs modulem positivamente a migração no córtex cerebral. Hirai e colaboradores (1999) relataram que em ratos embrionários, o bloqueio de NMDAR inibe a migração neuronal. No mesmo ano, Behar e colaboradores (1999) mostraram a presença de glutamato no córtex embrionário de camundongos e sugeriram que este neurotransmissor seja um fator quimioatratante para neurônios migratórios, sinalizando através dos NMDARs. Em 2005, foi mais uma vez mostrado que os NMDARs induzem a migração no córtex cerebral (Reiprich et al., 2005).

Embora não tenhamos observado diferença significativa na migração quando adicionamos glutamato e/ou D-serina, não podemos descartar a influência destes transmissores nesta etapa do desenvolvimento do córtex cerebral. Uma forte possibilidade é que a técnica utilizada não seja adequada para esta análise nesta região encefálica. Observamos um baixo rendimento na migração. As células migram em um raio de apenas 100 $\mu$ m, mesmo no controle. Este dado contrasta com os explantes de cerebelo, onde muitas células saem do explante e migram cerca de 400 $\mu$ m, sem nenhum tratamento específico (Eller et al., dados não publicados). Desta forma, não podemos excluir a possibilidade da modulação da migração por NMDAR. Além disso, nosso trabalho sugere que o glutamato e a D-serina ajam induzindo a migração no córtex cerebral, assim como no cerebelo, devido à indução da radialização dos progenitores neurais em cultura e da expressão de BLBP, um marcador de GR.

## **PARTE 2: PAPEL DO GLUTAMATO NA MATURAÇÃO ASTROCITÁRIA ATRAVÉS DA VIAS DE TGF- $\beta$ 1**

Nós demonstramos pela primeira vez o papel do glutamato na ativação do promotor do gene de GFAP através da indução da via de sinalização de TGF- $\beta$ 1. Este trabalho fornece uma forte evidência que os astrócitos associados às sinapses, além de controlar a função sináptica, são alvos da atividade neuronal.

Nesta tese, mostramos que os neurônios ativam o promotor do gene de GFAP e induzem a maturação astrocitária através do TGF- $\beta$ 1, inicialmente, pela ativação dos receptores metabotrópicos do grupo II (mGluR2/3). Nossos resultados são consistentes com os dados prévios que 1) a ativação de mGluR2/3 em astrócitos leva ao aumento da produção e liberação de TGF- $\beta$ 1 em astrócitos (Bruno et al., 1998; Corti et al., 2007); 2) os neurotransmissores podem modular a morfologia astrocitária e a expressão de GFAP (Matsutani & Yamamoto, 1997; Runquist & Alonso, 2003); e 3) a ativação de mGluR2/3 em culturas de células-tronco induz o aparecimento de células marcadas para GFAP (Ciceroni et al., 2006).

O fato dos receptores metabotrópicos (mGluR2/3) serem expressos no encéfalo ao nascimento (período de pronunciada astrogliogênese) (Catania et al., 1994) suporta a hipótese de que glutamato/TGF- $\beta$ 1 sejam importantes para a maturação astrocitária.

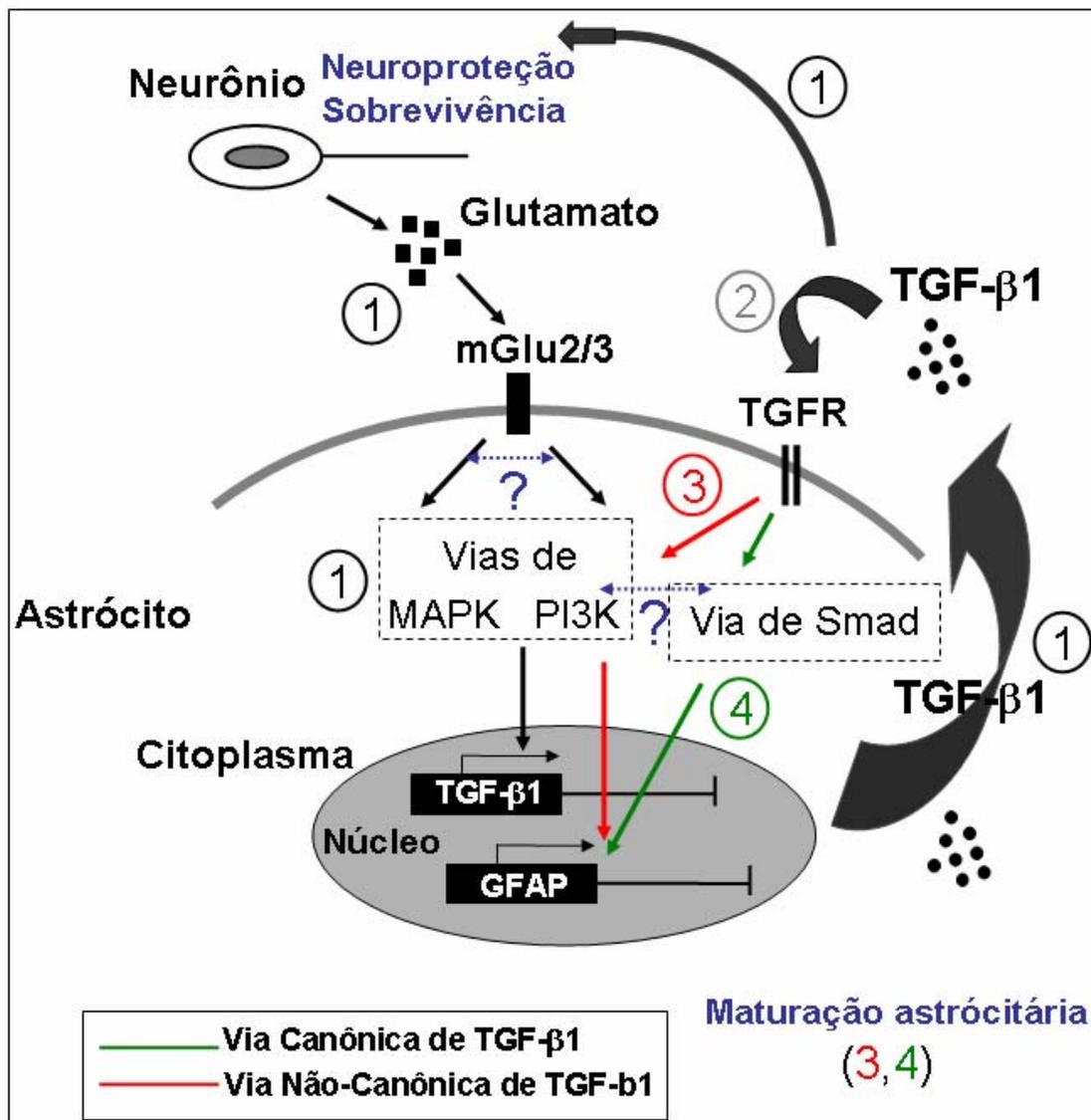
Esta interrelação GFAP-glutamato pode ser observada, embora de outra maneira, em artigos que correlacionam a importância do GFAP para os transportadores de glutamato. Sullivan e colaboradores (2007) demonstraram que a expressão de GFAP é essencial para ancorar o transportador de glutamato GLAST na membrana plasmática astrocitária. Além disso, camundongos que não expressam GFAP apresentam um *clearance* diminuído de glutamato (Hughes et al., 2004).

A sinalização de TGF- $\beta$ 1 é mediada principalmente por dois receptores serina/treonina cinases, TGFRI e TGFRII, que ativam os fatores de transcrição Smad 2/3 e Smad 4. A fosforilação e ativação destas proteínas é seguida pela formação do complexo Smad 2/3 com Smad 4, que transloca para o núcleo regulando as respostas de TGF- $\beta$  (Shi & Massagué, 2003). Nós mostramos que o glutamato induz a translocação nuclear de Smad em astrócitos corticais. Adição de inibidores específicos das vias de MAPK/PI3K evita a ativação do gene de GFAP e a translocação nuclear de Smad induzidas pelo TGF- $\beta$ 1, o que corrobora o dado prévio de que a síntese e secreção de TGF- $\beta$ 1 em resposta à ativação dos mGluR2/3 são mediadas pelas vias de MAPK/PI3K (Corti et al., 2007; D'Onofrio et al., 2001). Do mesmo modo, estes inibidores impediram a ação do TGF- $\beta$ 1, mostrando que estas vias não-canônicas estão envolvidas na ativação do promotor do gene de GFAP. O fato da administração dos inibidores sozinhos ser suficiente para abolir o efeito de TGF- $\beta$ 1 e a adição concomitante não ter uma inibição aditiva, nos direciona a pensar que as vias MAPK e PI3K são convergentes e não independentes (**Figura 21**).

Como nosso grupo mostrou previamente que o TGF- $\beta$ 1 induz a ativação da via de Smad em GR e em astrócitos (Stipursky & Gomes, 2007), imaginamos se a ativação do gene de GFAP não seria modulada por uma interação entre as vias de Smad e MAPK/PI3K (Derynck & Zhang, 2003). Estas vias têm sido relacionadas em células de glioblastoma humano, onde a inibição de p38, uma MAPK, diminui a fosforilação de Smad 2 (Dziembowska et al., 2007). No entanto, nossos dados mostram que em astrócitos, a inibição de MAPK/ErK1/2 e PI3K não altera a fosforilação de Smad 2. Como a inibição da via não-canônica inibe completamente o efeito do TGF- $\beta$ 1, podemos sugerir duas hipóteses: 1) a via canônica (Smad)

sozinha não é suficiente para ativar o promotor do gene de GFAP ou 2) a via canônica não está envolvida diretamente na ativação do promotor do gene de GFAP em astrócitos (**Figura 21**).

Alguns autores têm sugerido que o efeito de Smad no promotor do gene de GFAP seja resultado de uma cooperação entre Smad e outras moléculas tais como STAT (Li & Grumet, 2007; Nakashima et al., 1999). Contudo, o complexo Smad liga-se a uma seqüência no DNA que contem um domínio de no mínimo quatro nucleotídeos, AGAC, também chamado de 'CAGA' box (Massagué, 2000). Este domínio ainda não foi identificado no promotor do gene de GFAP. Assim, ainda torna-se necessário analisar se a via de Smad está realmente participando na ativação deste promotor específico. Para isso, seriam necessários experimentos que bloqueassem especificamente a via canônica de TGF- $\beta$ 1, como a utilização de RNAi (RNA interferência) para Smad 2/3, que impediria a expressão de Smad 2/3, parando a via de sinalização. Ou até mesmo, a superexpressão de um tipo específico de Smad que inibe a via canônica, a Smad 7.



**Figura 21 – Participação das vias de sinalização de glutamato e TGF-β1 na ativação do gene de GFAP.** A maturação astrocitária induzida pelo glutamato é mediada pelos receptores metabotrópicos do grupo II (mGluR2/3) e requer a produção de TGF-β1 pelos astrócitos. Através da ativação das vias de MAPK/ PI3K, o glutamato aumenta a produção e a liberação de TGF-β1 pelos astrócitos, que protege os neurônios vizinhos da toxicidade do glutamato (1). Adicionalmente, depois de ligar ao seu receptor, TGFR (2), o TGF-β1 ativa o gene de GFAP e induz a maturação astrocitária através da via não-canônica (3) de TGF-β1, podendo ter a participação da via canônica de Smads (4).

Nós relatamos aqui que astrócitos de diferentes regiões encefálicas apresentam respostas distintas em relação ao glutamato. Nossos dados prévios mostram que neurônios corticais não ativam o promotor do gene de GFAP de astrócitos transgênicos derivados do cerebelo e do mesencéfalo, embora eles induzam a síntese de TGF- $\beta$ 1 por estas células (Sousa et al., 2004). O fato dos astrócitos cerebelares não responderem ao glutamato, em relação à ativação do gene de GFAP, corrobora o papel do TGF- $\beta$ 1 como mediador do glutamato uma vez que já havíamos mostrado que o TGF- $\beta$ 1 não modula a expressão de GFAP nestas células (Sousa et al., 2004). Contudo, embora o TGF- $\beta$ 1 não module o gene de GFAP em astrócitos mesencefálicos, glutamato o faz. Isto pode ocorrer se o glutamato estiver modulando a síntese de outros fatores no mesencéfalo e não do TGF- $\beta$ 1 especificamente, como ocorre no cérebro.

Trabalhos anteriores fornecem evidências de que a sinalização por glutamato é específica para cada região encefálica (Regan et al., 2007; Schlüler et al., 2002). Além disso, a expressão dos subtipos de receptores metabotrópicos apresenta um perfil regional e temporal distinto, o que pode contribuir para a diversidade da ação glutamatérgica encontrada no encéfalo (Porter & McCarthy, 1997).

Diversos trabalhos já têm mostrado que os astrócitos não são um tipo celular uniforme em todo sistema nervoso. Tem sido mostrado que subpopulações astrocitárias distintas podem responder diferentemente a fatores externos e ainda, astrócitos de regiões diferentes podem influenciar distintamente o desenvolvimento neuronal.

(1) Existem diferença entre astrócitos de regiões encefálicas e de medula espinhal. Song e colaboradores (2002) mostraram que astrócitos hipocampais de

ratos adultos, mas não os derivados da medula, eram capazes de induzir a neurogênese a partir de células-tronco adultas.

(2) *In vitro*, astrócitos de diferentes regiões encefálicas respondem de maneira diferente a FGF-5 e FGF-9. Ambos os fatores estão envolvidos na regulação da expressão de conexina 43 e conseqüentemente na modulação das comunicações *gap junction* em astrócitos. FGF-9 induz uma diminuição na expressão de conexina 43 em astrócitos corticais, estriatais e mesencefálicos, todavia, FGF-5 tem ação somente sobre os astrócitos do mesencéfalo (Reuss et al., 2000). O polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitário (PACAP: *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), TGF- $\alpha$  e EGF estimulam a expressão de transportadores de glutamato em astrócitos de corpo estriado e do córtex cerebral, mas não alteram a expressão destes transportadores em astrócitos derivados do cerebelo, mesencéfalo e medula espinhal (Schlüter et al., 2002).

(3) Além das divergências entre as regiões encefálicas, há ainda diferenças dentro de uma mesma região. Neurônios mesencefálicos plaqueados sobre uma monocamada astrocitária derivada da região lateral do mesencéfalo embrionário desenvolvem neuritos longos e ramificados. Enquanto que, os neurônios plaqueados sobre astrócitos derivados da região medial mesencefálica, desenvolvem neuritos curtos ou nenhum neurito (Garcia-Abreu et al., 1995). Dados sugerem que esta diferença no suporte do crescimento neurítico seja devida à expressão distinta de glicosaminoglicanas por estas células, sendo a glia mesencefálica lateral mais permissiva ao crescimento neurítico devido à maior expressão de condroitin sulfato (Mendes et al., 2003). Corroborando a idéia de heterogeneidade astrocitária dentro de uma mesma região encefálica, Matthias e colaboradores (2003) descreveram a

coexistência de tipos astrocitários no hipocampo de camundongos com propriedades morfológicas, moleculares e funcionais distintas.

Nossos dados contribuem fortemente para o conceito de heterogeneidade astrocitária ao longo do SNC.

Esta segunda parte da tese mostra que além da participação dos astrócitos modulando as sinapses, estes podem também ser influenciados pela atividade sináptica. Além disso, mostra que o TGF- $\beta$  é um fator envolvido nesta comunicação dinâmica e bi-direcional entre neurônio e glia. Em invertebrados, a família TGF- $\beta$  tem sido relacionada à formação e estabilização sináptica (Packard et al., 2003). Os dados apresentados nesta tese e publicados no primeiro semestre de 2008 apontaram para um interessante assunto ainda pouco explorado, a participação do TGF- $\beta$ 1 no desenvolvimento de sinapses glutamatérgicas. Posteriormente a publicação de nosso trabalho, Feng & Ko (2008) mostraram que este fator induz a formação de sinapses colinérgicas na junção neuromuscular. Desta forma, é possível que no SNC, o TGF- $\beta$ 1, secretado após a ativação de receptores glutamatérgicos, tenha uma importante papel para a formação e estabilização de sinapses.

Apesar de nosso grupo estudar o papel do glutamato e do TGF- $\beta$ 1 no desenvolvimento do SNC, estas moléculas têm sido relacionadas principalmente a processos patológicos. A disfunção de receptores e transportadores de glutamato tem sido associada a desordens neurológicas tais como ELA, Doença de Alzheimer e epilepsia (Oberheim et al., 2008; Seifert et al., 2006). Além disso, altos níveis de TGF- $\beta$ 1 são observados em patologias onde há disfunção do metabolismo de glutamato (Tesseur & Wyss-Coray, 2006). Desta forma, nosso trabalho, ao estudar os componentes celulares e moleculares envolvidos nas sinapses, pode contribuir não somente para compreensão da interação neuro-gliar durante o desenvolvimento, mas também para o melhor entendimento dos processos que governam as patologias do SNC e, assim, talvez criar novas estratégias de neuroproteção que seriam de grande auxílio para o tratamento de patologias neurodegenerativas.

Ainda, nosso grupo começou a investir no melhor entendimento dos progenitores no sistema nervoso. Desde a descoberta das células-tronco no SNC (McKay, 1997), diversos grupos têm buscado caracterizar estas células, uma vez que a compreensão dos mecanismos (proliferação, morte e diferenciação) que envolvem as células-tronco neurais pode ser de grande utilidade em terapias celulares para a recuperação de lesões e, também, de doenças degenerativas.

Esta tese, somada a todo trabalho de nosso grupo ao longo destes anos, fornece evidências para o melhor entendimento das interações neuro-gliais mediadas por transmissores e pelo TGF- $\beta$ 1 nos processos de diferenciação das células de GR e dos astrócitos.

## **6. CONCLUSÕES**

---

**6.1.** Progenitores neurais (células de Glia Radial e neuroesferas) expressam Serina Racemase sugerindo que essas células sejam alvo e fonte de D-serina no córtex cerebral;

**6.2.** Glutamato e D-serina induzem a expressão de BLBP em progenitores neurais (cultura de Glia Radial e neuroesferas) e promovem a radialização dos progenitores sugerindo que estas moléculas induzam o fenótipo de Glia Radial no córtex cerebral;

**6.3.** A migração neuronal em explantes de córtex cerebral não é modulada por glutamato e D-serina;

**6.4.** Glutamato ativa o gene de GFAP em astrócitos do córtex cerebral através da secreção de TGF- $\beta$ 1 pelos astrócitos, com a participação das vias de MAPK/PI3K, mostrando a participação de neurotransmissores no desenvolvimento do córtex cerebral;

**6.5.** A ativação do gene de GFAP em astrócitos corticais por TGF- $\beta$ 1 envolve as vias não-canônicas de MAPK/PI3K e possivelmente a via canônica de Smad;

**6.6.** O gene de GFAP é diferentemente modulado pelo glutamato em regiões encefálicas distintas, demonstrando a heterogeneidade glial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abbott, N.J. **Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability.** J. Anat. 200: 629-638. 2002.

Allen, N.J. & Barres, B.A. **Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity.** Curr. Opin. Neurobiol. 5: 542-548. 2005.

Alves, J.A.; Barone, P.; Engelender, S.; Froes, M.M. & Menezes, J.R. **Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone.** J. Neurobiol. 52: 251-265. 2002.

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: 881-890. 2004.

Anthony, T.E.; Mason, H.A.; Gridley, T.; Fishell, G. & Heintz, N. **Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells.** Genes Dev. 19: 1028-1033. 2005.

Araque, A.; Martin, E.D. Perea, G.; Arellano, J.I. & Buno, W. **Synaptically release acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices.** J. Neurosci. 22: 2443-2450. 2002.

Bacci, A.; Verderio, C.; Pravettoni, E. & Matteoli, M. **The role of glial cells in synaptic function.** Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1381: 403-409.1999.

Barnabé-Heider, F.; Wasylnka, J.A.; Fernandes, K.J.; Porsche, C.; Sendtner, M.; Kaplan, D.R. & Miller, F.D. **Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1.** Neuron 48: 253-265. 2005.

Barres, B. & Smith, S.J. Neurobiology. **Cholesterol-making or breaking the synapse.** Science 5545: 1296-1297. 2001.

Barry, D. & McDermott, K. **Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord.** Glia 50: 187-197. 2005.

Baumann, N. & Pham-Dinh, D. **Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system.** Physiol. Rev. 81: 871-927. 2001.

Behar, T.N.; Scott, C.A.; Greene, C.L.; Wen, X.; Smith, S.V.; Maric, D.; Liu, Q.Y.; Colton, C.A. & Barker, J.L. **Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration.** J. Neurosci. 19: 4449-4461. 1999.

Bergles, D.E. & Jahr, C.E. **Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral–commissural synapses in the hippocampus.** J. Neurosci. 18: 7709-7716. 1998.

Bezzi, P.; Carmignoto, G.; Pasti, L.; Vesce, S.; Rossi, D.; Rizzini, B.L.; Pozzan, T. & Volterra, A. **Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes.** *Nature* 391: 281-285. 1998.

Bignami, A. & Dahl, D. **The development of Bergmann glia in mutant mice with cerebellar malformations: reeler, staggerer and weaver. Immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein.** *J. Comp. Neurol.* 2: 219-229. 1974.

Bleakman, D.; Alt, A. & Nisenbaum, E.S. **Glutamate receptors and pain.** *Semin. Cell. Dev. Biol.* 17: 592-604. 2006.

Boehning, D. & Snyder, S.H. **Novel neural modulators.** *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 105-131. 2003.

Bonni, A.; Sun, Y.; Nadal-Vicens, M.; Bhatt, A.; Frank, D.A.; Rozovsky, I.; Stahl, N.; Yancopoulos, G.D. & Greenberg, M.E. **Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway.** *Science* 278: 477-483. 1997.

Böttner, M.; Kriegstein, K. & Unsicker, K. **The transforming growth factor- $\beta$ : structure, signaling, and roles in nervous system development and functions.** *J. Neurochem.* 75: 2227-2240. 2000.

Brionne, T.C.; Tesseur, I.; Masliah, E. & Wyss-Coray, T. **Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain.** *Neuron* 40: 1133-1145. 2003.

Bruna, A.; Darken, R.S.; Rojo, F.; Ocaña, A.; Peñuelas, S.; Arias, A.; Paris, R.; Tortosa, A.; Mora, J.; Baselga, J. & Seoane, J. **High TGF $\beta$ -Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene.** *Cancer Cell* 11: 147-160. 2007.

Bruno, V.; Battaglia, G.; Casabona, G.; Copani, A.; Caciagli, F. & Nicoletti, F. **Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor-beta.** *J. Neurosci.* 18: 9594-9600. 1998.

Bruno, V.; Battaglia, G.; Copani, A.; D'Onofrio, M.; Di Iorio, P.; De Blasi, A.; Melchiorri, D.; Flor, P.J. & Nicoletti, F. **Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 1013-1033. 2001.

Bruska M, Wozniak W. **Differentiation, maturation, and function of Schwann cells (lemmocytes).** *Folia Morphol. (Warsz)* 58: 101-107. 1999.

Canudas, A.M.; Di Giorgi Gerevini, V.; Iacovelli, L.; Nano, G.; D'Onofrio, M.; Arcella, A.; Giangaspero, F.; Busceti, C.; Ricci-Vitiani, L.; Battaglia, G.; Nicoletti, F. & Melchiorri, D. **PHCCC, a specific enhancer of type 4 metabotropic glutamate receptors, reduces proliferation and promotes differentiation of cerebellar granule cell neuroprecursors.** *J. Neurosci.* 24: 10343-10352. 2004.

Carmen, J.; Magnus, T.; Cassiani-Ingoni, R.; Sherman, L.; Rao, M.S. & Mattson, M.P. **Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS.** Prog. Neurobiol. 82: 151-162. 2007.

Carmignoto, G. **Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones.** Prog. Neurobiol. 6: 561-581. 2000.

Castelo-Branco, G.; Sousa, K. M.; Bryja, V.; Pinto, L.; Wagner, J. & Arenas, E. **Ventral midbrain glia express regionspecific transcription factors and regulate dopaminergic neurogenesis through Wnt-5a secretion.** Mol. Cell. Neurosci. 31: 251-262. 2006.

Catania, M.V.; Landwehrmeyer, G.B.; Testa, C.M.; Standaert, D.G.; Penney, J.B. Jr. & Young, A.B. **Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development.** Neurosci. 61: 481-495. 1994.

Chen, Y.; Ai, Y.; Slevin, J. R.; Maley, B. E. & Gash, D. M. **Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor.** Exp. Neurol. 196: 87-95. 2005.

Choi, D.D. **Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.** Neuron 1: 623-634. 1988.

Choi, Y.K. & Kim, K.W. **Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication.** BMB Rep. 41: 345-352. 2008.

Christopherson, K.S.; Ullian, E.M.; Stokes, C.C.; Mallowney, C.E.; Hell, J.W.; Agah, A.; Lawler, J.; Mosher, D.F.; Bornstein, P. & Barres, B.A. **Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis.** Cell 3: 421-433. 2005.

Ciccarelli, R.; Sureda, F.X.; Casabona, G.; Diorio, P.; Caruso, A.; Spinella, F.; Condorelli, D.F.; Nicoletti, F. & Caciagli, F. **Opposite influence of the metabotropic glutamate receptor subtypes mGlu3 and -5 on astrocyte proliferation in culture.** Glia 4: 390-398. 1997.

Ciceroni, C.; Lupieri, T.; Cappuccio, I.; Mosillo, P.; Gradini, R.; Magnotti, M.C.; Sarichelou, I.; Nicoletti, F. & Melchiorri, D. **Effect of group II metabotropic glutamate receptors on cell differentiation and morphology in cultured progenitor cells isolated from the mouse subventricular zone.** Am. Soc. Neurosci. Annu. Meeting. Abstract book number 626. 7. 2006.

Clarke, D.C. & Liu, X. **Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling.** Trends Cell Biol. 18: 430-442. 2008.

Clements, J.D.; Lester, R.A.J.; Tong, G.; Jahr, C.E. & Westbrook, G.L. **The time course of glutamate in the synaptic cleft.** Science 258: 1498-1501. 1992.

Collingridge, G.L. & Bliss, T.V. **NMDA receptors: their role in long term potentiation.** Trends Neurosci. 10: 288-293. 1987.

Corti, C.; Battaglia, G.; Molinaro, G.; Riozzi, B.; Pittaluga, A.; Corsi, M.; Mugnaini, M.; Nicoletti, F. & Bruno, V. **The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection.** *J. Neurosci.* 27: 8297-8308. 2007.

Culican, S.M.; Baumrind, N.L.; Yamamoto, M. & Pearlman, A.L. **Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes.** *J. Neurosci.* 10: 684-692. 1990.

Cutler, R.W.P & Dudzinski, D.S. **Regional changes in amino acid content in developing rat brain.** *J. Neurochem.* 23: 1005-1009. 1974.

D'Antoni, S.; Berretta, A.; Bonaccorso, C.M.; Bruno, V.; Aronica, E.; Nicoletti, F. & Catania, M.V. **Metabotropic glutamate receptors in glial cells.** *Neurochem. Res.* 33: 2436-2443. 2008.

deAzevedo, L.C.; Fallet, C.; Moura-Neto, V.; Dumas-Duport, C.; Hedin-Pereira, C. & Lent, R. **Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes.** *J. Neurobiol.* 55: 288-298. 2003.

De Miranda, J.; Santoro, A.; Engelender, S. & Wolosker, H. **Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis.** *Gene* 256: 183-188. 2000.

de Sampaio e Spohr, T.C.L.; Martinez, R.; Federowicz, E.S.; Moura-Neto, V. & Gomes, F.C.A. **Neuron-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor- $\beta$ 1.** *Eur. J. Neurosci.* 16: 2059-2069. 2002.

Dennis-Donini, S.; Glowinski, J. & Prochiantz, A. **Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones.** *Nature* 307: 641-643. 1984.

Derynck, R. & Zhang, Y.E. **Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling.** *Nature* 425: 577-584. 2003.

Di Giorgi Gerevini, V.D.; Caruso, A.; Cappuccio, I.; Ricci-Vitiani, L.; Romeo, S.; Della Rocca, C.; Gradini, R.; Melchiorri, D. & Nicoletti, F. **The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain.** *Brain Res. Dev. Brain Res.* 150: 17-22. 2004.

Di Giorgi Gerevini, V.; Melchiorri, D.; Battaglia, G.; Ricci-Vitiani, L.; Ciceroni, C.; Busceti, C.L.; Biagioni, F.; Iacovelli, L.; Canudas, A.M.; Parati, E.; De Maria, R. & Nicoletti, F. **Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells.** *Cell Death Differ.* 12: 1124-1133. 2005.

Di Giorgio, F.P.; Carrasco, M.A.; Siao, M.C. Maniatis, T. & Eggan, K. **Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model.** *Nature Neurosci.* 10: 608-614. 2007.

Di Giorgio, F.P.; Boulting, G.L.; Bobrowicz, S. & Eggan, K.C. **Human Embryonic Stem Cell-derived Motor Neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation.** *Cell Stem Cell* 3: 637-648. 2008.

Doetsch, F. **The glial identity of neural stem cells.** *Nat. Neurosci.* 6: 1127-1134. 2003.

D'Onofrio, M.; Cuomo, L.; Battaglia, G.; Ngomba, R.T.; Storto, M.; Kingston, A.E.; Orzi, F.; De Blasi, A.; Di Iorio, P.; Nicoletti, F. & Bruno, V. **Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways.** *J. Neurochem.* 78: 435-445. 2001.

Dunkley, P.R.; Jarvie, P.E.; Heath, J.W.; Kidd, G.J. & Rostas, J.A. **A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients.** *Brain Res.* 1: 115-129. 1986.

Dziembowska, M.; Danilkiewicz, M.; Wesolowska, A.; Zupanska, A.; Chouaib, S. & Kaminska, B. **Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor beta signal transduction in human glioblastoma cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 1101-1106. 2007.

Eickelberg, O.; Centrella, M.; Reiss, M.; Kashgarian, M. & Wells, R.G. **Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function.** *J. Biol. Chem.* 277: 823-829. 2002.

Eng, L.F. **Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes.** *J. Neuroimmunol.* 8: 203-214. 1985.

Eng, L.F.; Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L. **Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).** *Neurochem. Res.* 25: 1439-1451. 2000.

Ever, L. & Gaiano, N. **Radial glial progenitors: neurogenesis and signaling.** *Curr. Opin. Neurobiol.* 1: 29-33. 2005.

Feng, L.; Hatten, M.E. & Heintz, N. **Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS.** *Neuron* 12: 895-908. 1994.

Feng, Z. & Ko, C.P. **Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta1.** *J. Neurosci.* 39: 9599-9609. 2008.

Finch, C.E.; Laping, N.J.; Morgan, T.J.; Nicholson, N.R. & Pasinetti, G.M. **TGF- $\beta$ 1 is an organizer of responses to neurodegeneration.** *J. Cell. Biochem.* 53: 314-322. 1993.

Flanders, K.C.; Lüdecke, G.; Engels, S.; Cissel, D.S.; Roberts, A.B.; Kondaiah, P.; Lafyatis, R.; Sporn, M.B. & Unsicker, K. **Localization and actions of transforming growth factor- $\beta$ s in the embryonic nervous system.** Development 113: 183-191. 1991.

Flanders, K.C.; Ren, R.F. & Lippa, C.F. **Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease.** Prog. Neurobiol. 54: 71-85. 1998.

Flor, P.J.; Battaglia, G.; Nicoletti, F.; Gasparini, F. & Bruno, V. **Neuroprotective activity of metabotropic glutamate receptor ligands.** Adv. Exp. Med. Biol. 513: 197-223. 2002.

Fonnum, F. **Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain.** J. Neurochem. 42:1-11. 1984.

Frank, G.; Grisar, T. & Moonen, G. **Glial and neuronal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump.** In: Adv. Cell. Neurobiol. Academic Press, Inc., New York. Vol. 4: 133-159. 1983.

Gaiano, N.; Nye, J.S. & Fishell, G. **Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain.** Neuron 26: 395-404. 2000.

Gaiano, N. & Fishell, G. **The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates.** Annu. Rev. Neurosci. 25: 471-490. 2002.

Gaitonde, M.E. & Richter, D. **Changes with age in the utilisation of glucose carbon in liver and brain.** J. Neurochem. 13: 309-1318. 1996.

Galou, M.; Pournin, S.; Ensergueix, D.; Ridet, J.L.; Tchelingierian, J.L.; Lossouarn, L.; Privat, A.; Babinet, C. & Dupouey, P. **Normal and pathological expression of GFAP promoter elements in transgenic mice.** Glia 12: 281-293. 1994.

Garcia-Abreu, J.; Moura-Neto, V.; Carvalho, S.L. & Cavalcante, L.A. **Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons.** J. Neurosci. Res. 40: 417- 477. 1995.

Ghashghaei, H.T.; Lai, C. & Anton, E.S. **Neuronal migration in adult brain: are we there yet?** Nat. Rev. Neurosci. 8: 141-151. 2007.

Ghashghaei, H.T.; Weimer, J.M.; Schmid, R.S.; Yokota, Y. McCarthy, K.D.; Popko, B. & Anton, E.S. **Reinduction of ErbB2 in astrocytes promotes radial glial progenitor identity in adult cerebral cortex.** Genes Dev. 21: 3258-3271. 2008.

Ge, W.; Martinowich, K.; Wu, X.; He, F.; Miyamoto, A.; Fan, G.; Weinmaster, G. & Sun, Y.E. **Notch signaling promotes astroglial gene activation via direct CSL-mediated glial gene activation.** J. Neurosci. Res. 69: 848-860. 2002.

Ge, W.P.; Zhou, W.; Luo, Q.; Jan, L.Y. & Jan, Y.N. **Dividing glial cells maintain differentiated properties including complex morphology and functional synapses.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA *in press*. 2008.

Glowinski, J.; Marin, P.; Tence, M.; Stella, N.; Giaume, C. & Premont, J. **Glial receptors and their intervention in astrocyto-astrocytic and astrocyto-neuronal interactions.** *Glia* 2: 201-208. 1994.

Goldman, S. **Glia as neural progenitor cells.** *Trends Neurosci.* 26: 590-596. 2003.

Gomes, F.C.A.; Garcia-Abreu, J.; Galou, M.; Paulin, D. & Moura Neto, V. **Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice.** *Glia* 26: 97-108. 1999a.

Gomes, F.C.A.; Paulin, D. & Moura Neto, V. **Glial fibrillary acidic protein: modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 619-631. 1999b.

Gomes, F.C.A.; Maia, C.G.; Menezes, J.R.L. & Moura Neto, V. **Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone induce neuronal proliferation.** *Glia* 25: 247-255. 1999c.

Gomes, F.C.A.; Spohr, T.C.L.; Martinez, R. & Moura Neto, V. **Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 611-620. 2001.

Gomes, F.C.; Sousa, V.de O. & Romão, L. **Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development.** *Int. J. Dev. Neurosci.* 23: 413-424. 2005.

Götz, 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.** *Dev. Brain Res. Bull.* 57: 777-788. 2002.

Gotz, M. & Barde, Y.A. **Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons.** *Neuron* 3: 369-372. 2005.

Gritti, A. & Bonfanti, L. **Neuronal-glia interactions in central nervous system neurogenesis: the neural stem cell perspective.** *Neuron Glia Biol.* 3: 309-323. 2007.

Gundersen, V.; Chaudhry, F.A.; Bjaalie, J.G.; Fonnum, F.; Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen J. **Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: A quantitative immunogold analysis in rat hippocampus.** *J. Neurosci.* 18: 6059-6070. 1998.

Hall, A.C.; Mira, H.; Wagner, J. & Arenas, E. **Region-specific effects of glia on neuronal induction and differentiation with a focus on dopaminergic neurons.** *Glia* 43: 47-51. 2003.

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

Hashimoto, A.; Oka, T. & Nishikawa, T. **Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery.** Eur. J. Neurosci. 7: 1657-1663. 1995.

Hatten, M.E. **Neuronal regulation of astroglia morphology and proliferation in vitro.** J. Cell Biol. 100: 384-396. 1985.

Hatten, M.E. **Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated.** J. Cell Biol. 104: 1353-1360. 1987.

Haydar, T.F.; Wang, F.; Schwartz, M.L. & Rakic, P. **Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones.** J. Neurosci. 20: 5764-5774. 2000.

Haydon, P.G. **Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other.** Curr. Biol. 19: 12-14. 2000.

Haydon, P.G. & Carmignoto, G. **Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling.** Physiol. Rev. 86: 1009-1031. 2006.

He, F. & Sun, Y.E. **Glial cells more than support cells?** Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 661-665. 2007

Hirai, K.; Yoshioka, H.; Kihara, M.; Hasegawa, K.; Sakamoto, T.; Sawada, T. & Fushiki, S. **Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study.** Brain Res. Dev. Brain Res. 114: 63-67. 1999.

Hollmann, M. & Heinemann, S. **Cloned glutamate receptors.** Annu. Rev. Neurosci. 17: 31-108. 1994.

Horner, P.J. & Palmer, T.D. **New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. La vida loca!** Trends Neurosci. 26: 597-603. 2003.

Howard, B.M.; Zhicheng, M.; Filipovic, R.; Moore, A.R.; Antic, S.D. & Zecevic, N. **Radial glia cells in the developing human brain.** Neuroscientist 14: 459-473. 2008.

Hughes E.G.; Maguire, J.L.; McMinn, M.T.; Scholz R.E. & Sutherland, M.L. **Loss of glial .brillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking.** Brain Res. Mol. Brain Res. 124: 114-123. 2004.

Hunten, K.E. & Hatten, M.E. **Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain.** Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 2061-2065. 1995.

Johansson, C.B.; Svensson, M.; Wallstedt, L.; Janson, A.M. & Frisen, J. **Neural stem cells in the adult human brain.** Exp. Cell Res. 253: 733-736.1999.

Johnson, J.W. & Ascher, P. **Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons.** Nature 325: 529-531. 1987.

Kartvelishvily E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H. **Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors.** J. Biol. Chem. 281: 14151-14162. 2006.

Kettenmann, H. & Ransom, B.R. **Neuroglia.** 2nd ed. Oxford University Press, USA. 2005.

Kim, P.M.; Aizawa, H.; Kim, P.S.; Huang, A.S.; Wickramasinghe, S.R.; Kashani, A.H.; Barrow, R.K.; Haganir, R.L.; Ghosh, A. & Snyder, S.H. **Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 2105-2110. 2005.

Kojima, S.; Nakamura, T.; Nidaira, T.; Nakamura, K.; Ooashi, N.; Ito, E.; Watase, K.; Tanaka, K.; Wada, K.; Kudo, Y. & Miyakawa, H. **Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices.** J. Neurosci. 19: 2580-2588. 1999.

Komuro, H. & Rakic, P. **Modulation of neuronal migration by NMDA receptors.** Science 260: 95-97. 1993.

Kriegstein, K.; Rufer, M.; Suter-Crazzolaro, C. & Unsicker, K. **Neural functions of the transforming growth factors  $\alpha$ .** Int. J. Dev. Neurosci. 13: 301-315. 1995.

Kutsuwada, T.; Sakimura, K.; Manabe, T.; Takayama, C.; Katakura, N.; Kushiya, E.; Natsume, R.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Yagi, T.; Aizawa, S.; Arakawa, M.; Takahashi, T.; Nakamura, Y.; Mori H. & Mishina, M. **Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice.** Neuron 16: 333-344. 1996.

Lee, J.C.; Mayer-Proschel, M. & Rao, M.S. **Gliogenesis in the central nervous system.** Glia 30: 105-121. 2000.

Lehre, K.P. & Danbolt, N.C. **The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: Chemical and stereological quantification in young adult brain.** J. Neurosci. 18: 8751-8757. 1998.

Lesné, S.; Docagne, F.; Gabriel, C.; Liot, G.; Lahiri, D.K.; Buee, L.; Plawinski, L.; Delacourte, A.; MacKenzie, E.T.; Buisson, A. & Vivien, D. **Transforming growth factor-beta 1 potentiates amyloid-beta generation in astrocytes and in transgenic mice.** J. Biol. Chem. 278: 18408-18418. 2003.

Letamendía, A.; Lastres, P.; Botella, L.M.; Raab, U.; Langa, C.; Velasco, B.; Attisano, L. & Bernabeu, C. **Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan.** J. Biol. Chem. 273: 33011-33019. 1998.

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: 815-840. 1980.

Li, H. & Grumet, M. **BMP and LIF signaling coordinately regulate lineage restriction of radial glia in the developing forebrain.** Glia 55: 24-35. 2007.

Lie, D. C.; Colamarino, S. A.; Song, H. J.; Desire, L.; Mira, H.; Consiglio, A.; Lein, E. S.; Jessberger, S.; Lansford, H.; Dearie, A. R. & Gage, F. H. **Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis.** Nature 437: 1370-1375. 2005.

Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A. **Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis.** Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 7526-7531. 1999.

Lopez-Casillas, F.; Cheifetz, S.; Doody, J.; Andres, J.L.; Lane, W.S. & Massague, J. **Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system.** Cell 67: 785-795. 1991.

LoTurco, J.J.; Owens, D.F.; Heath, M.J.; Davis, M.B. & Kriegstein, A.R. **GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis.** Neuron 15: 1287-1298. 1995.

Luk, K.C.; Kennedy, T.E. & Sadikot, A.F. **Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism.** J. Neurosci. 23: 2239-2250. 2003.

Ma, D.K.; Ming, G.L. & Song, H. **Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis.** Curr. Opin. Neurobiol. 15: 514-520. 2005.

MacDermott, A.B.; Mayer, M.L.; Westbrook, G.L.; Smith, S.J. & Barker J.L. **NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cords neurones.** Nature 321: 519-522. 1986.

Magini, G. **Sur la neuroglie et les cellules nerveuses cerebrales chez les foetus.** Arch. Ital. Biol. 9: 59-60. 1888.

Malatesta, P.; Appolloni, I. & Calzolari, F. **Radial glia and neural stem cells.** Cell Tissue Res. 331: 165-178 2008.

Malatesta, P.; Hack, M.A.; Hartfuss, E.; Kettenmann, H.; Klinkert, W.; Kirchhoff, F. & Götz, M. **Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate.** Neuron 37: 751-764. 2003.

Malatesta, P.; Hartfuss, E. & Götz, M. **Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage.** Development 127: 5253-5263. 2000.

Mancini, J.D. & Atchison, W.D. **The NR2B subunit in NMDA receptors is functionally important during cerebellar granule cell migration.** *Neurosci. Lett.* 429: 87-90. 2007.

Marchetto, M.C.N.; Muotri, A.R.; Mu, Y.; Smith, A.M.; Cezar, G.G. & Gage, F.H. **Non-Cell-Autonomous effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells.** *Cell Stem Cell* 3: 649-657. 2008.

Marín, O. & Rubenstein, J.L.R. **Cell Migration in the Forebrain.** *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 441-483. 2003.

Marret, S.; Gressens, P. & Evrard, P. **Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids in hamster developing brain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15463-15468. 1996.

Martineau, M.; Baux, G. & Mothet, J.P. **D-serine signaling in the brain: friend or foe.** *Trends Neurosci.* 29: 481-491. 2006.

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.* 3: 341-349. 2005.

Martinez, R. & Gomes, F.C.A. **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: 49311-49318. 2002.

Martins, R.A., Linden, R. & Dyer, M.A. **Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development.** *Eur. J. Neurosci.* 24: 969-980. 2006.

Mason, H.A.; Ito, S. & Corfas, G. **Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents.** *J. Neurosci.* 21: 7654-7663. 2001.

Massagué, J. & Chen, Y.G. **Controlling TGF-beta signaling.** *Genes Dev.* 14: 627-644. 2000.

Massagué, J. **Receptors for the TGF-beta family.** *Cell* 69: 1067-1070. 1992.

Massagué, J. **TGF- $\beta$  signal transduction.** *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791. 1998.

Matthias, K.; Kirchhoff, F.; Seifert, G.; Huttmann, K.; Matyash, M.; Kettenmann, H. & Steinhauser, C. **Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus.** *J. Neurosci.* 5: 1750-1758. 2003.

Matsutani, S. & Yamamoto, N. **Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling.** *Glia* 20: 1-9. 1997.

Mauch, D.H.; Nagler, K.; Schumacher, S.; Goritz, C.; Muller, E.C.; Otto, A. & Pfrieder, F.W. **CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol.** *Science* 5545: 1354-1357. 2001.

Mayer, M.L. & Armstrong, N. **Structure and function of glutamate receptor ion channels.** *Annu. Rev. Physiol.* 66:161-181. 2004.

Mayer, M.L. **Glutamate receptor ion channels.** *Curr. Opin. Neurobiol.* 15: 282-288. 2005.

McCall, A.; Glaeser, B.S.; Millington, W. & Wurtman, R.J. **Monosodium glutamate neurotoxicity, hyperosmolarity, and blood-brain barrier dysfunction.** *Neurobeh. Toxicol.* 1: 279-283. 1979.

McCartney-Francis, N.L. & Wahl, S.M. **Transforming growth factor- $\beta$ : A matter of life and death.** *J. Leukoc. Biol.* 55: 401-409. 1994.

McKay, R. **Stem cells in the central nervous system.** *Science* 276: 66-71. 1997.

Mecha, M.; Rabadán, M.A.; Peña-Melián, A.; Valencia, M.; Mondéjar, T. & Blanco, M.J. **Expression of TGF-betas in the embryonic nervous system: analysis of interbalance between isoforms.** *Dev. Dyn.* 237: 1709-1717. 2008.

Mendes, F.A.; Onofre, G.R.; Silva, L.C.; Cavalcante, L.A. & Garcia-Abreu, J. **Concentration-dependent actions of glial chondroitin sulfate on the neuritic growth of midbrain neurons.** *Dev. Brain Res.* 142: 111-119. 2003.

Mendez-Otero, R. & Constantine-Paton, M. **Granule cell induction of 9-O-acetyl gangliosides on cerebellar glia in microcultures.** *Dev. Biol.* 138: 400-409. 1990.

Merkle, F.T.; Tramontin, A.D.; Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. **Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 17528-17532. 2004.

Messersmith, E.K.; Feller, M.B.; Zhang, H. & Shatz, C.J. **Migration of neocortical neurons in the absence of functional NMDA receptors.** *Mol. Cell Neurosci.* 9: 347-357. 1997.

Miller, R.F. **D-Serine as a glial modulator of nerve cells.** *Glia* 275-283. 2004.

Miller, F.D. & Gauthier, A.S. **Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex.** *Neuron* 54: 357-369. 2007.

Miller, R.H. & Raff, M.C. **Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct.** J. Neurosci. 4: 585-592. 1984.

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: 95-108. 1988.

Miyazono, K. **TGF-beta/SMAD signaling and its involvement in tumor progression.** Biol. Pharm. Bull. 23: 1125-1130. 2000.

Mochizuki, N.; Takagi, N.; Kurokawa, K.; Kawai, T.; Besshoh, S.; Tanonaka, K. & Takeo, S. **Effect of NMDA receptor antagonist on proliferation of neurospheres from embryonic brain.** Neurosci. Lett. 417: 143-148. 2007.

Morest, D.K. & Silver J. **Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: What are they? Where are they from? How do they get where they are going?** Glia 43: 6-18. 2003.

Mothet, J.P.; Parent, A.T.; Wolosker, H.; Brady, R.O.Jr.; Linden, D.J.; Ferris, C.D.; Rogawski, M.A. & Snyder, S.H. **D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4926-4931. 2000.

Moustakas, A.; Souchelnytskyi, S. & Heldin, C. **Smad regulation in TGF- $\beta$  signal transduction.** J. Cell Sci. 114: 4359-4369. 2001.

Moyse, E.; Segura, S.; Liard, O.; Mahaut, S. & Mechawar, N. **Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system.** Curr. Stem Cell Res. Ther. 3: 163-184. 2008.

Muller, H.W.; Junghans, U. & Kappler, J. **Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors.** Pharmacol. Ther. 65: 1-18. 1995.

Munoz-Garcia, D. & Ludwin, S.K. **Gliogenesis in organotypic tissue culture of the spinal cord of the embryonic mouse. I. Immunocytochemical and ultrastructural studies.** J. Neurocytol. 15: 273-290. 1986.

Mustafa, A.K.; Kim, P.M. & Snyder, S.H. **D-Serine as a putative glial neurotransmitter.** Neuron Glia Biol. 1: 275-281. 2004.

Nadarajah, B. **Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex.** Glia 43: 33-36. 2003.

Nadarajah, B.; Alifragis, P.; Wong, R.O.L. & Parnavelas, J.G. **Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging.** Cereb. Cortex 13: 607-611. 2003.

Nagai, M.; Re, D.B.; Nagata, T.; Chalazonitis, A.; Jessell, T.M.; Wichterle, H. & Przedborski, S. **Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons.** *Nature Neurosci.* 10: 615-622. 2007.

Nagatsu, T.; Mogi, M.; Ichinose, H. & Togari, A. **Cytokines in Parkinson's disease.** *J. Neural Transm. Suppl.* 58: 143-151. 2000.

Nägler, K.; Mauch, D.H. & Pfrieder, F.W. **Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system.** *J. Physiol.* 533: 665-679. 2001.

Nakanishi, S. **Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity.** *Neuron* 5: 1031-1037. 1994.

Nakashima, K.; Yanagisawa, M.; Arakawa, H.; Kimura, N.; Hisatsune, T.; Kawabata, M.; Miyazono, K. & Taga, T. **Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300.** *Science* 284: 479-482. 1999.

Neusch, C.; Papadopoulos, N.; Müller, M.; Maletzki, I.; Winter, S.M.; Hirrlinger, J.; Handschuh, M.; Bähr, M.; Richter, D.W.; Kirchhoff, F. & Hülsmann, S. **Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K<sup>+</sup> buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K<sup>+</sup> regulation.** *J. Neurophysiol.* 95: 1843-1852. 2006.

Newman, E.A. **New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission.** *Trends Neurosci.* 26: 536-542. 2003.

Nishida, H. & Okabe, S. **Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines.** *J. Neurosci.* 27: 331-340. 2007.

Nishino, J.; Yamashita, K.; Hashiguchi, H.; Fujii, H.; Shimazaki, T. & Hamada, H. **Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension.** *EMBO J.* 23: 1998-2008. 2004.

Nishiyama, A.; Komitova, M.; Suzuki, R. & Zhu, X. **Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity.** *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 9-22. 2009.

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: 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: 3161-3173. 2002.

Oberheim, N.A.; Tian, G.F.; Han, X.; Peng, W.; Takano, T.; Ransom, B. & Nedergaard, M. **Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain.** *J. Neurosci.* 28: 3264-3276. 2008.

Oliet, S.H. & Mothet, J.P. **Regulation of N-methyl-d-aspartate receptors by astrocytic d-serine.** *Neurosci. In press.* 2008.

Oliet, S.H.; Piet, R.; Poulain, D.A. & Theodosios, D.T. **Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus.** *Glia* 47: 258-267. 2004.

Oliet, S.H.; Piet, R. & Poulain, D.A. **Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons.** *Science* 292: 923-926. 2001.

Olney, J.W. **Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30: 75-90. 1971.

Orrego, F. & Villanueva, S. **The chemical nature of the main central excitatory transmitter: A critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization.** *Neuroscience* 56: 539-555. 1993.

Packard, M.; Mathew, D. & Budnik, V. **Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places.** *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 113-120. 2003.

Parri, H.R.; Gould, T.M. & Crunelli, V. **Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation.** *Nat. Neurosci.* 4: 803-812. 2001.

Pasti, L.; Volterra, A.; Pozzan, T. & Carmignoto, G. **Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ.** *J. Neurosci.* 17: 7817-7830. 1997.

Patten, B.A.; Peyrin, J.M.; Weinmaster, G. & Corfas, G. **Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation.** *J. Neurosci.* 23: 6132-6140. 2003.

Pekny, M.; Wilhelmsson, U.; Bogestal, Y.R. & Pekna, M. **The role of astrocytes and complement system in neural plasticity.** *Int. Rev. Neurobiol.* 82: 95-111. 2007.

Peralta-Zaragoza, O.; Lagunas-Martinez, A.; Madrid-Marina, V. **Factor de crecimiento transformante beta – 1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer.** *Salud Publica Mex.* 43: 340-351. 2001.

Perea, G. & Araque, A. **Properties of synaptic information processing by astrocytes.** *J. Neurosci.* 25: 2192-2203. 2005.

Perego, C.; Vanoni, C.; Bossi, M.; Massari, S.; Basudev, H.; Longhi, R. & Pietrini, G. **The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures.** *J. Neurochem.* 3: 1076-1084. 2000.

Peters, A.; Palay, S.L. & Webster, H. de F. **The FineStructure of the Nervous System. Neurons and their Supporting Cells.** New York, Oxford: Oxford University Press. p 1-494. 1991.

Pfriegeer, F.W. & Barres, B.A. **What the fly's glia tell the fly's brain.** Cell 83: 671-674. 1995.

Pin, J.P. & Duvoisin, R. **The metabotropic glutamate receptors: structure and functions.** Neuropharmacology 1: 1-26. 1995.

Pláteník, J.; Kuramoto, N. & Yoneda, Y. **Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals.** Life Sci. 67: 335-364. 2000.

Porter, J.T. & McCarthy, K.D. **Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals.** J. Neurosci. 16: 5073–5081. 1996.

Prevot, V.; Dehouck, B.; Poulain, P.; Beauvillain, J.C.; Buée-Scherrer, V. & Bouret, S. **Neuronal-glia-endothelial interactions and cell plasticity in the postnatal hypothalamus: implications for the neuroendocrine control of reproduction.** Psychoneuroendocrinology 32 Suppl 1:S46-51. 2007.

Privat, A. **Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals.** Glia 43: 91-93. 2003.

Rakic, P. **Principles of neural cell migration.** Experientia 46: 882-891. 1990.

Rakic, P. **The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering.** Brain Res. Rev. 55: 204-219. 2007.

Regan, M.R.; Huang, Y.H.; Kim, Y.S.; Dykes-Hoberg, M.I.; Jin, L.; Watkins, A.M.; Bergles, D.E. & Rothstein, J.D. **Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS.** J. Neurosci. 27: 6607-6619. 2007.

Reichenbach, A. & Robinson, S.R. **Ependymoglia and ependymoglia-like cells.** In: Neuroglia, Kettenmann, H. & Ranson, B.R.; Oxford University Press cap. 4: 58-84. 1995.

Reiprich, P.; Kilb, W. & Luhmann, H.J. **Neonatal NMDA receptor blockade disturbs neuronal migration in rat somatosensory cortex in vivo.** Cerebral Cortex 15: 349-358. 2005.

Reuss, B.; Hertel, M.; Werner, S. & Unsicker, K. **Fibroblast growth factors-5 and -9 distinctly regulate expression and function of the gap junction protein connexin43 in cultured astroglial cells from different brain regions.** Glia 30: 231-241. 2000.

Rothstein, J.D.; Dykes-Holmberg, M.; Pardo, C.A.; Bristol, L.A.; Jin, L.; Kuncl, R.W.; Kanai, Y.; Hediger, M.; Wang, Y.; Schielke, J.P. & Welty, D.F. **Knock-out of**

**glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate.** *Neuron* 16: 675-686. 1996.

Runquist, M. & Alonso, G. **Gabaergic signaling mediates the morphological organization of astrocytes in the adult rat forebrain.** *Glia* 41: 137-151. 2003.

Santiago, M.F.; Pinho, M.B.; Costa, M.R.; Gandra, M.; Cavalcante, L.A. & Otero R.M. **Expression and Function of Ganglioside 9-O-Acetyl GD3 in Postmitotic Granule Cell Development.** *Molecular and Cellular Neuroscience* 17: 488-499. 2001.

Scatton, B. **The NMDA receptor complex.** *Fundam. Clin. Pharmacol.* 7: 389-400. 1993.

Schell, M.J.; Brady, R.O.Jr.; Molliver, M.E. & Snyder, S.H. **D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors.** *J. Neurosci.* 17: 1604-1615. 1997.

Schell, M.J.; Molliver, M.E. & Snyder, S.H. **D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3948-3952. 1995.

Schlüler, K.; Figiel, M.; Rozyczka, J. & Engele, J. **CNS regionspecific regulation of glial glutamate transporter expression.** *Eur. J. Neurosci.* 16: 836-842. 2002.

Schmid, R.S.; McGraft, B.; Berechid, B.E.; Boyles, B.; Marchionni, M.; Sestan, N. & Anton, E.S. **Neuregulin 1–erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex.** *Neurosci.* 100: 4251-4256. 2003.

Schoepp, D.D.; Jane, D.E. & Monn, J.A. **Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors.** *Neuropharmacology* 10: 1431-1476. 1999.

Schousboe, A.; Sarup, A.; Bak, L.K.; Waagepetersen, H.S. & Larsson, O.M. **Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission.** *Neurochem. Int.* 45: 521-527. 2004.

Seifert, G.; Schilling, K. & Steinhauser, C. **Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective.** *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 194-206. 2006.

Shi, Y. & Massagué, J. **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell* 11: 685-700. 2003.

Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y. **Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord.** *J. Neurosci.* 17: 9212-9219. 1997.

Shleper, M.; Kartvelishvily, E. & Wolosker, H. **D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices.** J. Neurosci. 25: 9413-9417. 2005.

Siegenthaler, J.A. & Miller, M.W. **Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol.** Cereb. Cortex 14: 791-802. 2004.

Slezak, M. & Pfrieder, F.W. **New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis.** Trends Neurosci. 26: 531-535. 2003

Slezak, M.; Pfrieder, F.W. & Soltys, Z. **Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis.** J. Physiol. Paris 2-3: 84-91. 2006.

Song, H.; Stevens, C.F. & Gage, F. **Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells.** Nature 417: 39-44. 2002.

Sotelo, C. **Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system.** Prog. Neurobiol. 72: 295-339. 2004.

Sousa, V.O.; Romão, L.; Moura Neto, V. & Gomes, F.C.A. **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. 2004.

Sousa, V.de O.; Almeida, J.C.; Eller, C.M.; Gomes, F.C. **Characterization of TGF-beta1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes.** In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 42: 171-175. 2006.

Spohr, T.C.L.S.; Choi, J.W.; Gardell, S.E.; Herr, D.R.; Rehen, S.K.; Gomes, F.C. & Chun, J. **Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation.** J. Biol. Chem. 283: 7470-7479. 2008.

Steindler, D.A. & Laywell, E.D. **Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation.** Glia 43: 62-69. 2003.

Stevens, B.; Allen, N.J.; Vazquez, L.E.; Howell, G.R.; Christopherson, K.S.; Nouri, N.; Micheva, K.D.; Mehalow, A.K.; Huberman, A.D.; Stafford, B.; Sher, A.; Litke, A.M.; Lambris, J.D.; Smith, S.J.; John, S.W. & Barres, B.A. **The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination.** Cell 6: 1164-1178. 2007.

Stevens, E.R.; Esguerra, M.; Kim, P.M.; Newman, E.A.; Snyder, S.H.; Zahs, K.R. & Miller, R.F. **D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 6789-6794. 2003.

Stipursky, J. & Gomes, F.C. **TGF-beta1/SMAD signaling induces astrocyte fate commitment in vitro: implications for radial glia development.** *Glia* 55: 1023-1033. 2007.

Sullivan, S.M.; Lee, A.; Bjorkman, S.T.; Miller, S.M.; Sullivan, R.K.; Poronnik, P.; Colditz, P.B. & Pow, D.V. **Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP.** *J. Biol. Chem.* 282: 29414-29423. 2007.

Sun, L.; Margolis, F.L.; Shipley, M.T. & Lidow, M.S. **Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain.** *FEBS Lett.* 441: 392-396. 1998.

Suzuki, M.; Nelson, A.D.; Eickstaedt, J.B.; Wallace, K.; Wright, L.S. & Svendsen C.N. **Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex.** *Eur. J. Neurosci.* 24: 645-653. 2006.

Swanson, R.A.; Liu, J.; Miller, J.W.; Rothstein, J.D.; Farrel, K.; Stein, B.A. & Longuemare, M.C. **Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes.** *J. Neurosci.* 17: 932-940. 1997.

Takai, H.; Katayama, K.; Uetsuka, K.; Nakayama, H. & Doi, K. **Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain.** *Exp. Mol. Pathol.* 75: 89-94. 2003.

Tárnok, K.; Czöndör, K.; Jelitai, M.; Czirók, A. & Schlett, K. **NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity.** *J. Neurochem.* 104: 818-829. 2008.

Tesseur, I. & Wyss-Coray, T. **A role for TGF-beta signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models.** *Curr. Alzheimer Res.* 3: 505-513. 2006.

Toru-Delbauffe, D.; Baghdassarian-Chalaye, D.; Gavaret, J.M.; Courtin, F.; Pomerance, M. & Pierre, M. **Effects of transforming growth factor beta 1 on astroglial cells in culture.** *J. Neurochem.* 54: 1056-1061. 1990.

Ueki, T.; Tanaka, M.; Yamashita, K.; Mikawa, S.; Fu 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: 11732-11740. 2003.

Ullian, E.M.; Christopherson, K.S. & Barres, B.A. **Role for Glia in synaptogenesis.** *Glia* 47: 209-216. 2004.

Ullian, E.M.; Sapperstein, S.K.; Christopherson, K.S. & Barres, B.A. **Control of synapse number by glia.** *Science* 5504: 657-61. 2001.

van der Wal, E.A.; Gomez-Pinilla, F. & Cotman, C.W. **Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies.** Neuroreport 4: 69-72. 1993.

Verkhatsky, A. & Kirchhoff, F. **Glutamate-mediated neuronal-glia transmission.** J. Anat. 210:651-660. 2007.

Verkhatsky, A. & Steinhauser, C. **Ion channels in glial cells.** Brain Res. Brain Res. Rev. 32: 380-412. 2000.

Virchow, R. **Ueber das granulirte Aussehen der Wandungen der Gehirnventrikel.** Allg. Z. Psychiat. 3: 242-250. 1846.

Volterra, A. & Meldolesi, J. **Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues.** Nat. Rev. Neurosci. 6: 626-640. 2005.

Voigt, T. **Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glial into astrocytes.** J. Comp. Neurol. 289: 74-88. 1989.

Wagner, J.; Akerud, P.; Castro, D. S.; Holm, P. C.; Canals, J. M.; Snyder, E. Y.; Perlmann, T. & Arenas, E. **Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes.** Nat. Biotechnol. 17: 653-659. 1999.

Wake, K.; Yamazaki, H.; Hanzawa, S.; Konno, R.; Sakio, H.; Niwa, A. & Hori, Y. **Exaggerated responses to chronic nociceptive stimuli and enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in mutant mice lacking D-amino-acid oxidase.** Neurosci. Lett. 297: 25-28. 2001.

Wang, S. & Barres, B.A. **Up a notch: instructing gliogenesis.** Neuron 27: 197-200. 2000.

Watanabe, M.; Inoue, Y.; Sakimura, K. & Mishina, M. **Distinct spatiotemporal distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain.** Ann. NY Acad. Sci. 707: 463-466. 1993.

Wenner, C.E. & Yan, S. **Biphasic role of TGF- $\beta$ 1 in signal transduction and crosstalk.** J. Cell. Physiol. 196: 42-50. 2002.

Williams, S.M.; Diaz, C.M.; Macnab, L.T.; Sullivan, R.K. & Pow, D.V. **Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons.** Glia 53: 401-411. 2006.

Wisden, W. & Seeburg, P.H. **Mammalian ionotropic glutamate receptors.** Curr Opin Neurobiol 3: 291-298. 1993.

Wolff, J.R. & Chao, T.I. **Cytoarchitectonics of non-neuronal cells in the central nervous system.** Adv. Mol. Cell Biol. 31: 1-51. 2004.

Wolosker, H.; Blackshaw, S. & Snyder, S.H. **Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13409-13414. 1999a.

Wolosker, H.; Sheth, K.N.; Takahashi, M.; Mothet, J.P.; Brady, R.O.Jr.; Ferris, C.D. & Snyder, S.H. **Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 721-725. 1999b.

Wood, P.L.; Rao, T.S.; Iyengar, S.; Lanthorn, T.; Monahan, J.; Cordi, A.; Sun, E.; Vazquez, M.; Gray, N. & Contreras, P. **A review of the in vitro and in vivo neurochemical characterization of the NMDA/PCP/glycine/ion channel receptor macrocomplex.** Neurochem. Res. 15: 217-230. 1990.

Wrana, J.L. & Attisano, L. **The Smad pathway.** Cytokine Growth Factor Rev. 11: 5-13. 2000.

Wrana, J.L.; Attisano, L.; Wieser, R.; Ventura, F. & Massague, J. **Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.** Nature 370: 341-347. 1994.

Wrana, J.L.; Carcamo, J.; Attisano, L.; Cheifetz, S.; Zentella, A.; Lopez-Casillas, F. & Massague, J. **The type II TGF-beta receptor signals diverse responses in cooperation with the type I receptor.** Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 57: 81-86. 1992.

Wu, S.; Barger, S.W. & Sims, T.J. **Schwann cell and epineural fibroblast expression of serina racemase.** Brain Res. 1020: 161-166. 2004a.

Wu, S.Z.; Bodles, A.M.; Porter, M.M.; Griffin, W.S.; Basile, A.S. & Barger, S.W. **Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide.** J. Neuroinflammation 1: 2. 2004b.

Xia, M.; Liu, Y.; Figueroa, D.J.; Chiu, C.S.; Wei, N.; Lawlor, A.M.; Lu, P.; Sur, C.; Koblan, K.S. & Connolly, T.M. **Characterization and localization of a human serine racemase.** Brain Res. Mol. 125: 96-104. 2004.

Yacubova, E. & Komuro, H. **Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration.** Cell Biochem. Biophys. 37: 213-234. 2003.

Yang, S.; Qiao, H.; Wen, L.; Zhou, W. & Zhang, Y. **D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8.** Neurosci. Lett. 379: 7-12. 2005.

Yasuda, E.; Ma, N. & Semba, R. **Immunohistochemical demonstration of L-serine distribution in the rat brain.** Neuroreport 12:1027-1030. 2001.

Yoon, K.; Nery, S.; Rutlin, M.L.; Radtke, F.; Fishell, G. & Gaiano, N. **Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors.** J. Neurosci. 24: 9497-9506. 2004.

Yoshimizu, T. & Chaki, S. **Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 315: 493-496. 2004.

Yuan, Y.; Lee, J.A.; Napier, A. & Cole, G.J. **Molecular cloning of a new intermediate filament protein expressed by radial glia and demonstration of alternative splicing in a novel heptad repeat region located in the carboxy-terminal tail domain.** Mol. Cell Neurosci. 10: 71-86. 1997.

Zhou, C.J.; Zhao, C. & Pleasure, S.J. **Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities.** J. Neurosci. 24: 121-126. 2004.

Zhu, X.; Bergles, D.E. & Nishiyama, A. **NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes.** Development 135: 145-157. 2008.

Zhu, Y.; Yang, G.Y.; Ahlemeyer, B.; Pang, L.; Che, X.M.; Culmsee, C.; Klumpp, S. & Kriegstein, J. **Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage.** J. Neurosci, 22: 3898-3909. 2002.

Zhu, Y.; Culmsee, C.; Klumpp, S. & Kriegstein, J. **Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways.** Neurosci. 123: 897-906. 2004.

## 8. ANEXOS

---

**8.1.** ROMÃO, L.; SOUSA, V.O.; MOURA NETO, V. & GOMES, F.C.A. **Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF- $\beta$ 1 pathways.** *J. Neurochem.* 106: 746-756. 2008.

**8.2.** SOUSA, V.O.; ALMEIDA, J.C.; ELLER, C.M. & GOMES, F.C.A. **Characterization of TGF- $\beta$ 1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes.** *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Animal* 42: 171-175. 2006.

**8.3.** GOMES, F.C.A.; SOUSA, V.O. & ROMÃO, L. **Emerging roles for TGF- $\beta$ 1 in nervous system development.** *Int. J. Dev. Neurosci.* 23: 413-424. 2005.

**8.4.** Aprovação do protocolo para utilização de animais em experimentos relacionados a esta tese.

# 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](#)