

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

EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS
DE ADESÃO DA GLIA EMBAINHANTE
OLFATÓRIA

Dissertação de mestrado submetida à Pós-Graduação em
Ciências Morfológicas – ICB – UFRJ

Felipe Márquez Piña Rodrigues

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS
DE ADESÃO DA GLIA EMBAINHANTE
OLFATÓRIA

Dissertação de mestrado submetida à Pós-Graduação em
Ciências Morfológicas – ICB – UFRJ

Aluno: Felipe Márquez Piña Rodrigues

Orientadoras: Cláudia dos Santos Mermelstein e

Leny Alves Cavalcante

2009

EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS DE ADESÃO DA GLIA EMBAINHANTE OLFATÓRIA

Felipe Márquez Piña Rodrigues

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas (PCM) como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.

Aprovada por:

Orientadora

Profa. Cláudia dos Santos Mermelstein (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

Orientadora

Profa. Leny Alves Cavalcante (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ)

Revisora

Profa. Cecília Hedin Pereira (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho- UFRJ)

Examinadora

Profa. Ana Maria Blanco Martinez (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

Examinadora

Profa. Penha Cristina Barradas Daltro Santos (Departamento Farmacologia e Psicobiologia- IB- UERJ)

Examinadora

Profa. Flavia Carvalho Alcantara Gomes (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

Suplente

Prof. Marcelo Santiago (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ)

Rio de Janeiro - Maio / 2009

Ficha Catalográfica

Rodrigues, Felipe Márquez Piña

Expressão e distribuição de proteínas de adesão da glia embainhante olfatória / Felipe Márquez Pina Rodrigues. Rio de Janeiro: UFRJ / PCM, 2009. 75pp, xv

Orientadoras: Cláudia dos Santos Mermelstein e Leny Alves Cavalcante.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, PCM, 2009.
1. Glia embainhante olfatória - 2. Proteínas de adesão - 3. Microdomínios Lipídicos.

Dedicatória: À minha família

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Agradecimentos

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, avós e ao Bi, pelo apoio, também financeiro, nos momentos difíceis.

A minhas orientadoras Cláudia Mermelstein e Leny Cavalcante pela atenção, apoio e ensinamentos científicos e morais.

Ao Serginho e Eliane pelo apoio e amizade dignas de uma família.

Aos demais colegas de laboratório, em especial a Vivi, minha companheira de IC e veterana de guerra.

A Fernanda e sua família pelo aconchego e muitos momentos de alegria e descontração.

Agradeço também a qualquer um que se ofenda por não ter sido mencionado e portanto, não teria mais motivo para tal.

Resumo

A glia embainhante olfatória (GEO) tem sido objeto de grande interesse em vista de sua habilidade inerente de suportar o crescimento axonal, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central, o que a torna um potencial agente para terapias celulares neuroregenerativas. Embora vários estudos venham demonstrando benefícios do transplante da GEO em modelos experimentais como os de lesão na medula espinal, alguns autores relatam uma regeneração limitada ou ausente, acompanhada de uma falha pouco compreendida da migração da GEO. Por este motivo, é de peculiar interesse o estudo das propriedades adesivas da GEO, para o melhor entendimento das bases moleculares de sua migração. No presente trabalho foi realizada uma análise das proteínas de adesão célula-matriz expressas pela GEO, *in vitro*, bem como seus respectivos padrões de marcação e distribuição em microdomínios de membrana (*rafts*). Nossos resultados demonstraram que a GEO exibe padrões definidos das proteínas de adesão β 1-integrina, α -actinina, vinculina, talina e expressão da cinase de adesão focal (FAK). Além disso, as proteínas β 1-integrina e a α -actinina foram predominantemente identificadas em frações de densidade correspondente às *rafts* da membrana celular.

Abstract

The olfactory ensheathing glia (OEG) has been subject of intense interest for its inherent ability to cross the limits of peripheral and central nervous system and, therefore, potential use for nervous system therapies. Although several studies reported beneficial results following OEG transplantation into lesion models, such as spinal cord injuries, other studies reported limited or absent regeneration accompanied by a poorly understood failure in OEG migration. For this reason, it is particularly interesting to study the properties of OEG's adhesion and, thus, the basis of its migration. In the present study we have carried out an analysis of cell-matrix proteins expressed by OEGs, *in vitro*, as well as its labeling patterns and distribution in membrane microdomains. Our results demonstrate that OEGs exhibit defined labeling patterns of the adhesion proteins β 1-integrin, α -actinin, vinculin, talin and also express focal adhesion kinase. Additionally, the proteins β 1-integrin and α -actinin were found in OEG's lipid rafts density fractions of the plasma membrane.

Lista de Abreviações

- BDNF** – fator neurotrófico derivado do cérebro
- BO** - bulbo olfatório
- BSA** – albumina sérica bovina
- CAM** – molécula de adesão celular
- CNPase** – 2'3'-nucleotídeo cíclico 3-fosfodiesterase
- DAPI** – 4, 6-diamidino-2-phenilindole
- DIC** - contraste interferencial diferencial
- DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- ECL** – “excelent chemoluminescent labeling” – marcador quimioluminescente
- EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- ERM** - ezrina-radixina-moesina
- FAK** - cinase de adesão focal
- GDNF** - fator neurotrófico derivado de linhagem glial
- GEO** - glia embainhante olfatória
- GFAP** - proteína ácida do filamento glial
- GM1** - monossialogangliosídeo
- GPI** - glicofosfatidilinositol
- GTPase** – proteína que hidrolisa guanina trifosfato (GTP)
- ILK** - cinase ligada a integrina
- MEC** - matriz extracelular
- N-CAM** – molécula de adesão celular neural
- NGF** – fator de crescimento de nervos
- NGFR** - receptor para fator de crescimento neuronal
- P75-NGFR** – receptor para fator de crescimento neuronal de baixa afinidade
- PBS** - tampão fosfato com salina
- PBS/Tween** – tampão fosfato com salina e monolaurato de polioxietilenosorbitano
- PSA** – ácido polisiálico
- PVDF** – “hydrophobic polyvinylidene difluoride membrane” – membrana difluoridro polivinilideno hidrofóbica
- SDS** – dodecil sulfato de sódio
- SNC** - sistema nervoso central
- SNP** – sistema nervoso periférico
- TBS** – solução tris base
- TRIS** – tris-hidroximetil-aminometano

TRITON X-100 – t-octilfenoxipolietoxietanol

VASP - fosfoproteína estimulada por vaso dilatador

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação do sistema olfatório primário de rato adulto.....	03
Figura 2: GEO e axônios olfatórios.....	08
Figura 3: Adesão célula matriz extracelular (MEC) via integrina.....	11
Figura 4: Microdomínios de membrana (<i>rafts</i>).....	20
Figura 5: Frações de densidade correspondentes à <i>rafts</i> em análise por dot-blotting de células isoladas da GEO.....	20
Figura 6: Composição de imagens em microscopia óptica de contraste de fase de células saídas de fatia enucleada de bulbo olfatório.....	31
Figura 7: Imunofluorescência para CNPase e S100 em células derivadas de explante de bulbo olfatório.....	32
Figura 8: Imunofluorescência para alfa-actina de músculo liso em células derivadas de explante de bulbo olfatório.....	33
Figura 9: Microscopia de fluorescência para actina filamentosa e núcleos de células derivadas de explante de bulbo olfatório.....	34
Figura 10: Microscopia de fluorescência de marcação para actina filamentosa e de núcleo de células derivadas de explante de BO.....	35
Figura 11: Microscopia de fluorescência de marcação de actina filamentosa e de núcleo em células saídas dos explantes de BO.....	36
Figura 12: Imunofluorescência para β 1-integrina em células derivadas de explante de bulbo olfatório	38
Figura 13: Análise por <i>Western blotting</i> mostrando a expressão da β 1 integrina no BO.....	39
Figura 14: Análise por <i>dot-blotting</i> do gradiente de sacarose mostrando mostrando marcação para β 1-integrina nas frações correspondente às <i>rafts</i>	39
Figura 15: Marcação para vinculina em células derivadas de explante de bulbo olfatório.. ..	41
Figura 16: Análise por <i>Western blotting</i> mostrando a expressão da vinculina no BO.....	42
Figura 17: Marcação para a proteína vinculina nas frações do gradiente de sacarose.....	42
Figura 18: Marcação com o anticorpo policlonal anti- α -actinina em células derivadas de explante de bulbo olfatório.....	44
Figura 19: Análise por <i>Western blotting</i> mostrando a expressão da α -actinina no BO.....	45

Figura 20: Análise por <i>dot-blotting</i> do gradiente de sacarose mostrando marcação para proteína α -actinina nas frações correspondente às rafts.....	45
Figura 21: Imunoratividade para talina em células derivadas de explante de bulbo olfatório.....	47
Figura 22: Análise por <i>Western blotting</i> mostrando a expressão da talina no BO.....	48
Figura 23: Análise por <i>Western blotting</i> mostrando a expressão da FAK no BO	48
Figura 24: Análise por Western blotting mostrando a expressão da FAK no BO	49
Figura 25: Resumo esquemático dos resultados apresentados	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos Primários	25
Tabela 2: Anticorpos Secundários	26
Tabela 3: Ligantes e Sondas	26

Índice

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de abreviaturas	x
Lista de ilustrações	xii
Índice de tabelas	xiii
Índice	xiv
1 - Introdução	01
1.1. Mucosa olfatória e bulbo olfatório	01
1.2. A glia embainhante olfatória (GEO)	04
1.1.2 Padrões morfológicos e de expressão de marcadores da GEO	04
1.2.3 GEO e axônios olfatórios	06
1.3. GEO e terapia celular	09
1.4. Adesão célula-matriz extracelular	12
1.4.1. Proteínas de adesão	13
1.4.2. Morfologia e composição das adesões	15
1.4.3 A adesão célula-matriz no sistema nervoso	16
1.4.4 A adesão da GEO	17
1.4.5. Adesão e microdomínios de membrana (<i>rafts</i>)	17
1.5. Relevância do estudo	21
2 - OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Animais	23
3.2. Culturas organotípicas do bulbo olfatório (BO)	23
3.3. Cultura de células isoladas da GEO	24
3.4. Microscopia óptica de imunofluorescência	24
3.4.1. Processamento digital das imagens de imunofluorescência	25
3.5. Preparação do homogenado da GEO	27
3.6. Dosagem de Proteínas	27
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	27
3.8. <i>Immunoblotting</i>	28

3.9. Isolamento de micro-domínios de membrana (“rafts”)	28
3.10. <i>Dot-blotting</i>	29
4 - RESULTADOS.....	30
4.1. Caracterização da cultura de células de bulbo olfatório	30
4.2. Expressão e distribuição de proteínas de adesão	37
4.2.1. β 1-integrina	37
4.2.2. Vinculina	40
4.2.3. α -actinina	43
4.2.4. Talina	46
4.2.5. FAK	49
5 - DISCUSSÃO.....	50
6 - CONCLUSÕES.....	58
7- PERSPECTIVAS	59
8 - BIBLIOGRAFIA.....	60
9- ANEXO	75

1. Introdução

1.1. Mucosa olfatória e bulbo olfatório

O sistema olfatório dos vertebrados consiste da mucosa olfatória e de várias estruturas centrais dentre as quais está o bulbo olfatório. A mucosa olfatória é localizada na cavidade nasal e é formada por um neuroepitélio superficial, avascular e pseudoestratificado, bem como por uma lamina própria subjacente (Purves et al., 2001).

Basicamente três tipos celulares formam o neuroepitélio de mamíferos: os neurônios receptores olfatórios, as células basais (horizontais e globosas) e as células suporte, ou sustentaculares (Graziadei e Monti-Graziadei, 1978; Firestein, 2001; Carter et al. 2004). As células globosas basais são neuroblastos capazes de dar origem aos neurônios olfatórios, cuja vida média é de aproximadamente 30 dias em humanos (Graziadei e Monti-Graziadei, 1978). As células basais horizontais dão origem a células neuronais, não neuronais e progenitoras da mucosa olfatória (Carter et al., 2004). As células de suporte são células colunares não neuronais localizadas ao longo do neuroepitélio e estão envolvidas, juntamente com as glândulas de Bowman, na produção de secreção mucosa (Getchell e Mellert, 1991 em Rodriguez et al., 2008), o que protege os neurônios receptores olfatórios e formam complexos juncionais com outras células de suporte. Além disso, estas células contêm enzimas capazes de catabolizar componentes orgânicos possivelmente danosos que venham a entrar na cavidade nasal (Purves et al., 2001).

A lâmina própria é uma camada de tecido conjuntivo fibroso subjacente ao neuroepitélio olfatório. Nesta camada estão presentes feixes de axônios olfatórios, vasos sanguíneos (Purves et al., 2001), feixes de nervos periféricos e células gliais características do sistema olfatório, denominadas glia embainhante olfatória (GEO).

O bulbo olfatório (BO) está localizado na porção anterior do crânio de mamíferos e consiste em seis camadas distintas (da porção interna para externa):

camada de células granulares, camada plexiforme interna, camada de células mitrais, camada plexiforme externa, camada glomerular e camada de fibras olfatórias, onde a GEO pode ser encontrada (Doucette, 1984; 1990). O BO é caracterizado como uma estrutura de aquisição permanente de axônios sensitivos primários (Graziadei e Monti-Graziadei, 1978), bem como de certas classes de interneurônios (Alvarez-Builla e Temple, 1998). Neurônios olfatórios primários estão localizados no epitélio da cavidade nasal e projetam seus axônios ao bulbo olfatório (sistema nervoso central- SNC), onde fazem sinapses com dendritos de neurônios mitrais, tufofos e periglomerulares (Hinds e Hinds, 1976) (**Figura 1**).

Os neurônios olfatórios primários têm origem na camada mais profunda do epitélio olfatório (Weiler e Farbman, 1997). Após serem gerados, migram apicalmente através do epitélio olfatório e estendem um dendrito apical e um axônio basal. Os axônios formados permanecem amielínicos e formam agrupamentos (*fila olfatória*) que trafegam através da camada basal, tecido conjuntivo e placa cribiforme. Esses axônios são capazes de navegar ao longo do nervo olfatório, atravessar a pia-máter, entrar no SNC, navegar pela camada de fibras olfatórias do BO e chegar aos glomérulos, onde fazem sinapses com seus respectivos neurônios alvo (Doucette, 1990). Esta capacidade de neurônios olfatórios recentes estenderem seus axônios ao BO persiste mesmo após a transecção da *fila olfatoria* ou administração intra-nasal de certas drogas neurotóxicas. Nessas circunstâncias, e de forma semelhante em indivíduos normais, precursores neurais dão origem a neurônios que projetam seus axônios pelo SNC até seus alvos no BO (Deckner et al., 1997). Isto sugere diferenças entre o BO e o restante do SNC adulto, no qual há falhas na regeneração axonal, que são frequentemente atribuídas à ativação de células inflamatórias, astrogliose reativa e a produção de moléculas tanto promotoras quanto inibitórias do crescimento axonal (Fitch e Silver, 2008).

Além da presença de oligodendrócitos, astrócitos e microglia o BO possui um tipo especial de glia, a glia embainhante olfatória (GEO). Este tipo de célula glial é encontrado em camadas do BO por onde atravessam axônios olfatórios. Nestas camadas, a GEO promove o embainhamento de axônios de neurônios olfatórios, organizando-os em fascículos, desde sua saída da mucosa olfatória até sua chegada ao bulbo olfatório (Doucette, 1984).

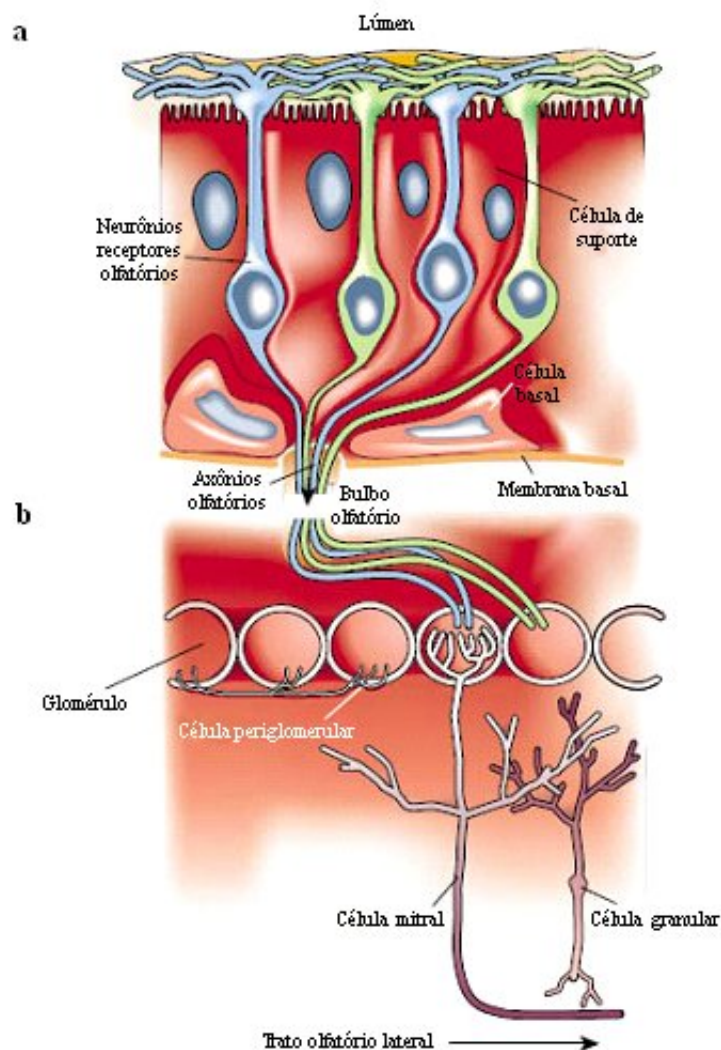


Figura 1- Representação do sistema olfatório primário de rato adulto. **a**, O neuroepitélio olfatório é formado basicamente por três tipos celulares: neurônios receptores olfatórios, células de suporte e células basais. **b**, Neurônios do epitélio olfatório projetam seus axônios aos glomérulos do bulbo olfatório (sistema nervoso central), onde fazem sinapses principalmente com neurônios mitrais. Os interneurônios periglomerulares e granulares participam do processamento do estímulo olfatório. (adaptado de Firestein, 2001).

1.2. A glia embainhante olfatória (GEO)

Descoberta por um neurocientista espanhol, T. Blañes, a GEO é uma célula glial originada do epitélio do placódio olfatório (Fitch e Silver, 2008). A GEO é encontrada na lâmina própria da mucosa olfatória, no nervo olfatório e na camada de fibras nervosas do bulbo olfatório e possivelmente na camada glomerular (Valverde, 1992), sendo portanto a única glia conhecida com a capacidade de atravessar o limite entre SNP e o SNC (Doucette, 1984; Au e Roskams, 2003).

1.2.2. Padrões morfológicos e de expressão de marcadores da GEO

Ao longo dos anos, diversos trabalhos vêm levantando questões quanto às propriedades da GEO *in vitro* e *in vivo*. Estas questões relacionam-se ao fato desta célula ser fenotipicamente similar tanto às células de Schwann quanto aos astrócitos. *In vivo*, a GEO apresenta características similares às de astrócitos (Doucette, 1984; Devon e Doucette, 1992; Barnett et al., 1993). Por sua vez, *in vitro*, a GEO compartilha diversas características com células de Schwann não mielinizantes (Doucette, 1995). Por exemplo, a GEO expressa o receptor para fator de crescimento neuronal de baixa afinidade (p75-NGFR), que também é expresso por células de Schwann. Além disso, a GEO também é capaz de expressar a proteína ácida do filamento glial (GFAP) e a proteína ligadora de cálcio associada ao citoesqueleto S100, sendo as duas últimas expressas tanto por astrócitos quanto por células de Schwann (Au e Roskams, 2003).

Doucette (1984) sugeriu que células embainhando axônios densamente agrupados talvez fossem astrócitos imaturos, ou mesmo uma variante do astrócito típico. Contudo, foi também observado que tais células embainhantes estavam continuamente em contato com os axônios olfatórios, enquanto os prolongamentos de astrócitos nunca haviam sido observados embainhando tais axônios, mesmo na camada glomerular.

A GEO é capaz de apresentar diversos fenótipos tanto *in vivo* (Pixley, 1992) quanto *in vitro* (Ramón-Cueto e Valverde, 1995). Inicialmente, Ramón-Cueto e Nieto-Sampedro (1992) demonstraram, por imunocitoquímica, a presença de quatro morfologias distintas da GEO em culturas do BO de ratos adultos. Dois desses fenótipos também estavam presentes em culturas derivadas do BO de embriões de rato (Doucette, 1990). Contudo, em um estudo seguinte, Ramón-Cueto e colaboradores (1993) demonstraram que existiam apenas três populações de GEO em culturas derivadas do BO, uma vez que dois dos quatro fenótipos observados correspondiam a uma mesma população de GEO. Resultados similares também foram observados em culturas da mucosa olfatória (Liu et al., 2005).

As três populações de GEOs foram descritas como “Schwann cell-like OECs”, ou GEOs similares à células de Schwann (com referência às células de Schwann não mielinizantes), “astrocyte-like OECs”, ou GEOs similares à astrócitos (com referência aos astrócitos do tipo 1) e a terceira população, nem sempre detectável *in vitro*, como “macrophage like cells”, ou células semelhantes a macrófagos (Doucette, 1990; Liu et al., 2005). As GEOs semelhantes às células de Schwann são células bipolares fusiformes e alongadas com uma fraca marcação para GFAP, do tipo central (Barber e Dahl, 1987), e uma intensa marcação para p75-NGFR (Ramón-Cueto e Nieto-Sampedro, 1992). Já as GEOs similares a astrócitos são células aplanadas com diversos prolongamentos, possuindo marcações intensas para E-NCAM e GFAP, também do tipo central (Barber e Dahl, 1987), ao passo que virtualmente nenhuma marcação para p75-NGFR (Franklin e Barnett, 1997).

No nervo olfatório e na camada de fibras olfatórias além das proteínas já mencionadas, a GEO também pode expressar a CNPase, O4, PSA-NCAM e N-CAM (Valverde et al., 1992; Barnett et al., 1993; Franceschini e Barnett, 1996; Astic et al., 1998; Santos-Silva e Cavalcante, 2001; Jahed, 2007). Este repertório de expressão, no

entanto, é compartilhado por outras células neurais, o que dificulta a identificação da GEO, em especial dentre astrócitos e células de Schwann. A questão é evidenciada na possibilidade de contaminação de culturas da GEO bulbar por astrócitos e da GEO periférica por células de Schwann presentes em nervos do tecido olfatório periférico (Doucette, 1984; Kawaja et al., 2009). Estudos recentes, portanto, vêm buscando potenciais biomarcadores para uma identificação mais precisa da GEO. Dentre estes pode-se citar a α -actina de músculo liso (Jahed et al., 2007), bem como uma variedade de proteínas associadas a actina, como calponina, caldesmona (isoforma leve), tropomiosina e transgelina (Kawaja et al., 2009).

1.2.3. GEO e axônios olfatórios

Os neurônios olfatórios primários são continuamente repostos durante a vida adulta (Graziadei e Monti-Graziadei, 1978; Deckner et al., 1997) o que requer a existência no bulbo olfatório de um ambiente favorável ao crescimento de axônios e à reorganização persistente das conexões sinápticas. Esta condição é dada provavelmente pela capacidade da GEO de secretar fatores tróficos como NGF, BDNF, GDNF, moléculas de adesão celular como L1 e N-CAM e elementos de matriz extracelular como laminina, fibronectina e colágeno (Ramón-Cueto e Valverde, 1995; Franceschini e Barnett, 1996; Ramón-Cueto e Avila, 1998; Chuah et al., 2000; Chuah e West, 2002). Uma outra possibilidade é que o embainhamento isole os axônios olfatórios em crescimento, evitando seu contato com moléculas quimiorrepelentes (Pasterkamp et al., 1998).

Já referida como células de Schwann olfatórias (Chuah e Au, 1991), a GEO envolve os axônios olfatórios não mielinizados de pequeno diâmetro (0,1- 0,7 μm) que saem do epitélio olfatório, seguem através da lâmina própria e cruzam a placa cribiforme rumo a seus alvos no bulbo olfatório (**Figura 2**). Ao saírem de seus corpos

celulares no epitélio olfatório, estes axônios segregam-se em grupos específicos para formar os fascículos do nervo olfatório (Doucette, 1984), que são caracteristicamente delimitados por uma camada de fibroblastos (Nedelec et al., 2005). Os fascículos do nervo olfatório juntos formam o nervo olfatório (Doucette, 1984).

No interior de cada fascículo olfatório estão localizados múltiplos feixes de GEO, que variam em diâmetro de 2 a 20 μm . A GEO é uma célula aplanada do ponto de vista ultraestrutural (Li et al., 2005), apresentando um citoplasma elétron-denso (Barnett et al., 1993), filamentos dispersos (Doucette, 1984) e um grande núcleo ovóide localizado próximo a superfície da célula (Doucette, 1995 e Boyd et al., 2005). Cada GEO projeta finos prolongamentos que envolvem de centenas a milhares de agrupamentos compactos de axônios olfatórios não mielinizados (Nedelec et al., 2005). Esta célula glial se arranja estruturalmente de modo a formar túneis para prover um ambiente favorável ao crescimento e direcionamento dos axônios olfatórios. A GEO facilita os axônios sensoriais olfatórios a atingirem o BO e a formar conexões sinápticas apropriadas com os dendritos de células mitrales, periglomerulares e tufosas, localizadas na camada glomerular do BO (Valverde et al., 1992).

À medida que os axônios atingem o bulbo olfatório, estes começam a defascular, perdendo seu envoltório de fibroblastos, formando feixes mais espessos de GEO e finalmente criando a camada de fibras olfatórias na porção externa do BO (Nedelec et al., 2005).

Em função de seu envolvimento na promoção do crescimento e direcionamento de axônios olfatórios através do limite entre SNP e SNC, a GEO tornou-se um valioso alvo de estudos no ramo de terapias celulares neuroregenerativas (Doucette, 1995).

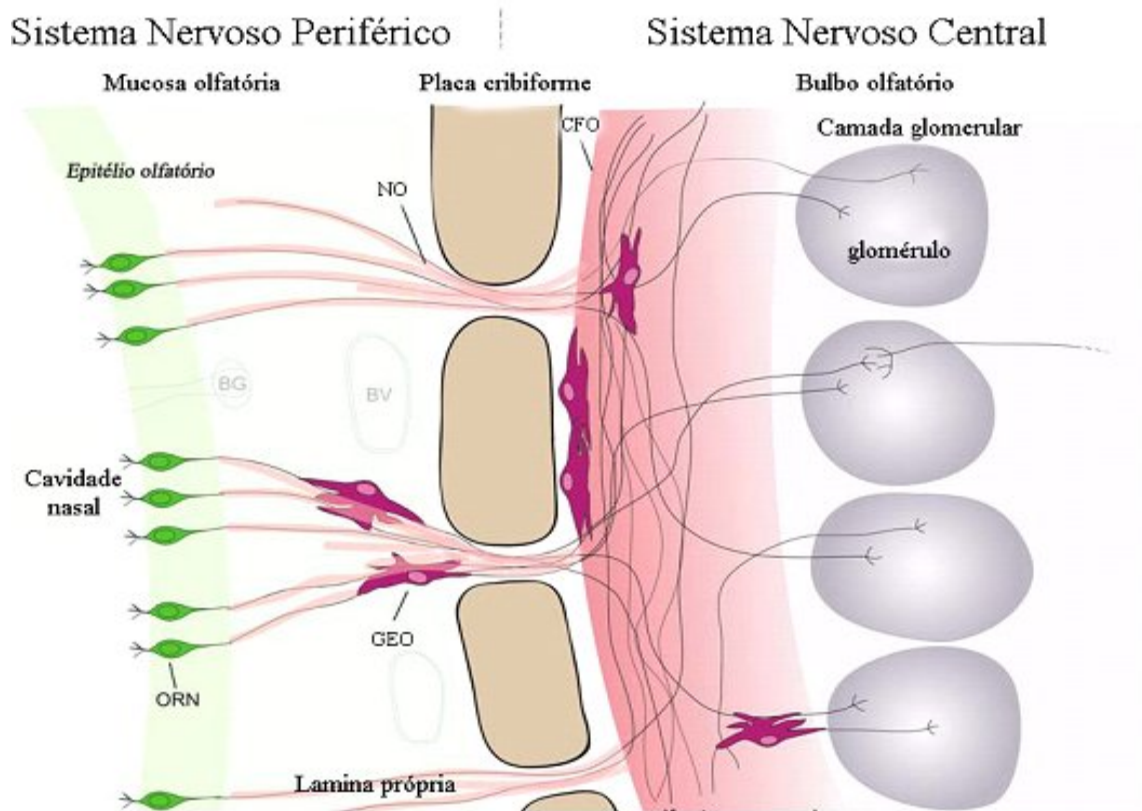


Figura 2- GEO e axônios olfatórios. A glia embainhante olfatória (células rosa escuro) embainha os axônios olfatórios (nervos olfatórios) ao longo do caminho através da lamina própria no sistema nervoso periférico. Axônios olfatórios e suas GEOs seguem através da placa cribiforme até o sistema nervoso central envolvendo o BO para formar a camada de fibras olfatórias. A camada de fibras olfatórias é formada por uma camada externa e interna, composta por grupos de axônios e pela GEO. Os axônios, em seguida se estendem sem a aposição da GEO até o glomérulo, fazendo sinapses com dendritos de células alvo (adaptado de Vincent e colaboradores, 2005).

1.3. GEO e terapia celular

As propriedades intrínsecas da GEO tem sido aproveitadas em modelos experimentais no tratamento de lesões na medula espinal, na esperança de se alcançar a regeneração de axônios. O estudo de Ramón-Cueto e Nieto-Sampedro (1994) foi o primeiro a demonstrar os efeitos benéficos do implante de GEOs na medula espinal lesionada. Este grupo implantou células da GEO bulbares na entrada da raiz dorsal de animais adultos submetidos a transecção da medula espinal. Nas três semanas seguintes ao implante, pode-se observar a regeneração de axônios do gânglio da raiz dorsal na medula espinal. A partir desta investigação pioneira, pesquisadores têm usado a GEO como uma estratégia terapêutica para favorecer a regeneração axonal em diversos modelos de lesões na medula espinal. O implante de GEO tem sido também utilizado experimentalmente em distúrbios neurológicos, como o mal de Parkinson (Agrawal et al., 2004; Dewar et al., 2007).

As pesquisas com o implante de GEO apresentam muitas vezes resultados contraditórios entre si, possivelmente resultantes de diferenças metodológicas como a origem da célula usada (do bulbo/ mucosa), o modelo de lesão na medula (por transecção, esmagamento ou irradiação por raio-x), o trato de axônios e mesmo o período de recuperação. O experimento de Lu e colaboradores (2006) onde GEOs da mucosa olfatória foram implantadas na medula espinal submetida a transecção total, resultou em uma recuperação funcional e em maior regeneração de axônios serotoninérgicos. Um estudo similar, utilizando GEOs embrionárias do bulbo olfatório, também resultou em recuperação funcional e recrescimento axonal através da região lesionada (Lopez-Vales et al., 2007). Outros resultados positivos foram também demonstrados após o implante de GEOs bulbares ou da mucosa, em diversos modelos de lesão medular (Li et al., 1997; Plant et al., 2003; Chuah et al., 2004; Ramer et al., 2004; Deumens et al., 2006).

Além de promover o crescimento axonal, estudos como o de Imaizumi e colaboradores (1998) relataram que a GEO é capaz de remielinizar axônios lesionados. Entretanto, essa remielinização não é sempre observada. O experimento de Li e colaboradores (2008), por exemplo, constatou que o transplante de GEO no nervo [óptico lesionado resulta em regeneração, mas não em remielinização dos axônios.

A despeito das investidas bem sucedidas, alguns estudos como o realizado por Takami e colaboradores (2002) demonstraram uma falha na regeneração axonal após o implante de GEO bulbares na medula espinhal lesionada. Além disso, Lu e colaboradores (2006) demonstraram que GEOs derivadas da mucosa falham em dar suporte ao crescimento de axônios corticoespinhais após transecção medular. A razão do insucesso não é conhecida e pode estar ligadas às condições do local para onde as células foram transplantadas, à forma como foi conduzido o transplante, bem como as características intrínsecas da própria célula. Um dado importante ressaltado pelos autores foi que não se observou a migração da GEO a partir do sítio de injeção. Situação semelhante foi observada por Gudiño-Cabrera e colaboradores (2000), onde os autores sugerem que a regeneração axonal seria possível apenas se a direção da migração coincidissem com a direção do crescimento axonal. Entretanto, mais estudos abordando as propriedades da motilidade da GEO, como é o caso do processo de adesão, são necessários para um melhor entendimento dos fatores envolvidos na migração desta célula.

1.4. Adesão célula-matriz extracelular

O processo de migração, bem como os eventos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular estão diretamente ligados à adesão da célula à matriz extracelular (Thiery e Petit, 2000). Tanto a adesão de uma célula ao substrato como a sua capacidade migratória, dependem de uma série de interações dinâmicas entre receptores de membrana plasmática, proteínas de adesão intracelulares e proteínas da matriz extracelular (MEC) (**Figura 3**). A interação da célula com a matriz extracelular desencadeia uma cascata de respostas essenciais para a regulação de suas funções e de seu comportamento, além de fornecer à célula um ambiente físico aonde ela irá se desenvolver.

A MEC é basicamente formada por dois tipos de macromoléculas: os glicosaminoglicanos (GAGs), frequentemente encontrados em associação com proteínas, formando proteoglicanos, e proteínas fibrosas como o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina (Alberts et al., 2002). A fibronectina e a laminina possuem particular importância em eventos de adesão da célula a MEC. Ambas as proteínas possuem múltiplos sítios de ligação capazes de promover uma associação entre o colágeno e outros componentes da MEC a proteínas de adesão da família das integrinas, na membrana celular (Lodish et al., 2000).

As primeiras descrições de estruturas adesivas entre células crescidas em cultura e a MEC foram feitas utilizando microscopia óptica de contraste interferencial (DIC) e microscopia eletrônica (Abercrombie et al., 1971; Abercrombie e Dunn, 1975; Izzard e Lochner, 1976; Izzard e Lochner, 1980 - citados por Zamir e Geiger, 2001). Estes trabalhos mostraram que as adesões célula-MEC ocorrem em numerosas regiões especializadas e de pequeno diâmetro (poucos micrômetros) na porção da membrana celular em contato com o substrato, as quais foram denominadas contatos ou adesões focais (Zamir e Geiger, 2001).

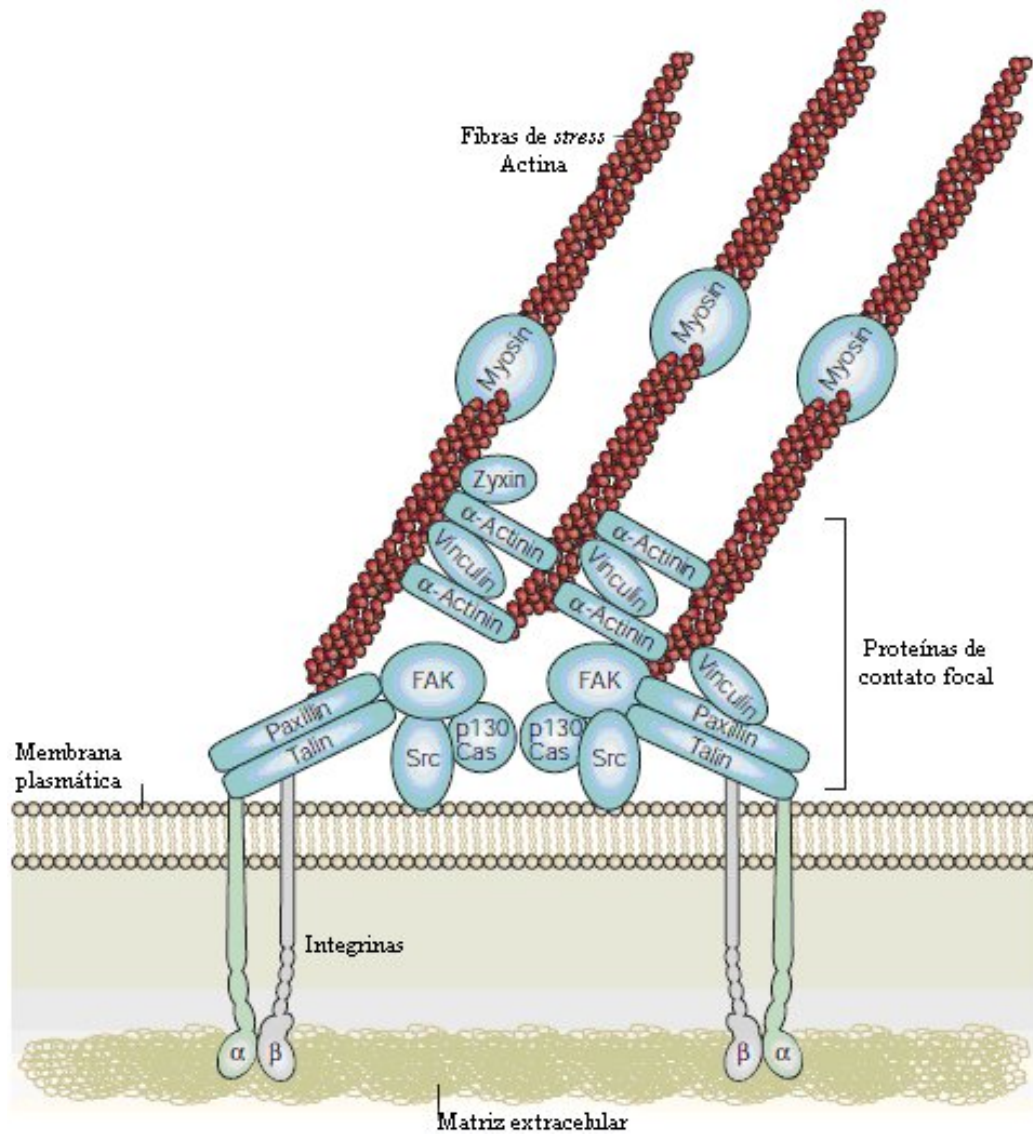


Figura 3 - Adesão célula matriz extracelular (MEC) via integrina. Moléculas de integrinas são capazes de se ligar a componentes específicos da matriz extracelular e à proteínas de adesão intracelulares, que por sua vez promovem a sua ancoragem e regulação ao citoesqueleto de actomiosina (adaptado de Mitra et al., 2005).

1.4.1. Proteínas de adesão

As adesões focais e suas variações (detalhadas adiante) são formadas pelas chamadas proteínas de adesão, as quais estão envolvidas em complexas cadeias de interações que culminam em diferentes eventos como a adesão, migração, diferenciação celular e apoptose. Os componentes mais importantes destas adesões são proteínas transmembranares da família das integrinas, que formam complexos com diversas proteínas citoplasmáticas, como vinculina, α -actinina, talina, FAK e com a matriz extracelular (**Figura 3**).

As integrinas são receptores heterodiméricos transmembranares de aproximadamente 140 kDa compostos por uma subunidade α e outra β (Humphries et al., 2006). As diferentes combinações de subunidades das integrinas conferem a especificidade da proteína a substratos específicos. Além disso, sinalizações intracelulares podem regular a afinidade dessas proteínas aos seus ligantes (Calderwood, 2004). A associação do domínio extracelular de integrinas a componentes específicos da MEC é crucial para eventos como a defesa contra patógenos, coagulação sanguínea, sobrevivência e migração celular. Estes eventos desencadeiam-se da ligação da integrina através de sua cauda citoplasmática com proteínas capazes de ativar diversas vias de sinalização, bem como promover sua ancoragem e regulação ao citoesqueleto de actomiosina (Yamada et al., 2001; Evans e Calderwood, 2007).

A vinculina é uma proteína de aproximadamente 117 kDa encontrada em adesões focais e junções aderentes. Esta proteína pode se ligar a proteínas de adesão como a talina, paxilina e α -actinina, promovendo o ancoramento de integrinas ao citoesqueleto de actomiosina (Mierke et al., 2008). Experimentos com pinças ópticas revelaram que o recrutamento de vinculina e talina às adesões focais produz um rápido aumento na força de adesão ao substrato (Galbraith et al., 2002; Giannone et al., 2003). Além disso, células *knock-out* para vinculina perdem força de adesão, o que resulta em

uma redução de 50% da área de extensões citoplasmáticas e um aumento de 50% na velocidade de migração (Goldmann et al., 1995; Ezzell et al. 1997). Em humanos, doenças cardíacas como a cardiopatia dilatada foram associadas a mutações da isoforma muscular meta-vinculina (Maeda et.al., 1997).

A α -actinina é uma proteína homodimérica ligadora de actina presente em adesões focais (Jockusch et al., 1995). A forma não muscular desta proteína possui aproximadamente 100 kDa. Além da capacidade de unir filamentos de F-actina, a α -actinina também pode ligar estes filamentos a componentes da adesão focal como a vinculina, β 1, β 2 e β 3 integrinas (Jockusch et al, 1995; Burridge e Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Experimentos com células submetidas à microinjeções de α -actinina mostraram que esta proteína se liga à cauda citoplasmática da β integrina (Cattelino et al., 1999). Entretanto esta ligação não é suficiente para promover o recrutamento de F-actina (Cattelino et al., 1999). A superexpressão de α -actinina em fibroblasto leva as regiões de adesão mais estáveis ao passo que bloqueio dos sítios de adesão desta proteína à integrina perturba a formação de fibras de *stress* e sinalizações relacionadas à tensão mecânica de fibroblastos e osteoclastos (Jockusch et al., 1995).

A talina é uma proteína de aproximadamente 270 kDa que pode apresentar forma monomérica ou dimérica (Molony et al., 1987). Esta proteína está localizada em regiões de adesão célula-matriz, podendo se ligar à actina, integrinas, FAK, vinculina, bem como a fosfolipídios (Jockusch et al., 1995). A concentração de talinas é um dos processos iniciais na formação de adesões focais e é dependente da presença de integrinas, mas não vinculina (Moulder et al., 1996). Sabe-se que a talina é essencial para a ativação de integrinas e para a fraca associação inicial destas proteínas a filamentos de actina (Wegener et al., 2007). O bloqueio da ação da talina por anticorpos específicos ou bloqueio da tradução é capaz de perturbar a formação de fibras de *stress*, bem como inibir a adesão, migração e a extensão citoplasmática de fibroblastos

(Nuckolls et al., 1992).

A FAK é uma proteína tirosina-cinase de aproximadamente 125 kDa que tem importante papel em diversos eventos celulares, incluindo a adesão e migração. Esta proteína promove a migração celular através de sua capacidade de integrar sinais provenientes de integrinas e receptores de fatores de crescimento (Sieg et al., 2000). Em resposta a estes sinais a FAK pode fosforilar diversas proteínas, bem como a si própria, o que cria sítios de ligação em sua estrutura para membros da família Src de cinases (Schaller et al., 1994). Esta ligação, em especial, é importante para a plena ativação da FAK, o que possibilita a fosforilação de diversas proteínas envolvidas na regulação da motilidade celular, como a p130Cas (Tachibana et al., 1997) e paxilina (Bellis et al., 1995) (**Figura 3**). Estudos recentes demonstraram que a FAK regula a formação de lamelipódios e o *turnover* das adesões focais em fibroblastos (Webb et al., 2004). Além disso, a superexpressão desta proteína foi associada a tumores, como do colo do útero e pulmonares (Owens et al., 1995).

1.4.2. Morfologia e composição das adesões

A adesão célula-MEC apresenta cinco subdivisões: adesão focal, adesão fibrilar, complexos focais, podossomos e a adesão 3D. A adesão focal ou contato focal compõe-se de estruturas planas e alongadas, frequentemente localizadas próximas à periferia das células e que as ligam fortemente ao substrato. Entre as proteínas envolvidas estão a vinculina, a talina, a paxilina e a α -actinina (Thiery e Petit, 2000; Yamada et al., 2001). A adesão fibrilar, por sua vez, pode ser alongada ou pontual e seus componentes típicos são a fibronectina extracelular, o receptor $\alpha 5\beta 1$ integrina e a proteína citoplasmática tensina (Yamada et al., 2001). Outro tipo de adesão celular são os complexos focais, que são compostos por pequenos pontos, presentes nas margens dos lamelipódios. São precursores da adesão focal. Os podossomos são estruturas cilíndricas

pequenas que contém proteínas típicas de contato focal, como a vinculina e paxilina, bem como outras próprias desse tipo de adesão, como a gelsolina (Yamada et al., 2001). A adesão 3D, por fim, foi a mais recentemente descrita e é caracterizada pela presença de marcadores da adesão focal, como a vinculina e paxilina, bem como da adesão fibrilar, como a $\alpha 5\beta 1$ integrina (Cukierman et al., 2001). A adesão 3D é a presente em tecidos *in vivo*, enquanto que as outras adesões são as presentes em situações *in vitro*.

Ao longo da última década diversos trabalhos demonstraram que as regiões de adesão célula-MEC são dinâmicas, variando a morfologia do contato, bem como a composição de proteínas ali presentes. Esta variação corresponde a uma resposta celular a um dado ambiente ou estímulo e representa um mecanismo capaz de modular as forças motrizes da célula. Neste princípio, surgiu o termo “modelo de maturação” das adesões, no qual os cinco tipos de adesão podem representar diferentes etapas do processo adesivo. Segundo este modelo, forças exercidas pelo citoesqueleto agrupam integrinas em pequenos pontos da membrana, formando inicialmente complexos focais e em seguida adesões focais, ancorando feixes de actina e mediando uma forte adesão ao substrato (Geiger et al., 2001; Geiger e Bershadsky, 2001; Adams, 2002). A adesão focal serve como ponto de ancoramento a partir do qual as integrinas são translocadas em direção ao corpo celular (Pankov et al., 2000; Geiger et al., 2001), dando origem às adesões fibrilares. Em um exemplo *in vitro*, células de culturas bidimensionais capazes de gerar MEC podem eventualmente ter de adaptar-se a uma arquitetura tridimensional, o que seria marcado pelo surgimento das adesões 3D.

1.4.3. A adesão célula-matriz no sistema nervoso

No sistema nervoso central, integrinas contendo as subunidades $\beta 1$ e αv são expressas em diversos tipos celulares, incluindo neurônios, glia, células da meninge e células endoteliais (Einheber et al., 2001). Integrinas contendo a subunidade $\beta 2$ são

encontradas em células da microglia, onde desempenham função imune de forma semelhante ao que ocorre em leucócitos (Koenigsknecht e Landreth, 2004). As integrinas são também importantes reguladores de proliferação e migração de oligodendrócitos (Baron et al., 2002). Cones de crescimento expressam a $\alpha 5\beta 1$ integrina, envolvida no direcionamento axonal (Gardiner et al., 2007). A proteína extracelular trombospondina, que se liga às integrinas, é produzida por astrócitos e participa de processos de formação de sinapses (Christopherson et al., 2005). Contudo, o papel das integrinas na adesão neural é melhor caracterizado no sistema nervoso periférico, onde estas proteínas tem papel crucial na formação da junção neuromuscular (Burkin et al., 2000). Ainda no sistema nervoso periférico, células de Schwann se ligam à matriz extracelular via integrinas (Einheber et al., 1993; Feltri et al., 1994). Além da integrina, a molécula distroglicano foi observada como um receptor secundário de laminina em células de Schwann (Colognato et al., 2007).

1.4.4. A adesão da GEO

As propriedades adesivas e, portanto, migratórias da GEO ainda são pouco conhecidas. Trabalhos recentes vêm demonstrando que esta célula migra por meio de ondulações de membrana (*lamelipodial waves*) e que tal evento pode ser perturbado pela inibição do fator neurotrófico derivado de linhagem glial (GDNF) e de SRC cinases (Windus et al., 2007). Su e colaboradores (2007) demonstraram que a proteína Nogo-66 é capaz de inibir a formação de projeções citoplasmáticas (possivelmente as referidas ondulações de membrana) por meio da ativação da GTPase RhoA, aumentando assim a adesão celular e bloqueando a migração da GEO.

1.4.5. Adesão e microdomínios de membrana (*rafts*)

Microdomínios de membrana, também conhecidos como *lipid rafts*, são regiões

diferenciadas de menor fluidez da membrana plasmática, ricas em colesterol, esfingolípídios e proteínas ancoradas por glicofosfatidilinositol (GPI) (Brown e London, 2000; Simons et al., 2000) (**Figura 4**). O gangliosídeo GM1 e as proteínas flotilinas estão altamente enriquecidas em *rafts* e por isso são consideradas marcadores destes microdomínios. Diversos métodos são utilizados para o isolamento das *lipid rafts*. Contudo, a ferramenta bioquímica tradicional consiste no isolamento dos microdomínios com 1% de Triton X-100 a 4°C.

As *rafts* podem participar de importantes eventos celulares, incluindo a transdução de sinais, tráfego de vesículas, organização do citoesqueleto e invasão de patógenos (Munro, 2003). Muitos dos eventos de transdução de sinais a partir das *rafts* resultam na adesão da célula à MEC, o que é mediado por integrinas e proteínas associadas (Del Pozo, 2004; Palazzo, 2004). De fato, diversos trabalhos vêm identificando associações entre proteínas de adesão e *rafts*, o que possivelmente teria implicações em vias de sinalização membrano-esqueletais ou mesmo na endocitose e tráfego de vesículas (Nebl et al., 2002; Li et al., 2003).

Adesões via integrina são capazes de regular a distribuição das *rafts* na membrana, de modo que a perda destas adesões resulta na internalização de até 90% de marcadores destes microdomínios, como o GM1 e proteínas ancoradas por GPI (Del Pozo, 2004). No sistema nervoso sabe-se, por exemplo, que a localização de β 1-integrinas em *rafts* é importante pra a sobrevivência de oligodendrócitos e crescimento neurítico (Baron, 2003; Decker et al., 2004; Ichikawa et al., 2009). Além das integrinas, outras proteínas de adesão como a vinculina, α -actinina e talina têm sido co-localizadas com marcadores destes microdomínios em diferentes tipos celulares (Morford, 2002; Nebl et al., 2002; Li et al., 2003; Decker, 2004; Mavlyutov, 2007; Ichikawa, 2009).

A interação entre as adesões via integrina e as *rafts* pode ter grande importância na migração celular. Sabe-se, por exemplo, que estabilização de microtúbulos em

prolongamentos de membrana é dependente da associação de uma proteína GTPase Rho e sua molécula efetora mDia em microdomínios de membrana ricos no gangliosídeo GM1 (Palazzo, 2001). A proteína FAK, principal mediadora de sinais via integrina, é crucial neste processo, possivelmente atuando na regulação da distribuição das *rafts* na membrana plasmática (Palazzo, 2004). Desta forma, contatos focais formados no prolongamento membranar promoveriam a manutenção e, portanto, a concentração regional de *rafts*, possibilitando assim a sinalização para a estabilização local de microtúbulos.

As *rafts* vêm sendo identificadas e caracterizadas em células de diferentes tecidos, incluindo oligodendrócitos, no sistema nervoso (Gielen et al., 2006). Essa caracterização é fundamental para o estudo da distribuição e funcionamento de componentes celulares cuja função possa estar atrelada a microambientes ou regiões de menor fluidez da membrana celular (Lucero e Robbins, 2004). A caracterização das *rafts* da GEO é parte integrante da *dissertação de mestrado de Fernanda Souza de Oliveira Campos (sob orientação das professoras: Georgia Correa Atella, Instituto de Bioquímica Médica e Leny Alves Cavalcante, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho). Seus dados revelam que as *rafts* da GEO encontram-se nas frações 4, 5 e 6 de gradientes de sacarose, processados por *dot-blotting* e submetidos à *immunoblotting* para os marcadores de *rafts* GM1 e flotilina (**Figura 5**).

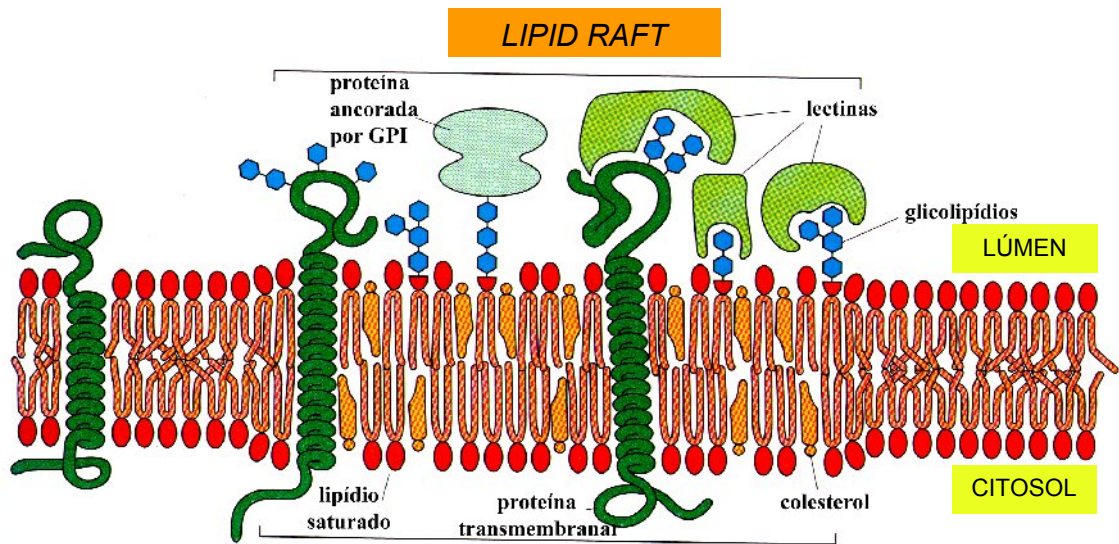


Figura 4 - Microdomínios de membrana (*rafts*). As *rafts* são regiões diferenciadas da membrana celular, caracterizadas pela alta concentração de colesterol, esfingolipídios e proteínas ancoradas por glicofosfatidilinositol (GPI) (adaptado de Alberts et al., 2002).

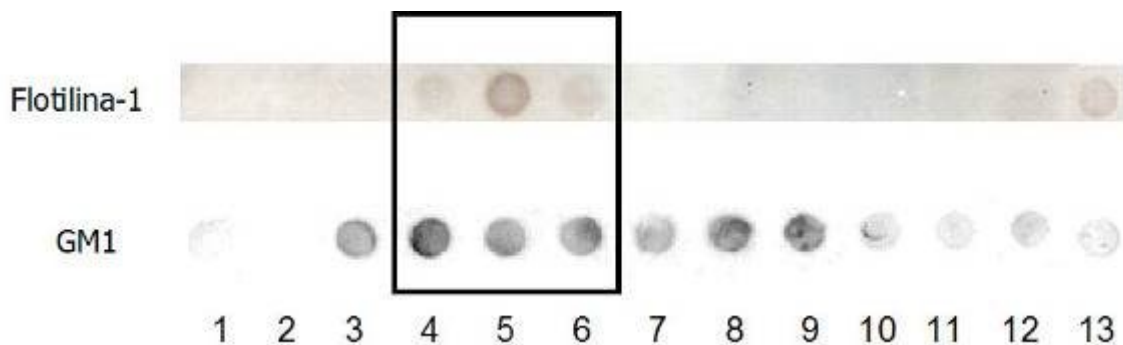


Figura 5 - Frações de densidade correspondentes à *rafts* em análise por dot-blotting de células isoladas da GEO. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-flotilina-1 (parte superior) e toxina colérica (que marca o gangliosídeo GM1). As frações 4-6 correspondem às *rafts* lipídicas, que são caracterizadas pela resistência a detergentes e presença de flotilina e GM1 (resultados não-publicados de F.S.O. Campos, * dissertação de Mestrado em preparação).

* Campos, F.S.O. **Dissertação de mestrado em andamento.** (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Rio de Janeiro, RJ).

1.5. Relevância do estudo

O envolvimento dos complexos de adesão célula-matriz em importantes eventos celulares torna de particular interesse seu estudo em células como a glia embainhante olfatória (GEO), cujo efetivo uso em terapias neuroregenerativas depende do até então escasso entendimento de suas propriedades fundamentais. Este trabalho se propõe a estudar a distribuição e expressão de proteínas de adesão célula-matriz da GEO, dessa forma contribuindo para o melhor entendimento de seus mecanismos migratórios e da transdução de sinais a partir da matriz extracelular.

2. Objetivos

2.1. Geral

Estudar a distribuição e expressão de proteínas de adesão célula-substrato nas células da glia embainhante olfatória (GEO).

2.2 Específicos

Verificar o perfil de expressão de proteínas de adesão celular nas células da GEO;

Verificar a distribuição de proteínas de adesão nas células da GEO;

Identificar a presença de proteínas de adesão em microdomínios de membrana plasmática (*rafts*) da GEO.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Utilizamos em nossos experimentos 40 ratos Wistar fêmeas e machos, com idade de dois meses, a partir de cruzamentos feitos no biotério do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Todos os procedimentos que utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (protocolo IBCCF 020).

3.2. Culturas organotípicas do bulbo olfatório (BO)

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cabeça foi imediatamente cortada e colocada em Tampão Fosfato com Salina (PBS) 10 mM pH 7,4 estéril. Em fluxo laminar foi feita a dissecação do bulbo olfatório, o qual foi cortado em fatiador de tecidos (Mickle Labs.) Fatias de 250 µm de espessura foram cortadas no plano transversal e tinham sua parte central contendo as camadas subependimária e granular removidas (fatias enucleadas). As fatias enucleadas de 250 µm foram então colocadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina (20 µg/ml, Sigma) e cobertas com laminina (40 µg/ml, Invitrogen). O material foi cultivado em meio DMEM/F12 (com 3,15 g/l de glicose, fungizona 25 µg/ml, 10.000 unidades de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina, 0,365 g/l de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina), com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, inativado a 56°C por 1 hora). Após a adição do meio de cultura o material foi mantido a 37°C com 5% de CO₂ em estufa e o meio foi trocado a cada dois dias. Após três dias em cultura, o material foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% por quinze minutos e lavado em PBS 10 mM pH 7,4 e mantido na mesma solução a 4° C.

3.3. Cultura isolada de GEO

Para a purificação da GEO utilizamos o protocolo de Nash e colaboradores (2001). Após o sacrifício dos animais e a dissecação do BO, este foi cortado em fatiador de tecidos e as camadas de fibras olfatórias e glomerular foram removidas com o uso de bisturis. As duas camadas foram então picotadas e incubadas com tripsina 0,05% a 37°C por 15 minutos. Após o material ser passado por seringa com agulha de 21G para dissociação mecânica, a tripsina foi inativada com a adição de meio DMEM/F12 (com 3,15 g/l de glicose, 25 µg/ml de fungizona, 10.000 unidades de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina, 0,365 g/l de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco, inativado a 56°C por 1 hora). Após centrifugação, as células ficaram na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Para o isolamento da GEO, em seguida foi realizado o plaqueamento diferencial. Nesta etapa, células não aderidas após 18 horas de cultura (sobrenadante) eram trocadas de garrafa e após 36 horas as células ainda não aderidas (novo sobrenadante) eram, por fim, colocadas em lamínulas tratadas previamente com poli-L-lisina (20 µg/ml, Sigma-Aldrich) e cobertas com laminina (40 µg/ml, Invitrogen). O meio de cultura era trocado a cada dois dias.

3.4. Microscopia óptica de imunofluorescência

As fatias foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos em temperatura ambiente com leve agitação. Após a etapa de fixação foram feitas 3 lavagens de 10 minutos com PBS-Triton 0,5% para permeabilização das células. Posteriormente, as fatias foram incubadas com anticorpo primário (**Tabela 1**) em PBS-Triton 0,5% com BSA 1% durante 1 hora em estufa a 37°C. O material foi novamente lavado 3 vezes de 10 minutos com PBS-Triton 0,5% e incubado com anticorpo secundário fluorescente ou biotilado (**Tabela 2**) em PBS-Triton 0,5%/BSA 1% durante 1 hora em estufa a 37°C. No caso de anticorpos biotilados era feita uma

reação adicional com extravidina fluorescente (**Tabela 3**). As fatias foram lavadas com NaCl 0,9% por 5 minutos com leve agitação. Em seguida, foram coradas com o marcador nuclear DAPI (0,1 µg/ml em NaCl 0,9%) durante 3 minutos à temperatura ambiente com leve agitação. A lavagem com NaCl 0,9% foi repetida mais uma vez e as lâminulas foram montadas com solução de montagem (glicerol contendo N-propil galato 5%). As imagens foram obtidas por microscopia de contraste de fase e de fluorescência em microscópio Axiovert 100 (Zeiss), dotado de filtros para fluoresceína, rodamina e DAPI, bem como de objetivas de 10x, 20x, 40x e 100x.

3.4.1. Processamento digital das imagens de imunofluorescência

As imagens provenientes do microscópio Axiovert foram digitalizadas e submetidas, quando necessário, à ajustes digitais de imagem por meio do programa Adobe Photoshop. As ferramentas de ajuste de imagem utilizadas foram alteração de brilho e contraste, bem como mapa de gradiente (**Figura 9A**).

Tabela1- Anticorpos Primários

Anticorpo Primário	Tipo	Feito em	Diluição Utilizada	Peso Molecular	Origem
anti-CNPase	monoclonal	camundongo	1:100 (imunocitoquímica)	46 kDa	Sigma
anti-S100	policlonal	coelho	1:100 (imunofluorescência)	20 kDa	Sigma
anti-β ₁ integrina	monoclonal	galinha	1:50 (imunocitoquímica) 1:1.000 ("immunoblotting")	135 kDa	Sigma
anti-vinculina	monoclonal	camundongo	1:100 (imunocitoquímica) 1:1000 ("immunoblotting")	116 kDa	Sigma
anti-α-actinina	policlonal	coelho	1:100 (imunocitoquímica) 1:1.000 ("immunoblotting")	100 kDa	Sigma

anti-talina	monoclonal	camundongo	1:100 (imunocitoquímica) 1:1000 ("immunoblotting")	235 kDa	Sigma
anti-flotilina-2	policlonal	cabra	1:1.000 ("immunoblotting")	48 kDa	Santa Cruz Biotech.

Tabela 2- Anticorpos Secundários

Anticorpo Secundário	Diluição Utilizada	Origem
anti-IgG Alexa 488	1:100	Molecular Probes
anti-IgG γ -chain biotilado	1:20	Sigma
anti-IgG 2b Alexa 488	1:50	Sigma
anti-IgG Cy3	1:200	Molecular Probes

Tabela 3 - Ligantes e Sondas

Ligante/Sonda	Diluição Utilizada	Origem
extravidina conjugada a Cy3	1:500	Sigma
extravidina conjugada a HRP	1:1.000	Sigma
faloidina conjugada a rodamina	1:200	Molecular Probes
DAPI	1:12.000	Molecular Probes
toxina colérica conjugada a HRP	1:1.000	Sigma

3.5. Preparação do homogenado da GEO

As camadas de fibras olfatória e glomerular foram adicionadas ao Tampão de Lise Ripa (NP-40 1%, Triton X-100 1%, deoxicolato 1%, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1 %) na proporção 3:1 e inibidores de proteases (0,1µg/µl; Sigma), em gelo. Este homogenado, por sua vez, foi macerado com auxílio de um *Potter* e posteriormente o material foi submetido à centrifugação a 4°C. A primeira centrifugação foi feita a 3.500 rpm por 10 minutos, para a separação do sobrenadante. Esse sobrenadante novamente foi centrifugado a 15.000 rpm por 20 minutos. O *pellet* desta centrifugação foi descartado e o sobrenadante final foi armazenado em nitrogênio líquido para aguardar a realização da dosagem de proteína.

3.6. Dosagem de Proteínas

As determinações proteicas foram estimadas através do método de Bradford (1976), tendo como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Foram acrescentadas em todas as amostras NaCl 0,9 % para atingir o volume final de 500 µl. Por fim, 2,5 ml de solução de Bradford (Azul de Comassie G-250, álcool etílico, ácido orto-fosfórico, água) foi adicionado. Após 5-10 minutos, foi realizada a leitura das amostras no comprimento de onda de 650 nm.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

A separação das proteínas da GEO foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, de acordo com o método de Laemmli (1970). As amostras foram fervidas em tampão de amostra por 3 minutos. Foram aplicadas 25 µg de proteína em um gel de poliacrilamida a 10%. A corrida da eletroforese foi realizada sob amperagem constante de 25 mA durante 90 minutos. Terminada a corrida, as

proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham/Pharmacia), mediante corrente constante de 100 volts, durante 120 minutos.

3.8. Immunoblotting

Após a transferência, a membrana de PVDF foi submetida à reação para a detecção de proteínas de adesão. A membrana com as proteínas transferidas foi incubada em Solução de Bloqueio (PBS 10 mM pH 7,4, Tween-20 0,1%, leite em pó desnatado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação contínua. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (**Tabela 1**) diluído em PBS/Tween-20 e mantida durante a noite a 4°C. Após este período, a membrana foi lavada com PBS/Tween-20 por 4 horas com intervalo de 30 minutos. Ao término das lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (**Tabelas 2 e 3**) por 1 hora, seguido de novas lavagens com PBS/Tween-20 (6 vezes de 20 minutos cada). A reação foi revelada pelo método ECL através da impressão das bandas marcadas em um filme tipo Hyperfilm-ECL.

3.9. Isolamento de micro-domínios de membrana (“rafts”)

Preparações de micro-domínios de membrana (*rafts*) foram obtidas através de uma colaboração com a mestranda Fernanda Souza de O. Campos, aluna do Laboratório de Bioquímica de Lipídeos e Lipoproteínas (Profa Geórgia Correa Atella) e do Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento (Profa. Leny Alvez Cavalcante).

Uma suspensão de 10^7 células foi acrescida de inibidores de protease (PMSF 1 mM, benzamidina 5 mM, pepstatina 10 μ M, leupeptina 10 mM) a 4°C e sonicado para o rompimento total das membranas. Após as células terem sido lisadas, realizávamos a extração com 1% de Triton X-100 em tampão TNE (Tris-HCl 25 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM) a 4°C por 20 minutos. No fundo do tubo da centrífuga foi colocado igual

volume da amostra com Triton X-100 e de sacarose 80% em tampão TNE. Por cima foram acrescentados 4 ml de sacarose 30% e por último, 4 ml de sacarose 5% em tampão TNE. O gradiente foi centrifugado a 4°C em uma ultracentrífuga (Beckman) com rotor SW40 por 20 horas, a 38.000 rpm. Depois da centrifugação, o material foi recolhido de 1 em 1 ml do topo do tubo ao fundo, resultando em 13 frações.

3.10. Dot-blotting

Após o recolhimento das 13 frações do gradiente de sacarose, foram separados 500 µl de cada amostra. Com uma bomba de sucção acoplada a cuba de *dot-blotting*, as amostras foram passadas para a membrana de nitrocelulose, podendo assim iniciar o bloqueio com TBS-Tween-Molico (Tris-HCl 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, leite em pó desnatado Molico 15g) durante a noite a 4°C. No dia seguinte, todo o tampão foi retirado e incubado com o anticorpo primário (**Tabela 1**) diluído em TBS-Tween-Molico por 2 horas a temperatura ambiente. Agitando manualmente, a membrana foi lavada 5 vezes (de 2 minutos cada) com TBS-Tween-Molico e logo em seguida, incubada com o anticorpo secundário (**Tabelas 2 e 3**) por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente, a membrana foi lavada 5 vezes (de 2 minutos cada) com TBS-Tween-Molico. Depois, lavada 3 vezes (de 2 minutos cada) com TBS-Tween (Tris-HCl 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) e por último foram feitas 3 lavagens (de 2 minutos cada) de TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM). As membranas reagidas com os anticorpos secundários foram usadas para impressionar um filme do tipo Hyperfilm-ECL, pelo método WB-ECL ou revelados no aparelho STORM, se os anticorpos secundários fossem fluorescentes.

4. Resultados

4.1. Caracterização da cultura de células de bulbo olfatório

As culturas organotípicas do bulbo olfatório (BO) foram examinadas e fixadas entre 3 e 4 dias a fim de evitar que outros tipos celulares com capacidade migratória reduzida, tais como oligodendrócitos diferenciados migrassem também para fora do explante sobre um substrato de laminina. Observação das culturas por microscopia óptica de contraste de fase mostrou células a distâncias variadas do explante. Algumas pareciam ter emergido recentemente do explante, enquanto outras estavam mais afastadas. Basicamente três morfologias foram observadas: morfologia bipolar, tripolar e aplanada (**Figura 6**).

Com a finalidade de confirmar a presença da GEO nas células das culturas de explantes do BO, foi primeiramente realizada uma imunofluorescência utilizando-se dois marcadores conhecidos da GEO: proteína S100 e CNPase (Santos–Silva e Cavalcante, 2001). Foi também realizada imunofluorescência para a proteína actina de músculo liso, recentemente identificada como um potencial marcador da GEO (Jahed et al., 2007). Os resultados obtidos mostraram que virtualmente todas as células saídas dos explantes apresentaram imunoreatividade para os marcadores listados (**Figuras 7 e 8**).

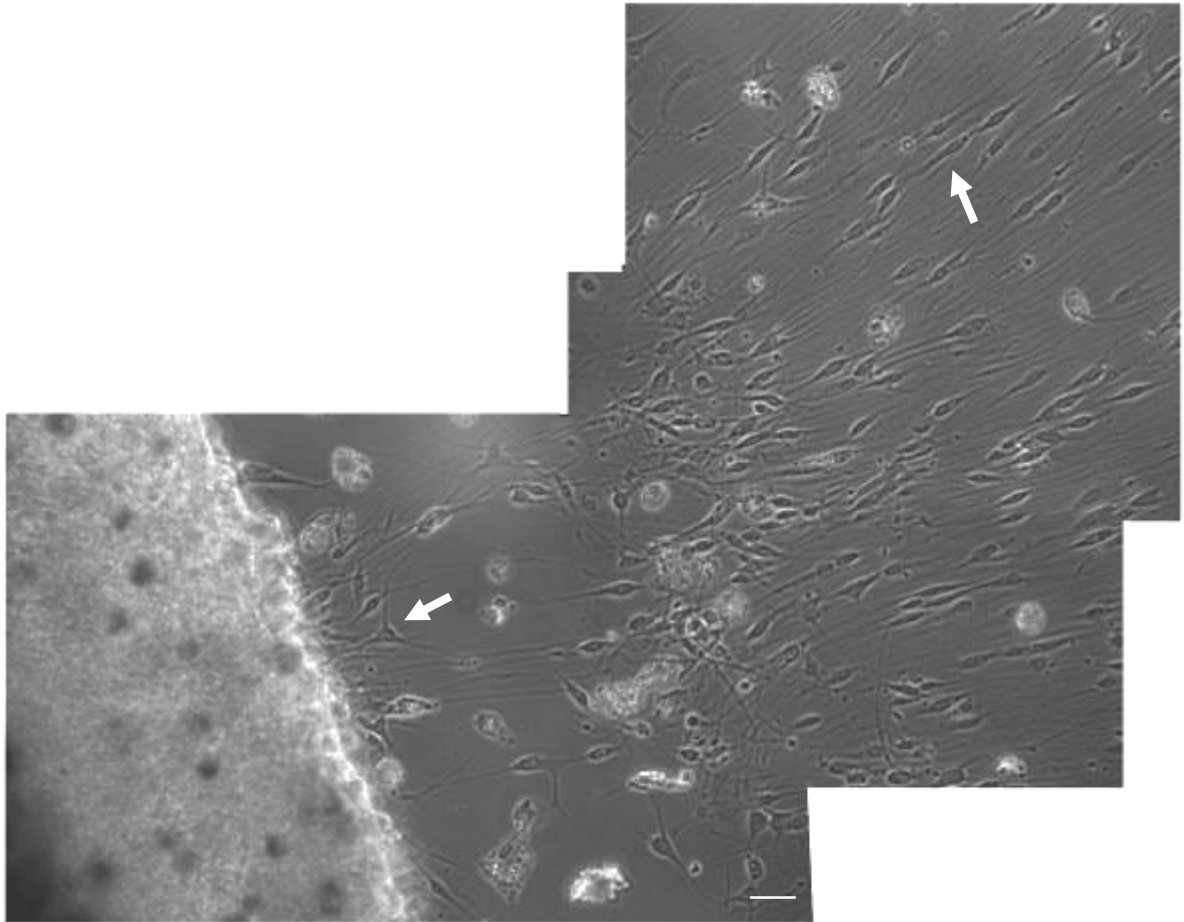


Figura 6 - Composição de imagens em microscopia óptica de contraste de fase de células saídas de fatia enucleada de bulbo olfatório. A remoção do cerne da fatia foi realizada com auxílio de bisturis e de lupa, de modo a evitar contaminação por células tronco ou precursores de oligodendrócitos. Barra de calibração = 20 μ m.

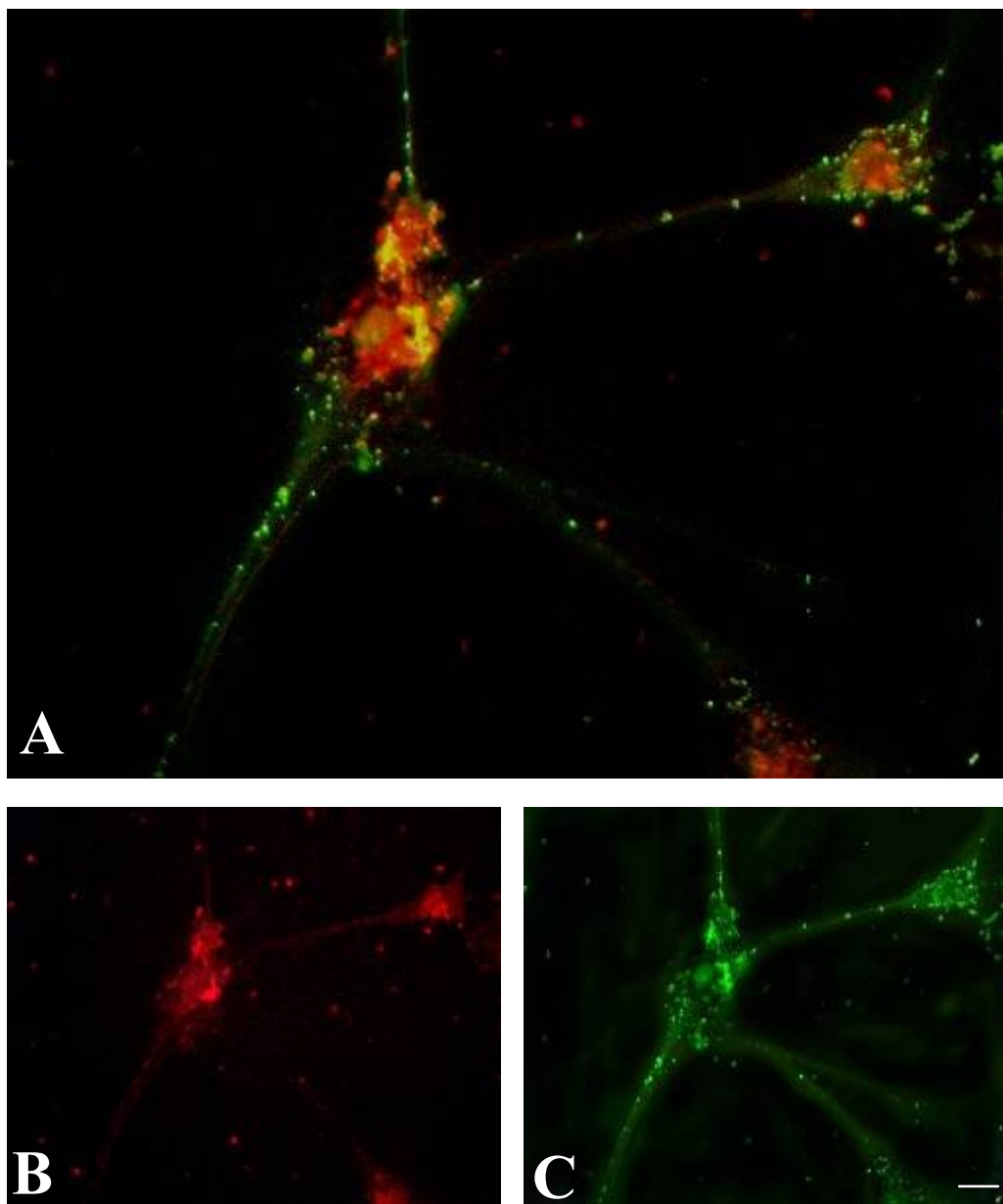


Figura 7 – Imunofluorescência para CNPase e S100 em células derivadas de explante de bulbo olfatório. (A) Sobreposição das imagens dos marcadores CNPase (vermelho) e S100 (verde); (B, C) visualização isolada dos marcadores CNPase e S100, respectivamente. Barra de calibração = 10 μ m.

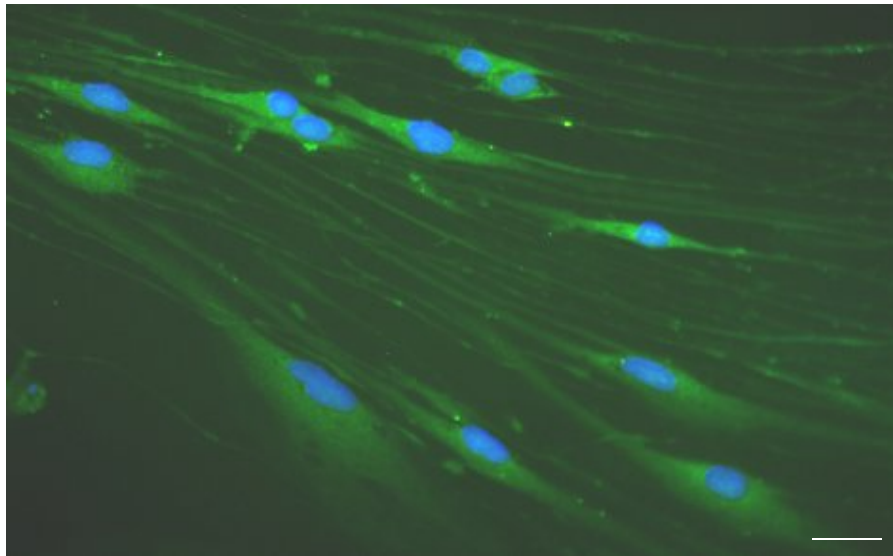


Figura 8 - Imunofluorescência para alfa-actina de músculo liso em células derivadas de explante de bulbo olfatório. Virtualmente todas as células saídas do explante enucleado do BO apresentam marcação difusa no citoplasma para alfa-actina de músculo liso (em verde). Em azul, núcleos celulares corados com DAPI. Barra de calibração = 10 μ m.

Os padrões de organização celular e do citoesqueleto de actina de células originadas de explante de bulbo olfatório foram avaliados também por meio de marcação com a sonda fluorescente faloidina, que se liga especificamente à actina filamentosa (actina-F). Com isso foi possível observar que células mais afastadas umas das outras tendiam a apresentar uma morfologia tripolar (**Figura 9**). Células mais distantes do explante tendiam a assumir uma forma bipolar, forma esta coincidente com uma maior densidade celular, dando em muitos casos origem a um filme de células em aparente migração. Neste caso, pode-se observar também que as células bipolares tendiam a se alinhar em uma mesma direção (**Figura 10**). Foi possível notar nas marcações com faloidina a presença de actina filamentosa predominantemente nas seguintes estruturas de células saídas do explante: fibras de *stress*, *spikes* e lamelipódios. Além disso, verificamos também a presença de actina em prováveis sítios de adesão focal (marcações de actina mais evidentes nas bordas distais citoplasmáticas) e de adesão fibrilar nas terminações de fibras de stress (**Figura 11**).

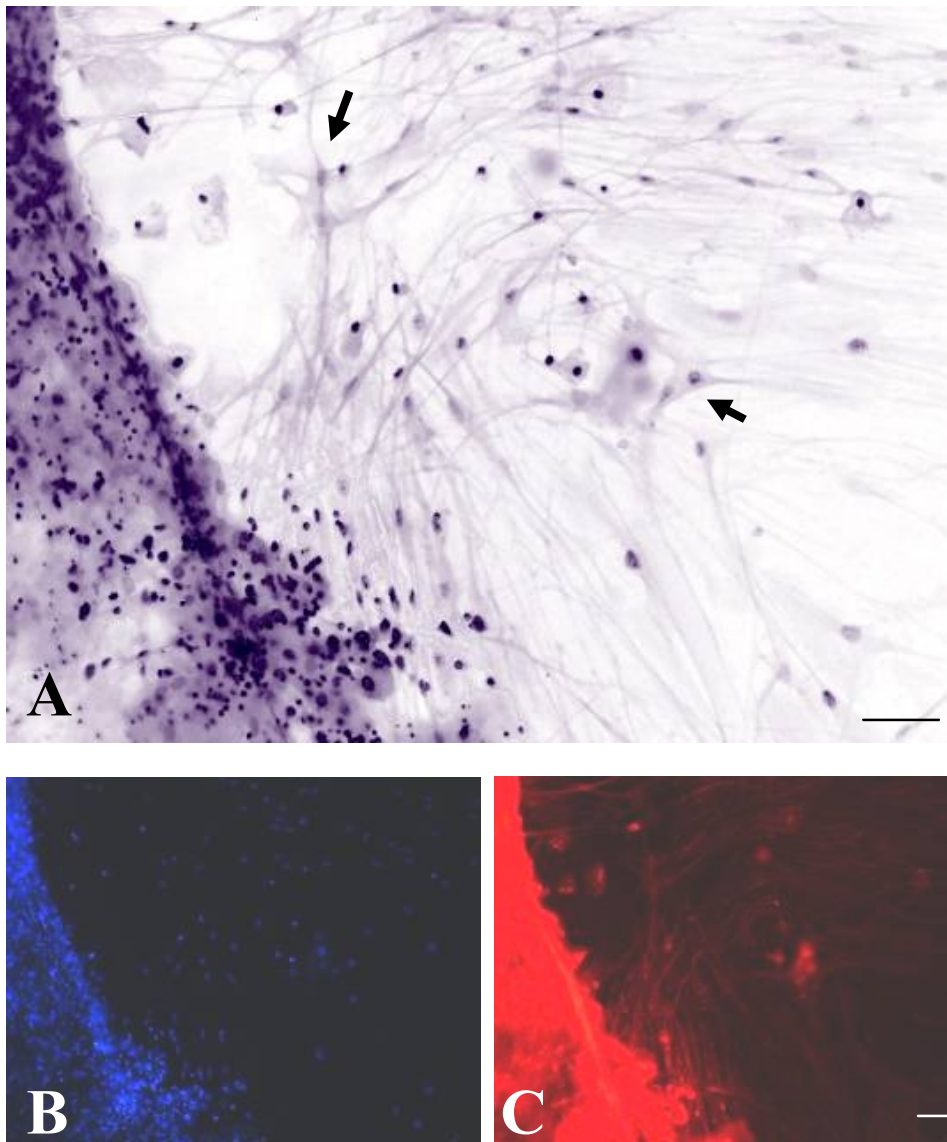


Figura 9 – Microscopia de fluorescência para actina filamentosa (faloidina, A, C) e coloração de núcleos (DAPI, B) de células derivadas de explante de bulbo olfatório. Em A: sobreposição das marcações de faloidina (em lilás) e DAPI (em azul) após processamento digital das imagens. Notar células mais afastadas umas das outras tendendo a apresentar uma morfologia multipolar (indicação de setas em A). Barra de calibração = 20 μ m.

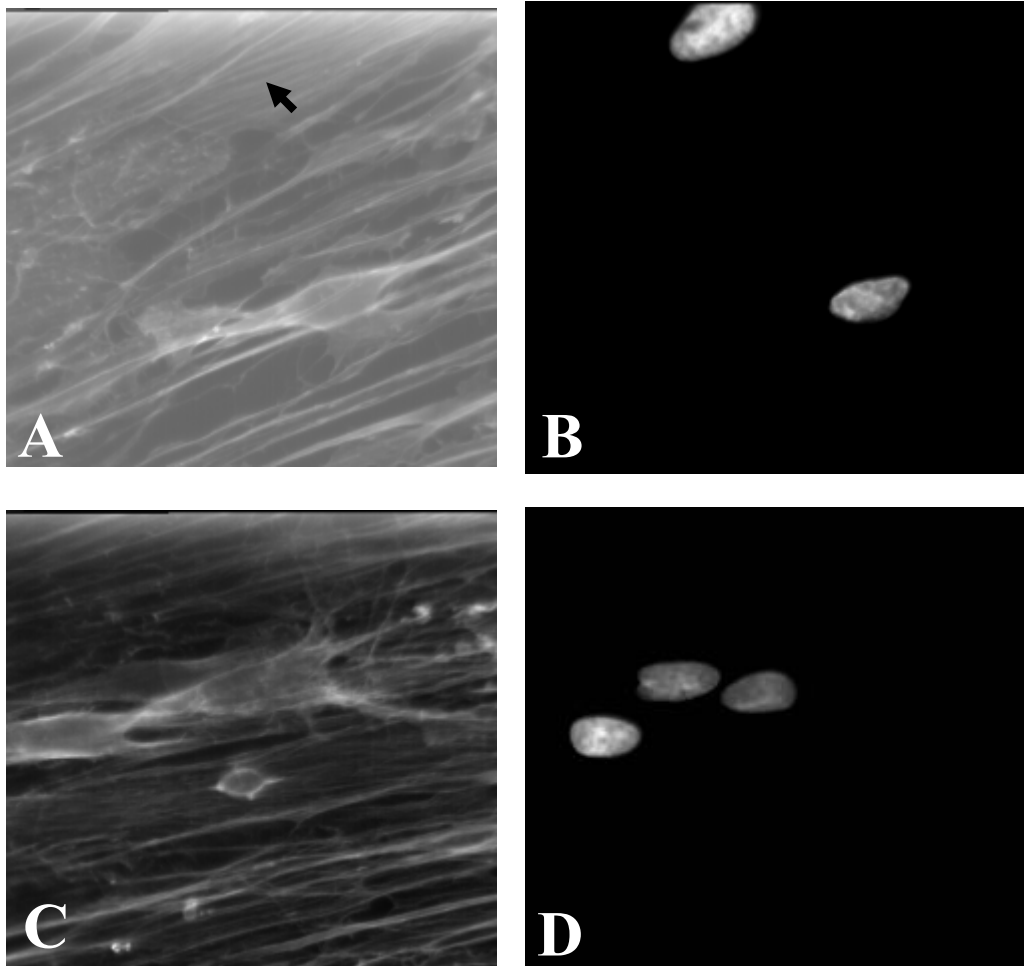


Figura 10 – Microscopia de fluorescência de marcação para actina filamentosa (faloidina, A,C) e de núcleo (DAPI, B, D) de células agrupadas migrando a partir do explante de BO. Notar o ordenamento das projeções citoplasmáticas das células tendendo à morfologia bipolar. Barra de calibração = 5 μ m.

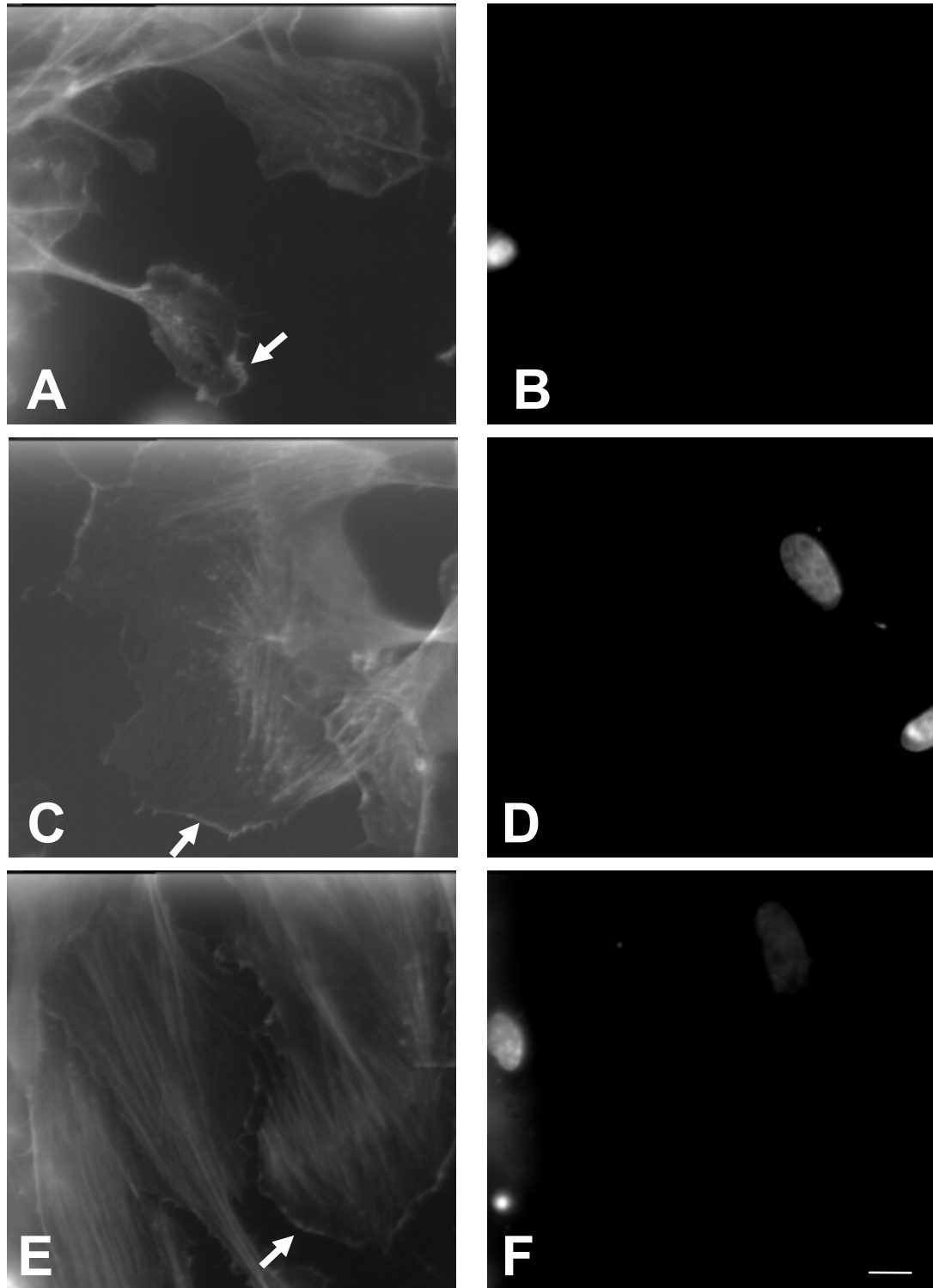


Figura 11 – Microscopia de fluorescência de marcação de actina filamentososa (faloidina, A, C, E) e de núcleo (DAPI, B, D, F) em projeções citoplasmáticas de células em via de saída do explantes de BO. Notar a presença de fibras de *stress* (E), *spikes* e lamelipódios (C), sítios de adesão focal e fibrilar (A, C). Barra de calibração = 5 μ m.

4.2. Expressão e distribuição de proteínas de adesão

Para a análise da expressão e distribuição de proteínas de adesão da glia embainhante olfatória, foram realizadas imunocitoquímicas em culturas organotípicas mantidas de três a quatro dias em meio DMEM/F12. Realizamos também *Western blotting* de homogenados da camada de fibras olfatórias do BO para análise da expressão de proteínas de adesão destas células. As proteínas estudadas foram a β 1-integrina, vinculina, talina e alfa-actinina. A análise da distribuição de proteínas de adesão quanto à localização em *rafts* lipídicas foi feita por *dot-blotting* de culturas de células isoladas, com base nos dados de caracterização destes microdomínios da GEO, realizados por *Campos, S.O.C.

4.2.1. β 1-integrina

A imunofluorescência para β 1-integrina revelou um padrão difuso de marcação ao longo de todo o citoplasma de células bipolares, além de uma intensa marcação perinuclear (**Figura 12**).

Através de *Western blotting*, foi possível constatar a presença de β 1-integrina na região de peso molecular de 140 kDa no pellet de homogenados da camada de fibras olfatórias submetidos à centrifugação diferencial (**Figura 13**).

Por meio de *dot-blotting*, pode ser constatado que a β 1-integrina se localiza preferencialmente em frações *rafts*, positivas para o gangliosídeo GM1 e flotilina (**Figura 5**), na ordem de aproximadamente 34% da marcação (**Figura 14**).

* Campos, S.O.C. **Dissertação de mestrado em andamento**. (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Rio de Janeiro, RJ).

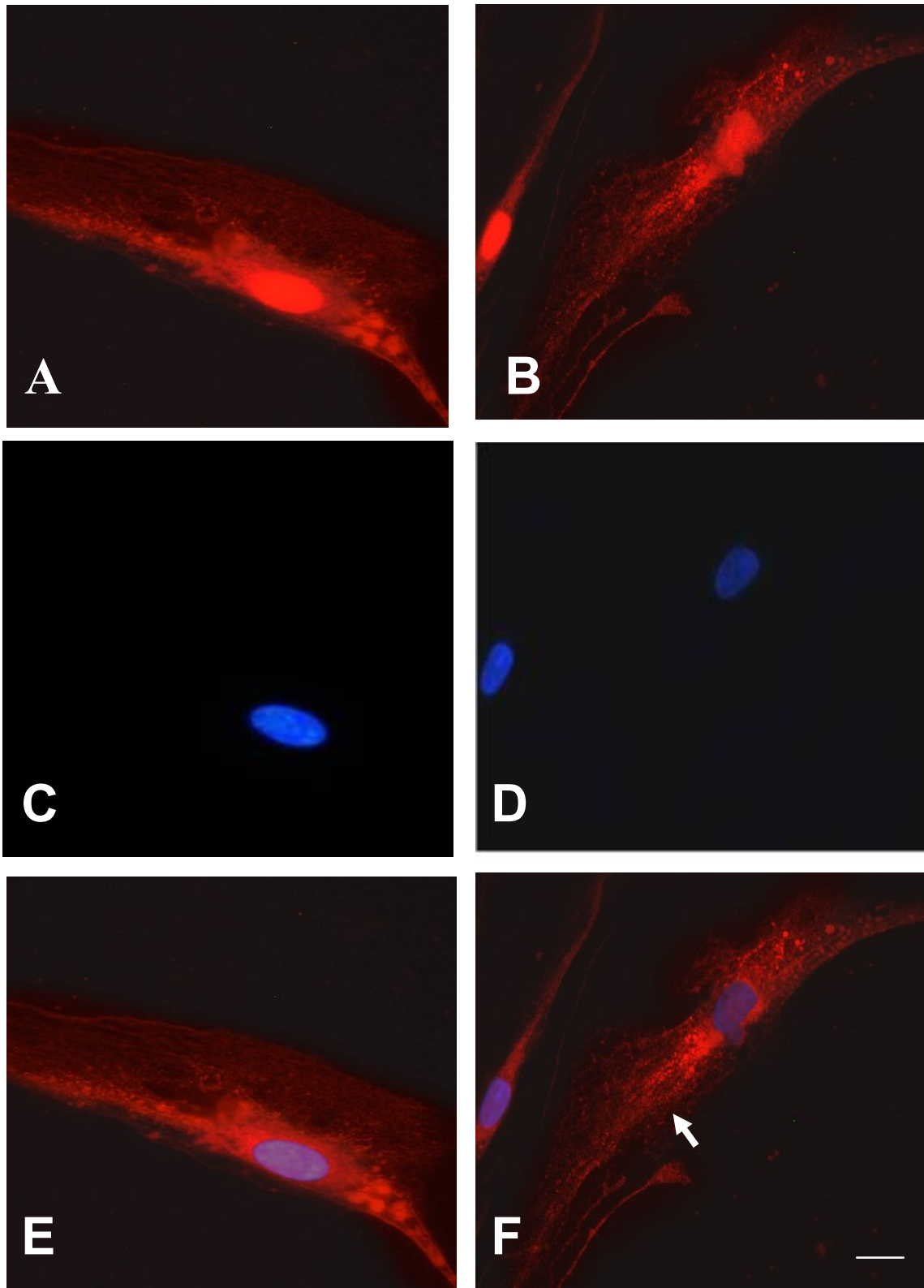


Figura 12 - Imunofluorescência para $\beta 1$ -integrina em células derivadas de explante de bulbo olfatório (A, B). Núcleos celulares foram marcados com DAPI (C, D) Sobreposição de imagens (E, F). Notar padrões fibrilares de marcação evidentes em região de extensão citoplasmática (seta em F). Barra de calibração = 5 μ m.

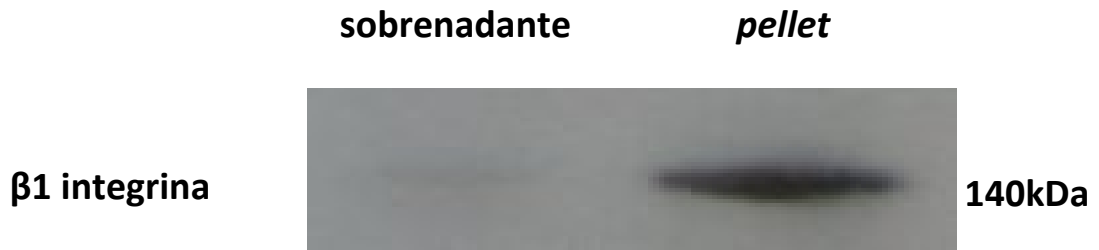


Figura 13 - Análise por *Western blotting* mostrando a expressão da $\beta 1$ integrina no BO. A amostra foi obtida à partir de extrato das camadas de fibras olfatória e glomerular (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Uma banda de aproximadamente 140 kDa foi observada no *pellet*, onde se espera encontrar o citoesqueleto e proteínas associadas.

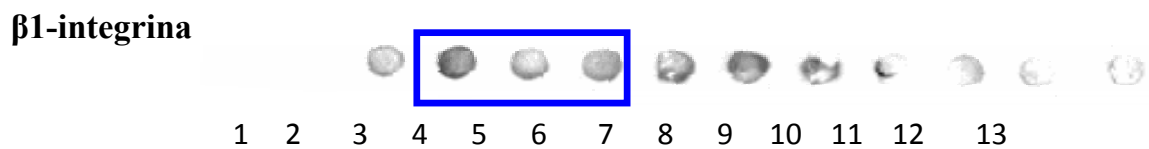


Figura 14 - Análise por *dot-blotting* do gradiente de sacarose mostrando marcação para $\beta 1$ -integrina nas frações correspondente às *rafts*. A amostra foi obtida a partir de células isoladas da GEO.

4.2.2. Vinculina

A marcação para vinculina por imunofluorescência revelou um padrão fibrilar na periferia de projeções citoplasmáticas e um padrão geralmente difuso no corpo celular (**Figura 15**). A **Figura 15A** mostra uma célula tripolar da GEO apresentando imunorreatividade na periferia de suas projeções citoplasmáticas, destacada na **Figura 15J**, onde se pode observar um padrão fibrilar de marcação. Em grandes lamelipódios, de células tendendo a um aplanamento, observa-se uma marcação periférica fibrilar e uma marcação interna menos intensa (**Figuras 15H e 15I**), em maior aumento nas figuras **15L e 15M**.

Através do *western blotting*, foi possível constatar a presença da proteína vinculina na região de peso molecular de 116 kDa no pellet de homogenado da camada da fibras olfatórias (**Figura 16**).

A análise por *dot blotting* revelou que a vinculina se encontra predominantemente em frações mais leves ou mais pesadas (aproximadamente 90% das marcações) do que frações correspondentes à rafts (**Figura 17**).

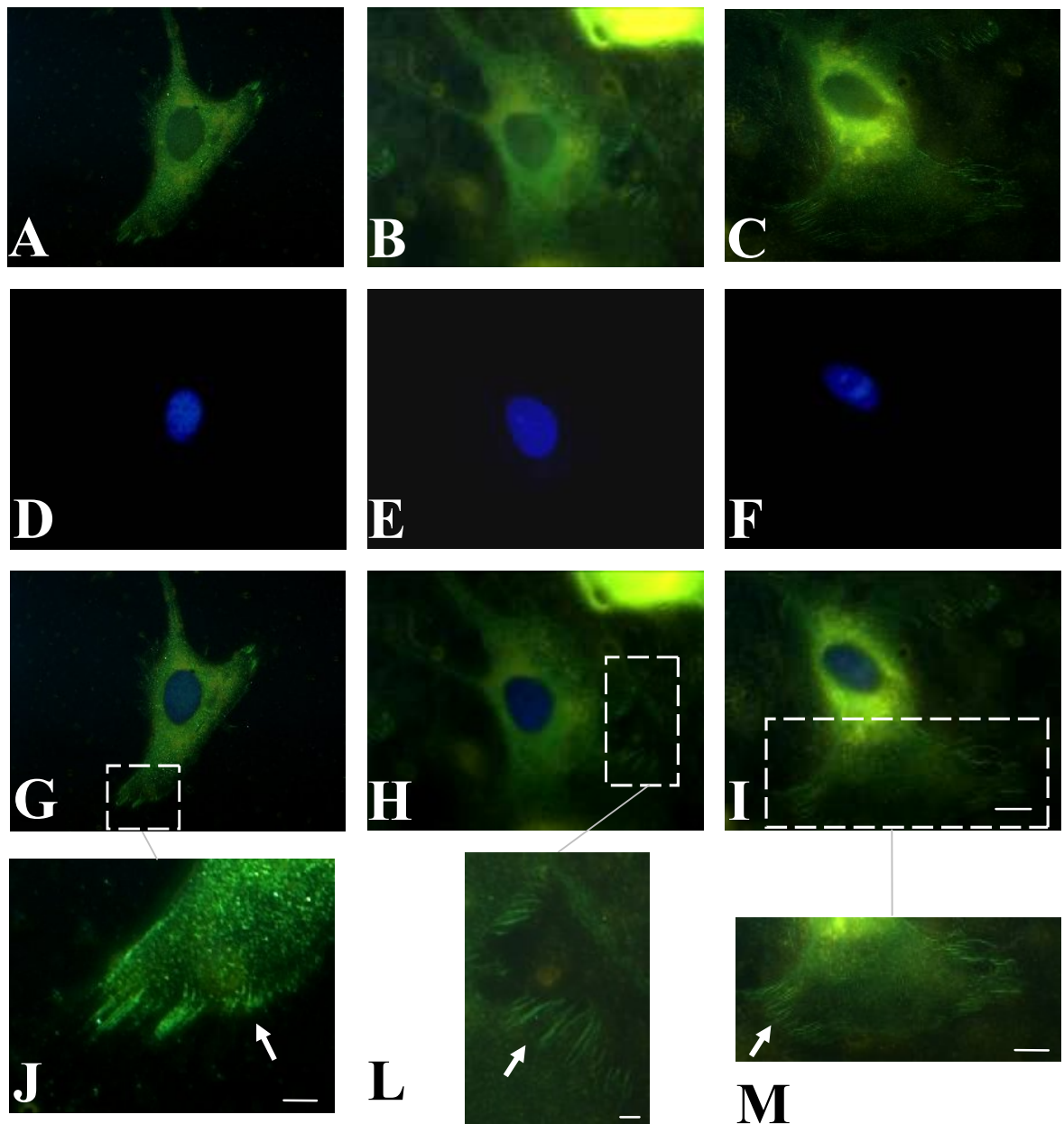


Figura 15 - Marcação para vinculina em células derivadas de explante de bulbo olfatório. (A,B,C) Marcação por anticorpo monoclonal anti-vinculina; (D,E,F) núcleos celulares marcados com DAPI; (G, H, I) sobreposição de imagens (J,L,M); ampliação dos campos destacados em G, H, I. Notar que todas as células apresentam maracação difusa no corpo celular (G, H, I) e fibrilares na periferia de projeções citoplasmáticas (J,L,M). Barra de calibração = 5 μ m.

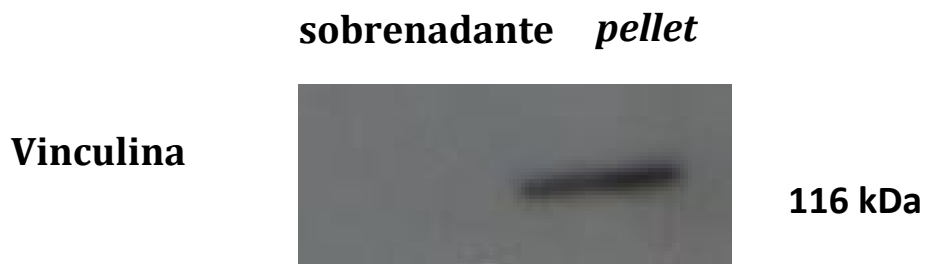


Figura 16 - Análise por *Western blotting* mostrando a expressão da vinculina no BO. A amostra foi obtida a partir de extrato das camadas de fibras olfatória e glomerular (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Uma banda de aproximadamente 116 kDa foi observada no *pellet*, onde se espera encontrar o citoesqueleto e proteínas associadas.

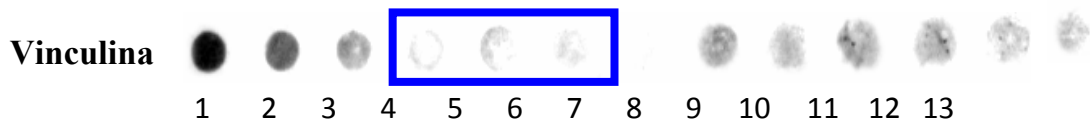


Figura 17 - Marcação para a proteína vinculina nas frações do gradiente de sacarose. A caixa azul corresponde às frações *rafts*. A amostra foi obtida a partir de células isoladas da GEO.

4.2.3. α -actinina

A imunofluorescência para α -actinina revelou um padrão de marcação fibrilar em todo o citoplasma e uma intensa marcação perinuclear.

A **Figura 18** mostra um padrão fibrilar de marcação em células tripolares (**Figura 18A**), bipolares (**Figura 18B**) e, de forma mais evidente, em formações lamelipodiais de células tendendo a um aplanamento (**Figura 18C**). A marcação de prolongamentos mais finos apresentava um padrão mais concentrado, tornando as fibrilas menos evidentes (**Figura 18B**).

A análise por *western blotting* revelou marcação de duas bandas com aproximadamente 120 e 100 kDa (**Figura 19**). Uma das bandas pode corresponder à uma marcação inespecífica do anticorpo policlonal, a uma segunda isoforma desta proteína sendo expressa pela GEO, ou a degradação proteolítica, como relatada por Selliah e cols. (1996).

A análise por *dot blotting* revelou que a α -actinina se localiza preferencialmente em frações *rafts* (**Figura 20**), na ordem de 40% da marcação.

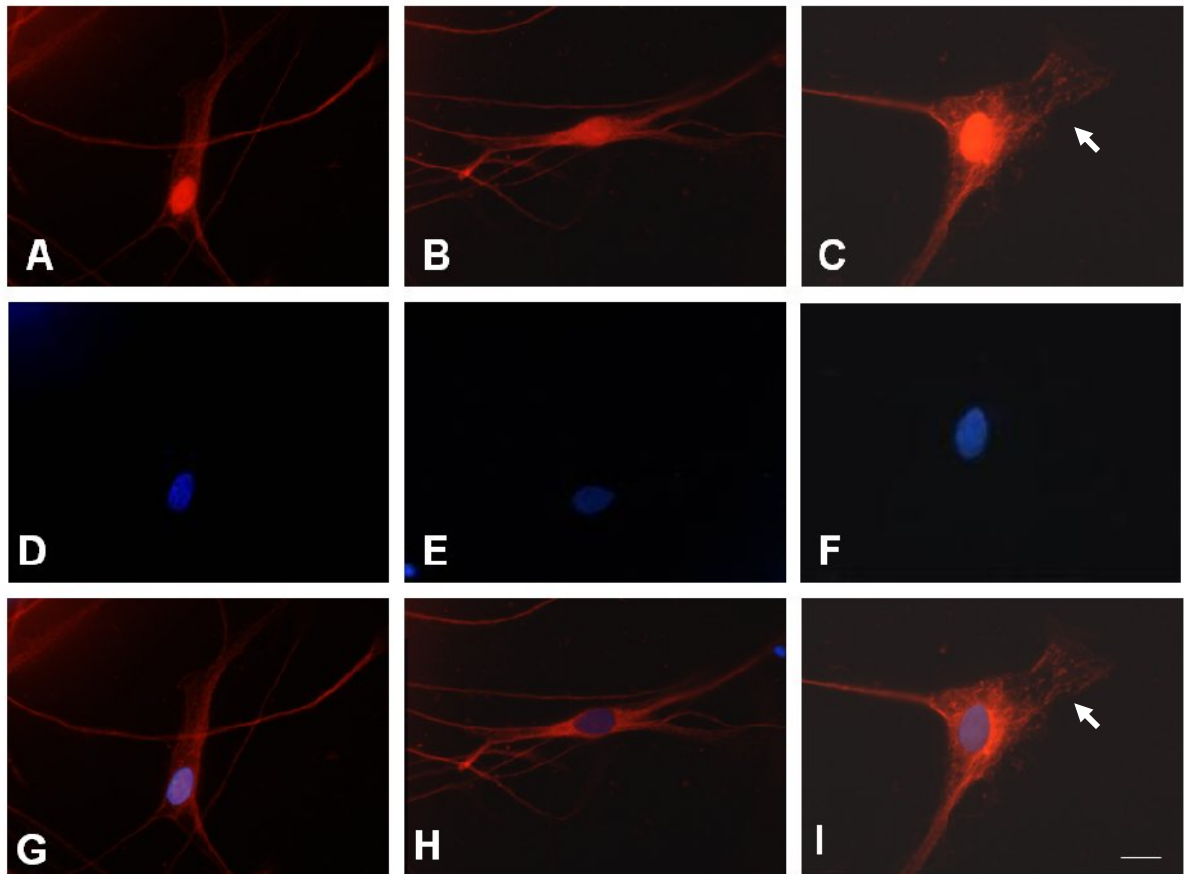


Figura 18 - Marcação com o anticorpo policlonal anti- α -actinina em células derivadas de explante de bulbo olfatório. (A,B,C) Marcação para α -actinina. (D, E, F) Núcleos celulares marcados com DAPI; (G, H, I) Sobreposição das marcações. Notar padrões fibrilares de marcação evidentes em região de extensão citoplasmática (setas em C, I). Barra de calibração = 5 μ m.

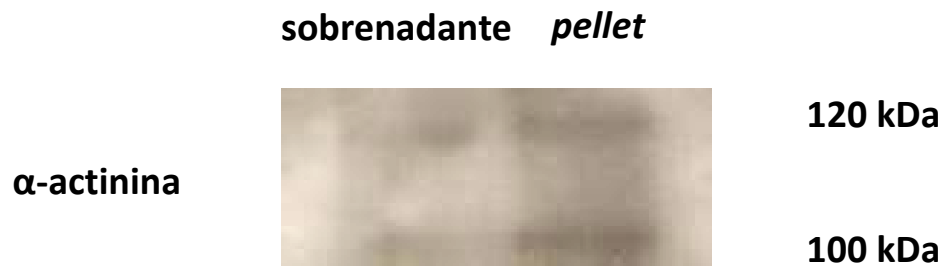


Figura 19 - Análise por *Western blotting* mostrando a expressão da α -actinina no BO. A amostra foi obtida a partir de extrato das camadas de fibras olfatória e glomerular (25 μ g/ μ l). Duas bandas de aproximadamente 120 kDa e 100 kDa foram observadas com maior intensidade no *pellet*, onde se espera encontrar o citoesqueleto e proteínas associadas.

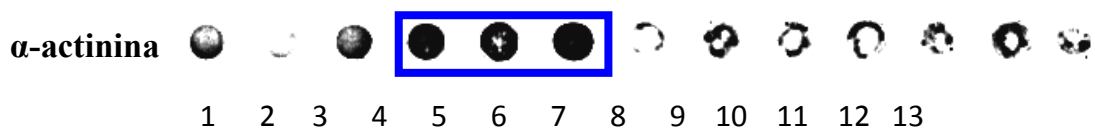


Figura 20 - Análise por *dot-blotting* do gradiente de sacarose mostrando marcação para proteína α -actinina nas frações correspondente às rafts. A amostra foi obtida a partir de células isoladas da GEO.

4.2.4. Talina

A imunofluorescência para a proteína talina revelou um padrão fibrilar ao longo de todo o corpo celular, marcação nuclear não evidente e uma marcação concentrada na borda de lamelipódios (**Figura 21**).

Nas **Figuras 21A, 21B e 21C**, pode-se observar o padrão fibrilar de marcação ao longo de todo o citoplasma de diferentes morfologias celulares, como de células em divisão, bipolares e amebóides, respectivamente. Na **Figura 21C** pode-se observar uma concentração de marcação na borda de lamelipódios de célula amebóide.

O *Western blotting* para talina revelou a presença de duas bandas correspondentes as subunidades de 190 kDa e 225 kDa desta proteína (**Figura 22**).

A análise por *dot blotting* revelou que 23 % da marcação para talina se encontra distribuída em frações *rafts*, o que demonstra uma localização não preferencial (**Figura 23**).

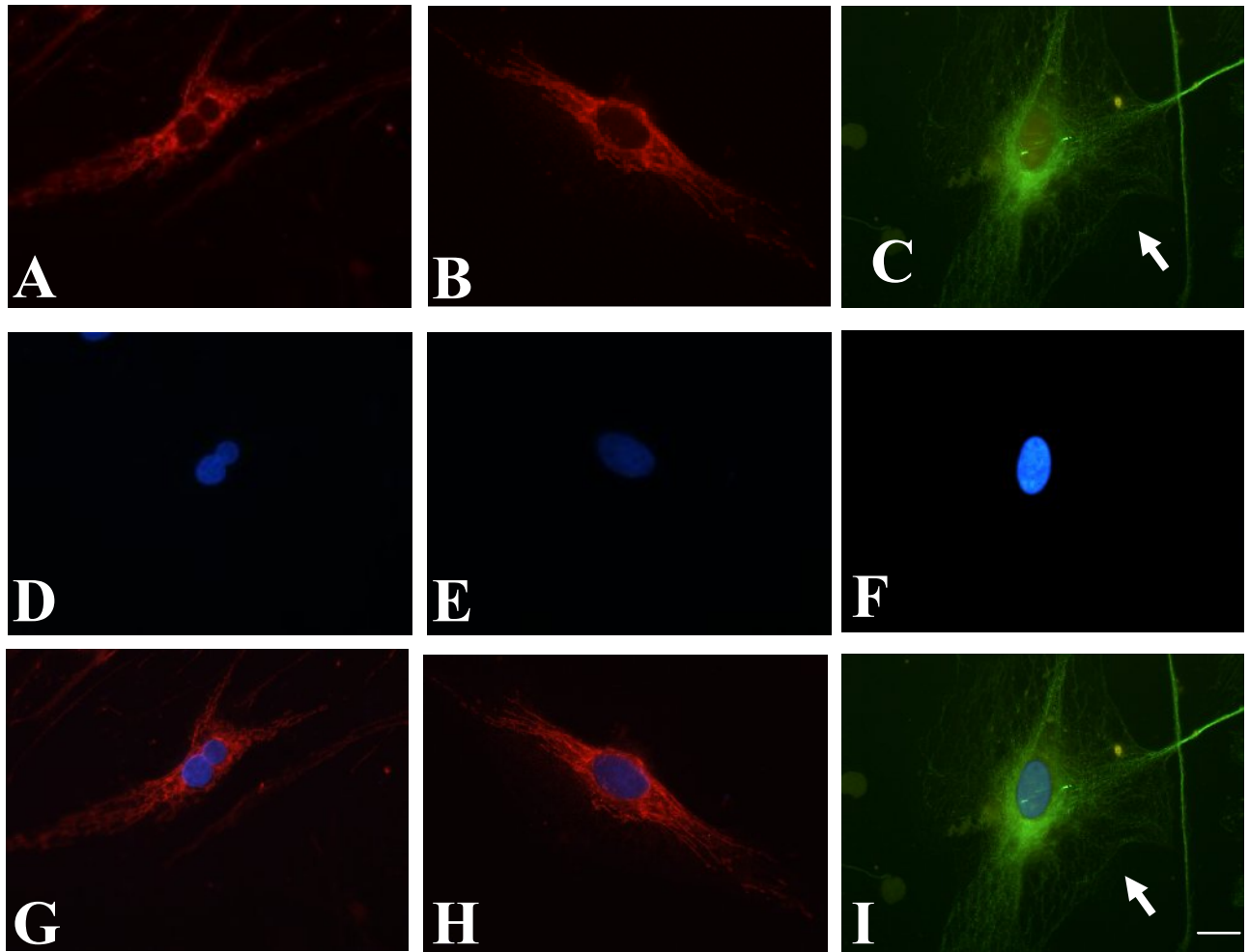


Figura 21 - Imunoretividade para talina em células derivadas de explante de bulbo olfatório. (A,B,C) Marcação por anticorpo monoclonal anti-talina (em vermelho e verde). (D, E, F) Núcleos celulares marcados com DAPI; (G, H, I) Sobreposição das marcações. Notar padrões fibrilares de marcação evidentes em região de extensão lamelipodial (setas em C,I). Barra de calibração = 5 μ m.

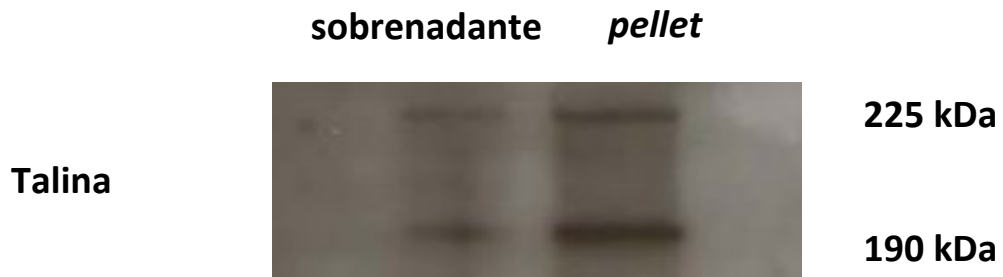


Figura 22 - Análise por *Western blotting* mostrando a expressão da talina no BO. A amostra foi obtida a partir de extrato das camadas de fibras olfatória e glomerular (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Duas bandas de aproximadamente 190 kDa e 225 kDa foram observadas no *pellet*, onde se espera encontrar o citoesqueleto e proteínas associadas.

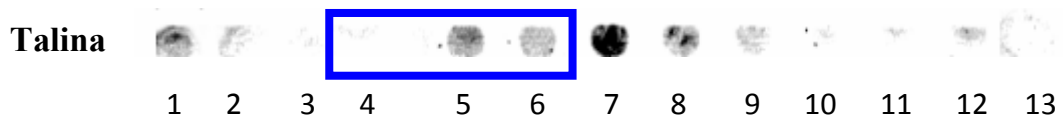


Figura 23 - Análise por *dot-blotting* do gradiente de sacarose mostrando marcação para talina nas frações correspondente às rafts. A amostra foi obtida a partir de células isoladas da GEO.

4.2.5. FAK

A análise por *Western blotting* revelou que a GEO é capaz de expressar a FAK. A marcação revelou uma banda de aproximadamente 125 kDa na fração do *pellet*, onde se espera encontrar o citoesqueleto e proteínas associadas (**Figura 24**).

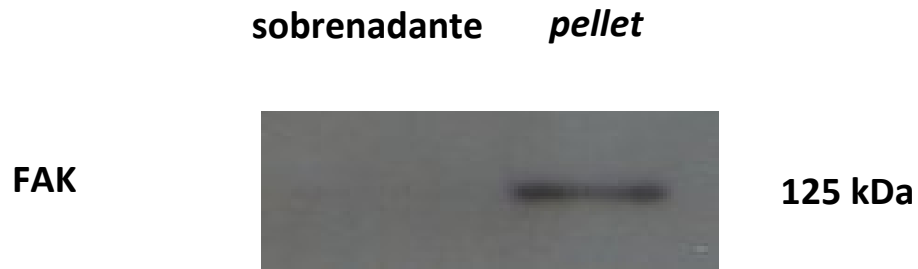


Figura 24 - Análise por *Western blotting* mostrando a expressão da FAK no BO. A amostra foi obtida a partir de extrato das camadas de fibras olfatória e glomerular (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Uma banda de aproximadamente 125 kDa foi observada no *pellet*.

5. Discussão

A glia embainhante olfatória (GEO) tem se tornado um valioso alvo de estudos no ramo de terapias celulares neuroregenerativas, em virtude de suas propriedades na promoção do crescimento axonal, mesmo através dos limites entre o sistema nervoso periférico e central (Doucette, 1995). A maior eficácia terapêutica desta célula, entretanto, ainda depende de um melhor entendimento de suas propriedades fundamentais, em especial no que diz respeito as suas propriedades adesivas. Este trabalho apresenta um estudo da expressão e distribuição de proteínas de adesão da GEO. Nossos resultados sugerem que a GEO, nas presentes condições experimentais pode apresentar diferentes morfologias com padrões definidos de distribuição de proteínas envolvidas na adesão da célula à matriz extracelular.

A adesão da célula à matriz extracelular corresponde a um dos diversos eventos mediados por integrinas. Estas proteínas transmembranares se associam a outras do citoplasma, formando complexos a partir dos quais eventos como expressão gênica, apoptose, adesão, migração e endocitose são desencadeados. Dentre estas proteínas do citoplasma, denominadas proteínas de adesão, estão a vinculina, talina, α -actinina e FAK (cinase de adesão focal), responsáveis pelo ancoramento das regiões de adesão mediadas via integrina ao citoesqueleto de actina (Cukierman et al., 2001). O perfil de expressão das proteínas de adesão pode variar entre diferentes tipos celulares, possivelmente de acordo com as necessidades e características do tecido onde a célula se encontra. No caso do sistema nervoso, diferentes tipos de integrinas e sinalizações intracelulares estão envolvidos em processos como a formação da junção neuromuscular (Burkin et al., 2000), o direcionamento axonal (Gardiner et al., 2007), bem como a proliferação e migração de oligodendrócitos (Baron et al., 2002). O conhecimento da expressão de proteínas de adesão, portanto, pode ser uma importante ferramenta no entendimento do nicho ocupado por uma célula em função de seu

ambiente.

Na última década vem sendo descrita a associação de integrinas com microdomínios de membranas (ou *rafts*). Os microdomínios são regiões enriquecidas em colesterol e glicosfingolipídeos (como o gangliosídeo GM1) e estão envolvidas em eventos como a transdução de sinais, tráfego de vesículas e organização do citoesqueleto (Munro, 2003). Experimentos com animais *knock-out* para a proteína de adesão FAK revelaram que ela exerce um papel importante na manutenção das *rafts* na superfície celular (Palazzo, 2004). A FAK estaria impedindo a internalização destes microdomínios em regiões de adesão da célula ao substrato. Além disso, componentes das adesões via integrina, como a vinculina e talina têm sido co-localizados com marcadores destes microdomínios em diferentes tipos celulares (Morford, 2002; Nebl et al., 2002; Li et al., 2003; Decker, 2004; Mavlyutov, 2007; Ichikawa, 2009). No sistema nervoso sabe-se, por exemplo, que a localização da $\alpha 6\beta 1$ -integrina em *rafts* é importante pra a sobrevivência de oligodendrócitos (Baron, 2003; Decker et al., 2004) e que a laminina-1 induz o agrupamento de gangliosídeos GM1, que por vez leva à translocação de $\beta 1$ -integrinas para *rafts*, promovendo o crescimento neurítico (Ichikawa et al., 2009). Entretanto, ainda são poucos os estudos abordando a adesão via integrinas e suas eventuais relações com *rafts* no sistema nervoso.

Em condições de isolamento em cultura e com substrato homogêneo de laminina a GEO migra sem aparente interrupção, como pudemos constatar em períodos estendidos a até 9 dias de cultura (dados não mostrados). A morfologia das células variava basicamente entre 3 tipos: aplanada, tripolar e bipolar. Estas morfologias possivelmente correspondem às morfologias similares a macrófagos, astrócitos e células de Schwann, respectivamente (Doucette, 1990; Liu et al., 2005). A morfologia aplanada, bem como a tripolar estavam presentes em células menos agrupadas, e possivelmente representavam uma pausa na migração. Em contrapartida, a morfologia

bipolar correspondia a um estado migratório observado em células agrupadas e frequentemente alinhadas umas às outras. Células nesta disposição alcançavam distâncias relativamente longas durante o período de cultura. De forma semelhante, fibroblastos de culturas e miofibroblastos *in vivo* também tendem a se alinhar. Este evento é acompanhado pela expressão de α -actina de músculo liso o que tem implicações no processo de cicatrização. Recentemente esta mesma proteína, a α -actina de músculo liso, foi identificada na GEO, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (Jahed et al., 2007), mas nenhum paralelo funcional a outras células foi proposto desde então.

Embora não existam evidências experimentais que atribuam alguma função específica da α -actina de músculo liso à GEO, esta proteína é incomum a outras células gliais e, portanto, pode ser usada como um eficaz marcador da GEO. Os resultados do presente trabalho confirmaram que virtualmente todas as células saídas do explante de bulbo olfatório eram capazes de expressar a α -actina de músculo liso.

Pouco se sabe atualmente a respeito das propriedades adesivas e migratórias da GEO, apesar de serem bem descritos eventos onde a regeneração é limitada pela não migração desta célula (Gudiño-Cabrera et al., 2000).

A β 1-integrina está envolvida na adesão de oligodendrócitos, participando da ligação da célula à laminina produzida por neurônios (Decker, 2004). Pudemos observar por imunofluorescência que a GEO frequentemente apresenta um padrão fibrilar de marcação para β 1-integrina, possivelmente evidenciando a translocação destas proteínas a partir de adesões focais, o que estaria de acordo com o modelo de maturação das adesões (Cukierman, 2002). Estes padrões de marcação eram claramente observados em extensões lamelipodiais, sendo, portanto mais evidentes em células de morfologia amebóide. Células bipolares apresentavam uma marcação concentrada em um eixo longitudinal e central da célula o que pode indicar um padrão de deslocamento das

adesões para a migração da GEO. Em células bipolares onde lamelipódios eram evidentes, as marcações fibrilares pareciam seguir paralelamente à orientação da célula. Já em células bipolares com modestas (ou ausentes) formações lamelipodiais, a marcação fibrilar mostrava-se menos evidente, o que possivelmente indica um estado mais migratório com menor aderência da célula ao substrato ou simplesmente representa um agrupamento compacto das fibras em um menor diâmetro citoplasmático.

O estudo da possível associação de proteínas de adesão à microdomínios de membrana foi realizado apenas por *dot-blotting*, embora outras técnicas, como a co-localização por microscopia de fluorescência destas proteínas com GM1 ou flotilina, possam ser utilizadas no estudo das *rafts*. Um passo adiante seria descobrir se estas proteínas de adesão da GEO se associam à microdomínios caveolares ou não caveolares, através de experimentos de *western-blotting* de frações obtidas com o uso do detergente Triton X-100 e a baixa temperatura (4°C).

A localização de $\beta 1$ -integrina nas frações de *dot-blotting* correspondentes às *rafts* da GEO é condizente com o observado em outras células neurais, como oligodendrócitos e neurônios do gânglio da raiz dorsal (Decker, 2004; Ichikawa, 2009). Experimentos recentes podem sugerir implicações para esta distribuição de $\beta 1$ -integrina no contexto da migração da GEO. Os experimentos de Tsuda e colaboradores (2008), por exemplo, demonstraram que a depleção de colesterol leva à inibição do recrutamento de proteínas como a Rac1 à membrana de células endoteliais. Esta proteína se liga preferencialmente às *rafts* no processo de formação das ondulações de membranas, essenciais para a migração da GEO (Windus et al., 2007), e sua função é controlada por integrinas (Del Pozo, 2004). É provável, portanto, que a observada localização da $\beta 1$ -integrina nas *rafts* esteja relacionada a este evento, o que teria implicações na regulação da motilidade da GEO.

A vinculina é uma proteína que se associa a outros componentes de adesão via

integrina, como a talina e a paxilina, participando da junção dos complexos adesivos ao citoesqueleto de actina. O padrão de imunofluorescência para vinculina no presente trabalho mostrou-se difuso em regiões centrais de todas as morfologias celulares e, fibrilar na periferia de lamelipódios de células tendendo a um aplanamento. O padrão difuso de marcação pode ser atribuído a contatos em fases iniciais da adesão focal ou a formas inativas da proteína no citoplasma, uma vez que a forma ativa tende a se concentrar em regiões de adesão na membrana celular. Nestas regiões a ativação pode ocorrer pela associação simultânea da vinculina à talina e à β -actina (Chen et al., 2006). Estas concentrações da forma ativa da proteína possivelmente correspondem às fibrilas observadas em regiões periféricas de células aplanadas. Estas estruturas mostravam-se curtas e tendiam a uma disposição perpendicular em relação ao limite da membrana. Tal observação pode estar relacionada a um maior grau de adesão e menor migração de células aplanadas. A idéia estaria de acordo com experimentos de células *knock-out* para vinculina, onde estas apresentavam uma redução de 50% da área de extensões citoplasmáticas e um aumento de 50% na velocidade de migração (Goldmann, 1995; Ezzell et al., 1997).

Os experimentos de *dot-blotting* revelaram que a vinculina não se localizava preferencialmente nas *rafts*. A vinculina não é característica de adesões fibrilares e sim de adesões focais (Cukierman et al., 2001). É possível, portanto, que as *rafts* da GEO estejam mais associadas a estas adesões, o que estaria de acordo com os padrões fibrilares nas marcações de β 1-integrina e α -actinina, neste trabalho identificadas preferencialmente nas *rafts*.

A proteína α -actinina é capaz de se ligar a filamentos de actina, conectando-os uns aos outros e auxiliando a formação de feixes, que podem ser compactados pela ação da miosina. Essa compactação de feixes de actina é importante no processo de formação de adesões via integrinas, podendo inclusive ser regulado por estas proteínas. A α -

actinina também é capaz de atuar neste processo, unindo as integrinas ao citoesqueleto de actina (Emsley et al., 2004). As imunofluorescências para a α -actinina da GEO revelaram um padrão fibrilar ao longo de toda extensão das células. Em células menos aplanadas as formações fibrilares eram menos evidentes, possivelmente pela maior concentração de feixes de actina em pequenos diâmetros de citoplasma. Em células aplanadas as marcações aparentavam se estender a partir de regiões perinucleares e também se formavam ao longo de projeções lamelipodiais. De forma semelhante ao que ocorreu na marcação para β 1-integrina, pode-se observar com relativa frequência uma marcação acentuada em um eixo longitudinal, possivelmente correspondente ao ordenamento de feixes de actina na direção do movimento. Esta similaridade de marcações pode indicar uma possível interação entre a α -actinina e a β 1-integrina, o que estaria de acordo com os dados de *dot-blotting* a seguir discutidos.

Os resultados de *dot-blotting* para α -actinina sugerem que esta proteína possua uma considerável fração de sua distribuição nas *rafts*. Neste trabalho pode-se identificar a presença de β 1-integrina nestes microdomínios de membrana. Contudo, o mesmo não se aplicou à vinculina, o que sugere que a ligação das adesões via β 1-integrina ao citoesqueleto nas *rafts* possa estar sendo feito por intermédio da α -actinina. Dados da literatura relatam que a α -actinina pode estar presente nas *rafts* em células como neutrófilos e monócitos, o que possivelmente teria implicações em vias de sinalização membrano-esqueletais ou mesmo na endocitose e tráfego de vesículas (Nebl et al., 2002; Li et al., 2003).

A proteína talina participa dos complexos de adesão via integrina, unindo a subunidade β de integrinas ao citoesqueleto, por si só, ou por intermédio da vinculina (para revisão, ver Ziegler, 2008). A imunofluorescência para talina revelou um padrão fibrilar ao longo de toda a célula e uma sutil marcação acompanhando os limites de algumas formações lamelipodiais (**Figura 21**). Este padrão mostrou similaridades aos

observados nas marcações de $\beta 1$ -integrina e α -actinina, mas não aos de vinculina. A associação da vinculina e da talina leva a uma forte adesão da célula ao substrato (Gallant et al., 2005). É possível propor, portanto, que por se tratar de uma célula de alta motilidade, a GEO possa valer-se preferencialmente de ligações mais fracas do que as intermediadas pela vinculina na sua adesão à laminina.

A análise por *dot-blotting* revelou que a talina possui uma distribuição preferencial em frações de densidades próximas, mas fora das referentes à *rafts*. Um pequeno número de trabalhos sugere que esta proteína possa estar associada à microdomínios de membrana em células como linfócitos-T e pertencentes à linhagem CHO-K1 (Morford, 2002; Mavlyutov, 2007).

A FAK é uma proteína tirosina-cinase capaz de integrar sinais de integrinas e fatores de crescimento, promovendo em resposta a ativação de várias vias de sinalização intracelulares por sua ação fosforilativa e/ou autofosforilativa (Schaller et al., 1994). Estas vias de sinalização culminam, dentre outros eventos, na proliferação e migração celular (Sieg et al., 2000). A análise por *western-blotting* revelou que a GEO é capaz de expressar esta proteína. A expressão de uma forma não funcional de FAK em células de Schwann, célula análoga à GEO, aparentemente não afeta a extensão de processos citoplasmáticos, mas diminui a proliferação destas células, o que resulta na defasciculação axonal (Grove et al., 2007). Além disso, a FAK de células das Schwann está envolvida na sinalização de receptores do fator de crescimento epidérmico e do receptor de laminina ($\alpha 6\beta 1$ integrina) (Grove et al., 2007). É possível, portanto, que a expressão de FAK pela GEO tenha um papel similar na sinalização de laminina, proliferação e fasciculação de axônios olfatórios.

O presente trabalho demonstrou que a GEO apresenta um perfil de proteínas de adesão compartilhado por outras células gliais, como oligodendrócitos no SNC e células de Schwann, no SNP. Além disso, a partir dos padrões de distribuição membranar

dessas proteínas, é possível propor que as adesões fibrilares, mas não as focais (positivas para vinculina), estejam associadas às *rafts* da GEO. Vale ressaltar que as adesões fibrilares representam uma importante etapa de eventos migratórios mediados por integrinas. Dessa forma, este estudo sobre a expressão e distribuição de proteínas de adesão da GEO deve contribuir para um melhor entendimento dos processos envolvidos na adesão e migração destas células.

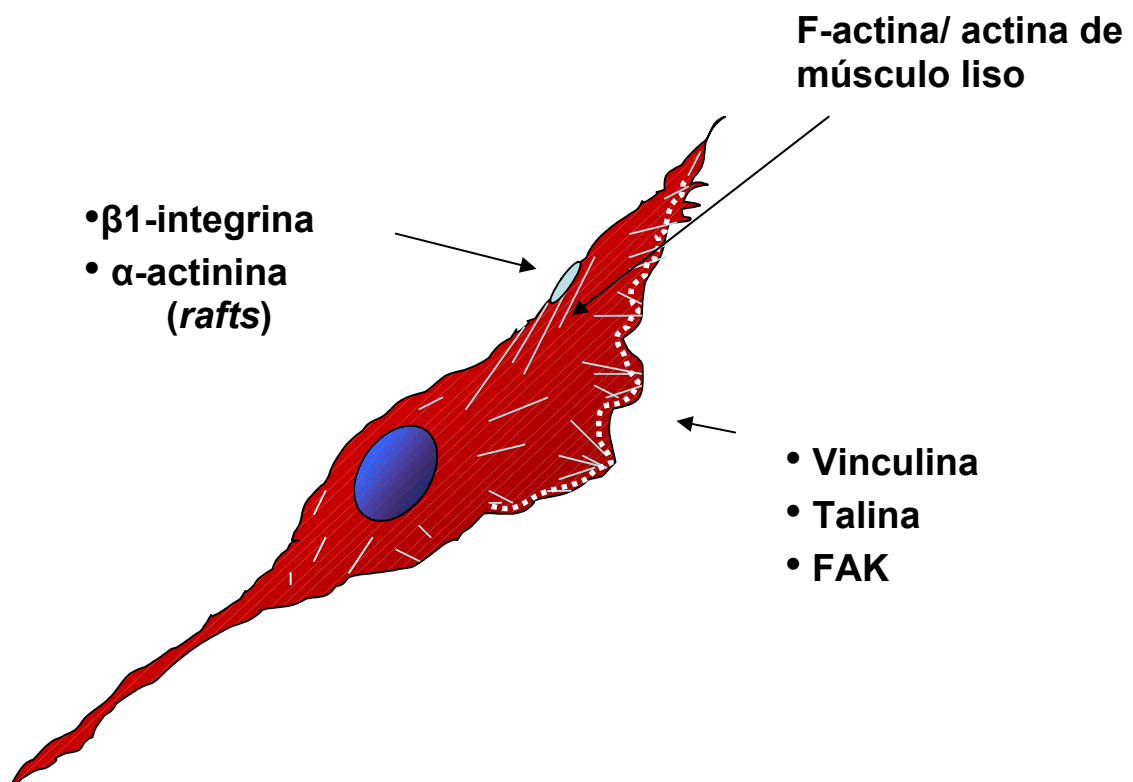


Figura 25 – Resumo esquemático dos resultados apresentados neste trabalho. A glia embainhante olfatória (GEO) pode expressar as proteínas de adesão β 1-integrina, α -actinina, vinculina, talina e a cinase de adesão focal (FAK), estando as duas primeiras preferencialmente associadas à *rafts* lipídicas.

6. Conclusões

- Virtualmente todas as células saídas das fatias organotípicas do BO em até 3 dias de cultura são células da glia embainhante olfatória (GEO), imunopositivas para os marcadores S-100, CNPase e α -actina de músculo liso.
- Células da GEO saídas de fatias organotípicas do bulbo olfatório (BO) e aderidas sob substrato de laminina podem apresentar pelo menos 3 morfologias distintas que variam aparentemente de acordo com seu estado migratório. Morfologias aplanadas e tripolares representam formas mais aderidas, com reduzido potencial de migração em relação à morfologia bipolar.
- Os padrões fibrilares de marcação das proteínas β 1-integrina, α -actinina, talina, bem como as pequenas regiões periféricas de marcação fibrilar da vinculina (adesões focais) são característicos de células ou regiões celulares mais aderidas da GEO, com maiores lamelipódios. Células de aparente maior motilidade, em contra partida (bipolares), apresentam marcações fibrilares pouco evidentes.
- Possivelmente as adesões fibrilares, mas não as adesões focais (positivas para vinculina), estão associadas às *rafts* da GEO.
- Da mesma forma que células de Schwann, a GEO expressa cinase de adesão focal (FAK), o que teria prováveis implicações na sinalização de laminina.

7. Perspectivas

- Analisar os componentes de adesão célula-matriz extracelular expressos pelas células da glia embainhante olfatória (GEO) em condições de culturas tridimensionais.
- Verificar a influência do bloqueio da proteína RhoA e de proteínas de adesão na migração da GEO.
- Identificar componentes de matriz extracelular secretados pela GEO.
- Analisar a fosforilação de proteínas de adesão como a vinculina e a paxilina na GEO.

8. Referências bibliográficas

- Adams, J.C. (2002). Regulation of protrusive and contractile cell–matrix contacts. *J Cell Sci.*, 115: 257-265.
- Agrawal, A.K., Shukla, S., Chaturvedi, R.K., Seth, K., Srivastava, N., Ahmad, A. & Seth, P.K. (2004). Olfactory ensheathing cell transplantation restores functional deficits in rat model of Parkinson's disease: a cotransplantation approach with fetal ventral mesencephalic cells. *Neurobiol Dis.*, 16(3): 516-526.
- Alberts, B., Lewis, J., Johnson, A., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, New York).
- Alvarez-Builla, A. & Temple, S. (1998). Stem cells in the developing and adult nervous system. *J. Neurobiol.*, 36: 105-110.
- Astic, L., Pellier-Monnin, V. & Godinot, F. (1998). Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neurosci.*, 84: 295-307.
- Au, E. & Roskams, A.J. (2003). Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia*, 41: 224-236.
- Barber, P.C. & Dahl, D. (1987). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve. *Exp Brain Res.*, 65(3): 681-685.
- Barnett, S.C., Hutchins, A.M. & Noble, M. (1993). Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev. Biol.*, 155: 337-350.
- Baron, W., Shattil, S.J. & French-Constant, C. (2002). The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of alpha(v)beta3 integrins. *EMBO J.*, 21(8):1957-1966.

- Baron, W., Decker, L., Colognato, H. & French-Constant, C. (2003). Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains. *Curr Biol.*, 13(2): 151-155.
- Boyd, J.G., Doucette, R. & Kawaja, M.D. (2005). Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *FASEB J.*, 19(7): 694-703.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Bellis, S.L., Miller, J.T. & Turner, C.E. (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem.*, 270(29): 17437-41.
- Brown, D.A. & London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.*, 275(23): 17221-17224.
- Burridge, K. & Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12:463-518.
- Burkin, D.J., Kim, J.E., Gu, M. & Kaufman, S.J. (2000). Laminin and alpha7beta1 integrin regulate agrin-induced clustering of acetylcholine receptors. *J Cell Sci.*, 113 (Pt 16): 2877-2886.
- Calderwood, D. A. (2004). Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans.*, 32(Pt3): 434-437.
- Carter, L.A., MacDonald, J.L. & Roskams, A.J. (2004). Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci.*, 23: 5670-5683.

- Cattelino, A., Albertinazzi, C., Bossi, M., Critchley, D.R. & de Curtis, I. (1999). A cell-free system to study regulation of focal adhesions and of the connected actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.*, 10(2): 373-391.
- Chen, H., Choudhury D.M. & Craig, S.W. (2006). Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *J Biol Chem.*, 281(52): 40389-40398.
- 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. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.*, 120(3): 421-433.
- Chuah, M.I. & Au, C. (1991). Olfactory Schwann cells are derived from precursor cell in the olfactory epithelium. *J. Neurosci. Res.*, 29: 172-180.
- Chuah, M.I., Cossins, J.M., Woodhall, E., Tennet, R., Nash, G. & West, A.K. (2000). Glial growth factor 2 induces proliferation and structural changes in ensheathing cells. *Brain Res.*, 857: 264-274.
- Chuah, M.I. & West, A.K. (2002). Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc. Res. Tech.*, 58: 216-227.
- Chuah, M.I., Choi-Lundberg, D., Weston, S., Vincent, A.J., Chung, R.S., Vickers, J.C. & West, A.K. (2004). Olfactory ensheathing cells promote collateral axonal branching in the injured adult rat spinal cord. *Exp Neurol.*, 185(1): 15-25.
- Colognato, H., Galvin, J., Wang, Z., Relucio, J., Nguyen, T., Harrison, D., Yurchenco, P.D. & Ffrench-Constant, C. (2007). Identification of dystroglycan as a second laminin receptor in oligodendrocytes, with a role in myelination. *Development.*, 134(9): 1723-1736.
- Cooper, G.M. (2000). The Cytoskeleton and Cell Movement. ***In:*** *The cell - a molecular approach.* Sinauer Associates.

- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R. & Yamada, K.M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.*, 294(5547): 1708-1712.
- Cukierman, E., Pankov, R. & Yamada, K.M. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol.*, 14(5):633-9.
- Decker, L. & ffrench-Constant, C. (2004). Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *J Neurosci.*, 24(15): 3816-3825.
- Deckner, M.L., Risling, M. & Frisé, J. (1997). Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat. *Exp Neurol.*, 143: 132-140.
- Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M. & Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol.*, 4(3): 232-239.
- Del Pozo, M.A. (2004). Integrin signaling and lipid rafts. *Cell Cycle.*, 3(6): 725-728.
- Del Pozo, M.A., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Chiang, H.H., Anderson, R.G. & Schwartz M.A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.*, 303(5659): 839-842.
- Deumens, R., Koopmans, G.C., Lemmens, M., Mollers, S., Honig, W.M. & Steinbusch, H.W. (2006). Neurite outgrowth promoting effects of enriched and mixed OEC/ONF cultures. *Neuroscience Letters*, 397(1-2): 20-24.
- Devon, R. & Doucette, R. (1992). Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res.*, 589: 175-179.
- Dewar, D., Bentley, D. & Barnett, S.C. (2007). Implantation of pure cultured olfactory ensheathing cells in an animal model of parkinsonism. *Acta Neurochir (Wien).*, 149(4): 407-414.

- Doucette, J.R. (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat. Rec.*, 210: 385-391.
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia*, 3: 433-449.
- Doucette, R. (1995). Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol Histopathol.*, 10(2): 503-507.
- Einheber, S., Milner, T.A., Giacotti, F. & Salzer, J.L. (1993). Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for alpha 6 beta 4 in myelination. *J Cell Biol.*, 123(5): 1223-1236.
- Einheber, S., Pierce, J.P., Chow, D., Znamensky, V., Schnapp, L.M. & Milner, T.A. (2001). Dentate hilar mossy cells and somatostatin-containing neurons are immunoreactive for the alpha8 integrin subunit: characterization in normal and kainic acid-treated rats. *Neuroscience.*, 105(3): 619-638.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W. & Barnes, M.J. (2004). Structure of the integrin alpha2beta1-binding collagen peptide. *J. Mol. Biol.* 335(4): 1019-28.
- Evans, E. A. & Calderwood, D. A. (2007). Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science.*, 316(5828): 1148-1153.
- Ezzell, R.M., Goldmann, W.H., Wang, N., Parashurama N. & Ingber D.E. (1997). Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp Cell Res.*, 231(1): 14-26, Erratum em: *Exp Cell Res.*, 314(10): 2163, 2008.
- Feltri, M.L., Scherer, S.S., Nemni, R., Kamholz, J., Vogelbacker, H., Scott, M.O., Canal, N., Quaranta, V. & Wrabetz, L. (1994). Beta 4 integrin expression in myelinating Schwann cells is polarized, developmentally regulated and axonally dependent. *Development.*, 120(5): 1287-1301.

- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature.*, 413(6852): 211-218.
- Fitch, M.T. & Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.*, 209(2): 294-301.
- Franceschini, I.A. & Barnett, S.C. (1996). Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev. Biol.*, 173: 327-343.
- Franklin, R.J. & Barnett, S.C. (1997). Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *J Neurosci Res.*, 50(5): 665-672.
- Gallant, N.D., Michael, K.E. & García, A.J. (2005). Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell.*, 16(9): 4329-4340.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M. & Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol.*, 159(4): 695-705.
- Gardiner, N.J., Moffatt, S., Fernyhough, P., Humphries, M.J., Streuli, C.H. & Tomlinson, D.R. (2007). Preconditioning injury-induced neurite outgrowth of adult rat sensory neurons on fibronectin is mediated by mobilisation of axonal alpha5 integrin. *Mol Cell Neurosci.*, 35(2): 249-260.
- Geiger, B. & Bershadsky, A. (2001). Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol.*, 13: 584-592.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2: 793-805.

- Gielen, E., Baron W., Vandeven, M., Steels, P., Hoekstra, D. & Ameloot, M. (2006). Rafts in oligodendrocytes: evidence and structure-function relationship. *Glia.*, 54(6): 499-512.
- Giannone, G., Jiang G, Sutton, D.H., Critchley, D.R. & Sheetz, M.P. (2003). Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J Cell Biol.*, 163(2): 409-419.
- Giulian, D. (1993). Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia*, 7: 102-110.
- Goldmann, W.H., Schindl, M., Cardozo, T.J. & Ezzell, R.M. (1995). Motility of vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cells analyzed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy. *Exp Cell Res.*, 221(2): 311-319.
- Graziadei, P.P. & Monti-Graziadei, G.A. (1978). Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5230-5234.
- Gomez, V.M., Averill, S., King, V., Yang, Q., Perez, E.D., Chacon, S.C., Ward, R., Nieto-Sampedro, M., Priestley, J. & Taylor, J. (2003). Transplantation of olfactory ensheathing cells fails to promote significant axonal regeneration from dorsal roots into the rat cervical cord. *J. Neurocytol.*, 32: 53-70.
- Goodman, M.N., Silver, J. & Jacobberger, J.W. (1993). Establishment and neurite outgrowth properties of neonatal and adult rat olfactory bulb glial cell lines. *Brain Res.*, 619(1-2): 199-213.
- Grove, M., Komiyama, N.H., Nave, K.A., Grant, S.G., Sherman, D.L. & Brophy, P.J. (2007). FAK is required for axonal sorting by Schwann cells. *J. Cell Biol.* 176(3): 277-82.

- Gudino-Cabrera, G., Pastor, A.M., de la Cruz, R.R., Delgado-Garcia, J.M. & Nieto-Sampedro M. (2000). Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport.*, 11: 467-471.
- Hinds, J.W. & Hinds, P.L. (1976). Synapse formation in the mouse olfactory bulb. II. Morphogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 169: 41-62.
- Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.*, 119(Pt 19): 3901-3903.
- Imaizumi, T., Lankford, K.L., Waxman, S.G., Greer, C.A. & Kocsis, J.D. (1998). Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 18(16): 6176-85.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y. & Arikawa-Hirasawa, E. (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J Cell Sci.*, 122(Pt 2): 289-299.
- Jahed, A., Rowland, J.W., McDonald, T., Boyd, J.G., Doucette, R. & Kawaja, M.D. (2007). Olfactory ensheathing cells express smooth muscle alpha-actin in vitro and in vivo. *J Comp Neurol.*, 503(2): 209-223.
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rüdiger, M., Schlüter, K., Stanke, G. & Winkler, J. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 11: 379-416.
- Kawaja, M. D. Boyd, J. G, Smithson, L. J, Jahed, A. & Doucette, R. (2009). Technical Strategies to Isolate Olfactory Ensheathing Cells for Intraspinal Implantation. *J Neurotrauma.*, 26: 1-24.

- Koenigsknecht, J. & Landreth, G. (2004). Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci.*, 24(44): 9838-9846.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Li N., Mak, A., Richards, D.P, Naber C., Keller, B.O., Li, L. & Shaw, A.R.E. (2003). Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics.*, 536-548.
- Li, Y., Field, P.M. & Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science.*, 277(5334): 2000-2002.
- Li, Y., Sauvé, Y., Li, D., Lund, R.D. & Raisman, G. (2003). Transplanted olfactory ensheathing cells promote regeneration of cut adult rat optic nerve axons. *J Neurosci.*, 23(21): 7783-7788.
- Li, Y., Field, P. M. & Raisman, G. (2005). Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia.*, 52(3): 245-251.
- Li, Y., Li, D., Khaw, P.T. & Raisman, G. (2008). Transplanted olfactory ensheathing cells incorporated into the optic nerve head ensheath retinal ganglion cell axons: possible relevance to glaucoma. *Neurosci. Lett.* 440(3): 251-4.
- Liu, J.B., Tang, T.S., Gong, A.H., Sheng, W.H. & Yang, J.C. (2005). The mitosis and immunocytochemistry of olfactory ensheathing cells from nasal olfactory mucosa. *Chin J Traumatol.*, 8(5):306-310.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). Molecular cell biology (W. H. Freeman and Company, New York).

- Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E. & Navarro, X. (2006). Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiology of Disease*, 21(1): 57-68.
- López-Vales, R., Forés, J., Navarro, X. & Verdú, E. (2007). Chronic transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery after complete spinal cord transection in the rat. *Glia.*, 55(3): 303-311.
- Lu, J. & Ashwell, K. (2002). Olfactory ensheathing cells: their potential use for repairing the injured spinal cord. *Spine*. 27: 887-892.
- Lu, P., Yang, H., Culbertson, M., Graham, L., Roskams, A. J., & Tuszynski, M. H. (2006). Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(43): 11120-11130.
- Lucero, H.A. & Robbins ,P.W. (2004). Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys.*, 426(2): 208-224.
- Maeda, M., Holder, E., Lowes, B., Valent, S. & Bies, R.D. (1997). Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation*, 95: 17–20.
- Mavlyutov, T.A. & Ruoho, A.E. (2007). Ligand-dependent localization and intracellular stability of sigma-1 receptors in CHO-K1 cells. *J Mol Signal.*, 2:8.
- Mierke, C.T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D., Smith, J., Fabry, B. & Goldmann, W.H. (2008). Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophys J.*, 94(2): 661-670.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A. & Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(1): 56-68.

- Morford, L.A., Forrest, K., Logan, B., Overstreet, L.K., Goebel J., Brooks W.H. & Roszman, T.L. (2002). Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 295(2): 540-546.
- Moulder, G.L, Huang, M.M., Waterston, R.H. & Barstead, R.J. (1996). Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.*, 7(8): 1181-1193.
- Molony, L., McCaslin, D., Abernethy, J., Paschal, B. & Burridge, K. (1987). Properties of talin from chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 262: 7790–7795.
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell*, 115 (4): 377-388.
- Nash, H.H., Borke, R.C. & Anders, J.J. (2001). New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia*, 34: 81-87.
- Nebl, T., Pestonjamas, K.N., Leszyk, J.D., Crowley, J.L., Oh S.W. & Luna, E.J. (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem.*, 277(45): 43399-43409.
- Nedelec, S., Dubacq, C. & Trembleau, A. (2005). Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol.*, 34: 49-64.
- Nuckolls, G.H., Romer, L.H. & Burridge, K. (1992). Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. *J Cell Sci.*, 102 (Pt 4): 753-762.
- Owens, L.V., Xu, L., Craven, R.J., Dent, G.A., Weiner, T.M., Kornberg, L., Liu, E.T. & Cance, W.G.. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, 55: 2752–2755.

- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. & Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.*, 3(8): 723-729.
- Palazzo, A.F., Eng, C.H., Schlaepfer, D.D., Marcantonio, E.E. & Gundersen, G.G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science.*, 303(5659): 836-839.
- Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B.Z., Matsumoto, K., Lin, D.C., Lin, S., Hahn, C. & Yamada, K.M. (2000). Integrin dynamics and matrix assembly. Tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol.*, 148: 1075-1090.
- Pasterkamp, R.J., De Winter, F., Holmaat, A.J.G.D. & Verhaagen, J. (1998). Evidence for a role of the chemorepellent semaphoring III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J. Neurosci.*, 18: 9962-9976.
- Pixley, S. K. (1992). The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia.* 5: 269-284.
- Plant, G.W., Christensen, C.L., Oudega, M. & Bunge, M.B. (2003). Delayed transplantation of olfactory ensheathing glia promotes sparing/regeneration of supraspinal axons in the contused adult rat spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 20(1): 1-16.
- Purves, D., Augustine G.J., Fitzpatrick, D., Katz L.C., Lamantia, A.S., Mcnamara, J.O. & Williams, S.M. (2001). The Organization of the Nervous System. *In:Neuroscience. Sinauer Associates.*
- Ramer, L.M., Richter, M.W., Roskams, A.J., Tetzlaff, W. & Ramer, M.S. (2004). Peripherally-derived olfactory ensheathing cells do not promote primary afferent regeneration following dorsal root injury. *Glia*, 47(2): 189-206.

- Ramón-Cueto, A. & Nieto-Sampedro, M. (1992). Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience.*, 47(1): 213-220.
- Ramón-Cueto, A., Pérez, J. & Nieto-Sampedro, M. (1993). In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci.*, 5(9): 1172-1180.
- Ramón-Cueto, A. & Nieto-Sampedro, M. (1994). Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol.*, 127(2): 232-244.
- Ramón-Cueto, A. & Avila, J. (1998). Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res. Bull.*, 46: 175-187.
- Ramón-Cueto, A. & Valverde, F. (1995). Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia*, 14: 163-173.
- Resnick, D.K., Cechvala, C.F., Yan, Y., Witwer, B.P., Sun, D. & Zhang, S. (2003). Adult olfactory ensheathing cell transplantation for acute spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 20(3): 279-285.
- Rodriguez, S., Sickles, H.M., Deleonardis, C., Alcaraz, A., Gridley, T. & Lin, D.M. (2008). Notch2 is required for maintaining sustentacular cell function in the adult mouse main olfactory epithelium. *Dev. Biol.* 314(1): 40-58.
- Santos-Silva, A. & Cavalcante, L.A. (2001). Expression of the non-compact myelin protein 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the olfactory bulb ensheathing glia from explant cultures. *Neurosci., Res.*, 40: 189-193.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R. & Parsons, J.T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell Biol.* 14(3): 1680-8.

- Selliah N., Brooks W.H., Roszman T.L. (1996). Proteolytic cleavage of alpha-actinin by calpain in T cells stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol.*, 156(9):3215-21.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H. & Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2(5): 249-56.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(1): 31-39.
- Su, Z., Cao, L., Zhu, Y., Liu, X., Huang, Z., Huang, A. & He, C. (2007). Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *J Cell Sci.*, 120(Pt 11): 1877-1887.
- Tachibana, K., Urano, T., Fujita, H., Ohashi, Y., Kamiguchi, K., Iwata, S., Hirai, H. & Morimoto, C. (1997). Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J. Biol. Chem.* 272(46): 29083-90.
- Takami, T., Oudega, M., Bates, M.L., Wood, P.M., Kleitman, N. & Bunge, M.B. (2002). Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci.*, 22(15), 6670-6681.
- Thiery, J.P. & Petit, V. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell*, 92: 477-494.
- Tsuda, K., Furuta, N., Inaba, H., Kawai, S., Hanada, K., Yoshimori, T. & Amano, A. (2008). Functional analysis of alpha5beta1 integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. *Cell Struct. Funct.* 33(1): 123-32.

- Valverde, F., Santacana, M. & Heredia, M. (1992). Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neurosci.*, 49: 255-275.
- Vincent, A.J., West, A.K. & Chuah, M.I. (2005). Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J. Neurocytol.*, 34: 65–80.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T. & Horwitz., A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.*, 6154–6161.
- Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H. & Campbell, I.D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*. 128(1): 171-82.
- Weiler, E. & Farbman, A.I. (1997). Proliferation in the rat olfactory epithelium: Age-dependent changes. *J. Neurosci.*, 17: 3610-3622.
- Windus, L.C., Claxton, C., Allen, C.L., Key, B. & St John, J.A. (2007). Motile membrane protrusions regulate cell-cell adhesion and migration of olfactory ensheathing glia. *Glia*, 55: 1708-1719.
- Yamada, K.M., Geiger, B., Bershadsky, A. & Pankov, R. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2: 793-805.
- Zamir, E. & Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.*, 114(Pt 20): 3583-3590.
- Ziegler, W.H., Gingras, A.R., Critchley, D.R. & Emsley J. (2008). Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem Soc Trans.*, (Pt2): 235-239.

9- Anexo

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Correio Eletrônico

Page 1 of 1

Data: Wed, 07 May 2008 14:37:36 -0300 [07-05-2008 14:37:36 BRST]

De: ceua_ccs@biof.ufrj.br

Para: leny@biof.ufrj.br

Assunto: Comitê de Ética

Parte(s): 2 Doc1.doc [application/msword] 48 KB

1 sem nome [text/plain] 0,42 KB

Prezada Professora;

O Comitê de Ética do CCS já possui o parecer favorável de seu projeto de pesquisa. Protocolo: IBCCF 020

projeto: Ações e reações de células gliais em patologias experimentais.

segue em anexo a página que contém o parecer.

Atenciosamente

Marcelo Morales

12

VII DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR:

Estou familiarizado com os "Princípios Básicos para a Pesquisa Envolvendo o Uso de Animais" aprovados pelo Conselho Departamental do IBCCF em 09/09/92. Concordo em aceitar essas normas na condução dos estudos descritos anteriormente.

Nesse estudo, eu considero a possibilidade de utilizar métodos alternativos aos modelos animais e conclui que eles não estão disponíveis ou são inadequados por razões científicas.

Afirmo que esse estudo não é desnecessariamente duplicativo e tem mérito científico e a equipe que participa desse projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo.

Nome: Leny Alves Cavalcante

Assinatura

Leny Alves Cavalcante Data: 04/05/08

VII PARECER:

Marcelo Morales
MARCELO M. MORALES
Presidente da Comissão
de Ética com Animais - CCS

08/05/08

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](#)