



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas**

**Cristiane Monteiro Eller**

**Efeito dos fatores de crescimento,  
TGF- $\beta$ 1 e EGF, na migração  
neuronal cerebelar**

**Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de  
Janeiro visando o grau de mestre em Ciências  
Morfológicas**

**2009**

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

# **Efeito dos fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 1 e EGF, na migração neuronal cerebelar**

**Cristiane Monteiro Eller**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Orientadora: Flávia Carvalho Alcantara Gomes**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Eller, Cristiane Monteiro

**EFEITO DOS FATORES DE CRESCIMENTO, TGF- $\beta$ 1 E EGF, NA MIGRAÇÃO NEURONAL CEREBELAR. / CRISTIANE MONTEIRO ELLER – RIO DE JANEIRO: UFRJ/ICB, 2009.**

**XIV, 87f.:il.**

**Orientadora: Flávia Carvalho Alcantara Gomes**

**Dissertação (mestrado) – UFRJ/ICB/Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas, 2009.**

**Referências Bibliográficas: f: 75-87**

**1. SISTEMA NERVOSO CENTRAL. 2. CEREBELO. 3. GLIA DE BERGMANN. 4. MIGRAÇÃO. 5. TGF-B1. 6. EGF**

**I. Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**II. Tese**

**Cristiane Monteiro Eller**

**Efeito dos fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 1 e EGF, na migração neuronal cerebelar**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas (PCM), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Aprovado por:

Prof. Flávia Carvalho Alcântara Gomes – Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) – UFRJ  
Orientadora

Prof. Silvana Allodi – Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) – UFRJ

Prof. Daniela Uziel Rosental – Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) – UFRJ

Prof. Penha Barradas – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) – UERJ

Prof. Cecília Hedin Pereira – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) – UFRJ  
Revisora e suplente

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Departamento de Anatomia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Professora Flávia Carvalho Alcantara Gomes, com os recursos concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência – Ministério da Ciência e Tecnologia (PRONEX) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*Dedico esta dissertação, sobretudo a Deus e também a todas as  
pessoas que passaram pela minha vida e deixaram sua contribuição  
nela.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me ajudado nas horas mais conturbadas da minha caminhada, por ter estado sempre ao meu lado, guiando-me e ajudando-me a tomar cada decisão da minha vida.

Agradeço a minha família (minha mãe Cátia, meu pai Vilder e meu avô Antônio), por terem me apoiado, sempre, em todas as escolhas que fiz ao longo do meu caminho. Agradeço por toda torcida, confiança e encorajamento que me deram ao longo de minha caminhada, pois isto, sem dúvida alguma, me ajudou principalmente nos momentos mais difíceis. Agradeço também a toda a minha imensa família, meus tios e primos, por tentarem uma união. Agradeço, em especial, ao Felipe Torres, por tudo.

Existem também pessoas muito queridas a quem gostaria de agradecer de modo especial, pois eles foram fundamentais em minha vida. Infelizmente, não se encontram mais entre nós, para que eu possa agradecê-los por todo amor e carinho que me dedicaram. São eles o meu irmão e grande amigo Antônio e também as minhas avós Noêmia e Yolanda e ao meu avô Edir.

Com relação aos que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, agradeço principalmente a minha orientadora Flávia, pelo seu grande apoio e dedicação, no desenvolvimento deste trabalho. A todos os integrantes do Laboratório de Neurobiologia Celular, à Joice, Tânia, Luciana, Rômulo, Juliana, Daniel, Aline, Fernando, Ismael e, especialmente, ao Rodrigo, por toda a ajuda e apoio dedicados. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento da dissertação, em especial aos professores Natan Lessa e Marcelo Santiago.

Gostaria de agradecer também a todos os amigos que me ajudaram ao longo da vida e, principalmente, a todos os amigos que fiz nestes anos de pesquisa, pois eles me ajudaram muito em diversos momentos, e também influenciaram muitas das minhas decisões.

Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram pela minha vida e que deixaram nela sua marca



**Cristiane Monteiro Eller**

## Resumo

O cerebelo é uma estrutura do sistema nervoso central (SNC) dividido histologicamente em camadas bem definidas, caracterizadas por poucos tipos celulares, o que o torna um ótimo modelo para estudos de interações celulares. As camadas cerebelares no animal adulto são: camada molecular; camada de Purkinje e camada granular. Durante o desenvolvimento, os precursores dos neurônios granulares, localizados na camada granular externa (EGL) migram desta para a camada granular interna. Este evento é mediado por um tipo específico de célula glial, denominada glia de Bergmann. Diversos são os fatores moduladores do processo de migração celular no SNC. Este trabalho se dedicou a entender o papel do fator de crescimento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), e do fator de crescimento epidermal (EGF) na migração cerebelar *in vitro*. Para isto, foram utilizados como modelo experimental de migração, explantes cerebelares de ratos de 5 a 7 dias pós-natais, e como modelo, para estudo da morfologia da glia de Bergmann, cultura enriquecida neste tipo celular. Demonstramos que tanto o raio de migração quanto à morfologia da glia de Bergmann permanecem inalterados em presença de TGF- $\beta 1$ , mesmo quando se usa diferentes concentrações, mostrando que este fator não possui efeito sobre a migração neuronal neste órgão. O tratamento de explantes cerebelares com EGF, no entanto, induziu o aumento da distância de migração, assim como um alongamento das fibras gliais em de cerca de 30%. A utilização de inibidores de diversas vias de sinalização demonstrou que ambos os eventos agem através da via de MAPK. Contrariamente aos dados *in vitro*, a injeção intraventricular de EGF não alterou o número de neurônios migratórios *in vivo*. Nossos dados demonstram que EGF é um fator relevante no processo de migração no cerebelo e sugerem que o mecanismo pelo qual ele age seja através do alongamento da glia de Bergmann com o envolvimento da via de MAPK.

## Abstract

The cerebellum is a structure of the central nervous system (CNS) divided histologically into well defined layers, characterized by few cell types. This making it a great model to studies cell interaction. The cerebellar layers in the adult animal are: molecular layer, layer of Purkinje and granular layer. During development the granular cell precursors, located in the external granular layer (EGL) migrate to internal granular layer. This event is mediated by a specific glial cell type, the Bergmann glia. Exist many factors that can modulating migration in CNS. This work tray to understand the role of two different factors in the developing cerebellum: transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) and epidermal growth factor (EGF). As migration experimental model were used cerebellar explants from rats of 5 to 7 days after births, and as a model to study the morphology of the glial Bergmann, culture enriched in this cell type. We demonstrate that both the migration distance and morphology of Bergmann glial remain unchanged at presence of TGF- $\beta$ 1. Even when different TGF- $\beta$ 1 concentrations were used. This shows that this factor has no effect on neuronal migration. The cerebellar explants treatment with EGF however induced the distance increase of migration and Bergamann glia's fiber elongation in approximately 30%. Both events are mediated by MAPK pathway. Against the *in vitro* data injection EGF and BrdU do not change the migrate neuronal number *in vivo*. Our data show EGF as a relevant factor in the cerebellar migration and suggest that the mechanism by which it acts to induce migration and Bergmann glial elongation is by MAPK pathway.

## Lista de abreviações

**BLBP** - Proteína ligadora de lipídio do cérebro (do inglês: *Brain lipid binding protein*)

**BMP** - Proteína morfogenética óssea (do inglês: *bone morphogenetic protein*)

**BSA** - Soro albumina bovina

**DAPI** - 4'6-Diamidino -2- phenylindole

**EGF** - Fator de crescimento epidermal (do inglês: *epidermal growth factor*)

**EGFR** - Receptor do fator de crescimento *epidermal* (do inglês: *epidermal growth factor receptor*)

**EGL** - Camada granular externa (do inglês: *external granular layer*)

**FGF**- Fator de crescimento fibroblástico (do inglês: *fibroblast growth factor*)

**Gal-C** – galactosilceramidase (do inglês: *galactosylceramidase*)

**GFAP** - Proteína acídica fibrilar glial (do inglês: *glial fibrillar acid protein*)

**GGF** - Fator de crescimento glial (do inglês: *glial growth factor*)

**IGL** - Camada granular interna (do inglês: *internal granular layer*)

**MAPK**- Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês: *Mitogen-activated protein kinase*)

**MCS** - Meio com soro

**MgSO<sub>4</sub>** – Sulfato de magnésio

**NCAM** - Molécula de adesão celular neural (do inglês: *Neural cell adhesion molecule*)

**NG2** – proteoglicano de condroitil sulfato ( do inglês: *Chondroitin sulfate proteoglycan*)

**PBS** - Tampão salina fosfato

**PI3**- Fosfoinositol 3 cinase (do inglês: *Phosphoinositide 3-kinase*)

**PKA**- Proteína cinase A (do inglês: *Protein kinase A*)

**SFB** - Soro fetal bovino

**Shh**- Sonic hedgehog

**SNC** - Sistema nervoso central

**TGF $\alpha$**  - Fator de crescimento transformante alfa (do inglês: *Transforming growth factor alfa*)

**TGF- $\beta$ 1** - Fator de crescimento transformante beta 1 (do inglês: *Transforming growth factor beta 1*)

**TGFR I** - Receptor tipo I de TGF- $\beta$ 1 (do inglês: *Transforming growth factor receptor I*)

**TGFR II** - Receptor tipo II de TGF- $\beta$ 1 (do inglês: *Transforming growth factor receptor II*)

## Lista de figuras

- Figura 1:** Conexões cerebelares
- Figura 2:** Componentes celulares e camadas cerebelares no adulto
- Figura 3:** Ontogênese cerebelar
- Figura 4:** Lóbulos cerebelares de um rato adulto
- Figura 5:** Via de sinalização do TGF- $\beta$ 1
- Figura 6:** Esquema ilustrativo da videomicroscopia
- Figura 7:** Esquema ilustrativo do processo de injeção
- Figura 8:** Caracterização da cultura de explante cerebelar
- Figura 9:** EGF promove aumento na migração neuronal de ratos pós-natos
- Figura 10:** Gradiente de concentração de TGF- $\beta$ 1
- Figura 11:** Cinética migratória de cerebelos de ratos embrionários
- Figura 12:** Videomicroscopia de explantes cerebelares.
- Figura 13:** Alongamento das células gliais em explante
- Figura 14:** Caracterização da cultura mista
- Figura 15:** Efeito dos fatores, TGF- $\beta$ 1 e EGF, no alongamento da glia de Bergmann.
- Figura 16:** Caracterização da cultura de glia de Bergmann
- Figura 17:** Efeito do EGF diretamente sobre o alongamento da glia de Bergmann
- Figura 18:** Glia de Bergmann expressa EGFR e TGFRII
- Figura 19:** Efeito de inibidores farmacológicos de via de sinalização na migração neuronal
- Figura 20:** Efeito de inibidores farmacológicos de via de sinalização no alongamento glial
- Figura 21:** Morfologia cerebelar dos animais injetados com EGF
- Figura 22:** Efeito do EGF na migração neuronal in vivo
- Figura 23:** Efeito do EGF na migração neuronal in vivo
- Figura 24:** Esquema representando os efeitos do EGF
- Figura 25:** Representação dos efeitos do TGF- $\beta$ 1 sobre a glia de Bergmann

# Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 - Introdução</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 - O cerebelo  | 1         |
| 1.1.1 - Anatomia e histologia   | 1         |
| 1.1.2 - Fisiologia  | 4         |
| 1.2 - Ontogênese cerebelar  | 6         |
| 1.2.1 - Migração neuronal   | 10        |
| 1.2.2 - Glia de Bergmann  | 11        |
| 1.2.3 - Fatores extracelulares reguladores da migração neuronal                     | 13        |
| 1.3 - Fator de crescimento transformante $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)                 | 15        |
| 1.4 - Fator de crescimento epidermal (EGF)  | 19        |
| 1.5 - Justificativa do trabalho   | 21        |
| <b>2 - Objetivos</b>  | <b>22</b> |
| 2.1 - Geral   | 22        |
| 2.2 - Específicos   | 22        |
| <b>3 - Materiais e métodos</b>  | <b>23</b> |
| 3.1 - Animais   | 23        |
| 3.2 - Cultura de explante   | 23        |
| 3.3 - Quantificação da migração <i>in vitro</i>                                     | 24        |
| 3.4 - Filmagem  | 24        |
| 3.5 - Quantificação da filmagem   | 25        |
| 3.6 - Cultura mistade células cerebelares   | 26        |
| 3.7 - Cultura de glia de Bergmann   | 27        |
| 3.8 - Imunocitoquímica  | 28        |
| 3.9 - Análise morfológica da glia de Bergmann                                       | 29        |
| 3.10 - Ensaios de inibição de vias de sinalização                                   | 29        |
| 3.11 - Ensaios de injeção de fatores <i>in vivo</i>                                 | 30        |
| 3.12 - Perfusão e preparação do tecido  | 31        |
| 3.13 - Análise da migração neuronal <i>in vivo</i>                                  | 32        |
| 3.13.1 - Preparação histológica   | 32        |
| 3.13.2 - Quantificação da migração neuronal <i>in vivo</i> - cresil violeta         | 33        |
| 3.13.3 - Imunoistoquímica   | 33        |
| 3.13.4 - Quantificação da migração neuronal <i>in vivo</i> -BrdU                    | 34        |
| 3.14 - Análise estatística  | 35        |
| <b>4 - Resultados</b>   | <b>36</b> |
| 4.1 - Cultura de explantes  | 36        |
| 4.2 - Efeitos do TGF- $\beta$ 1 e do EGF na migração neuronal cerebelar             | 38        |
| 4.2.1 - Cinética da migração neuronal nos explantes cerebelares de ratos pós-natais | 38        |
| 4.2.2 - Gradiente de concentração de TGF- $\beta$ 1                                 | 41        |
| 4.3 - Cinética da migração neuronal nos explantes cerebelares de ratos embrionários | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4 - Filmagem de explantes tratados com EGF   | 45        |
| 4.5 - Efeito de EGF e TGF- $\beta$ 1 no alongamento da glia de Bergmann                              | 47        |
| 4.6 - Identificação de receptores para TGF- $\beta$ 1 (TGFRII) e EGF (EGFR) na glia de Bergmann      | 52        |
| 4.7 - Análise da via de sinalização ativada por EGF  | 54        |
| 4.8 - Morfologia cerebelar   | 57        |
| 4.9 - Efeito do EGF na migração neuronal cerebelar <i>in vivo</i>                                    | 59        |
| <b>5 - Discussão</b>   | <b>62</b> |
| 5.1 - Migração celular   | 62        |
| 5.2 - Alongamento da glia de Bergmann  | 67        |
| 5.3 – Análise da via de sinalização  | 68        |
| 5.4 - Migração de células granulares no período pós-natal <i>in vivo</i>                             | 70        |
| 5.5 – Conclusões   | 71        |
| <b>6 – Conclusões</b>  | <b>74</b> |
| <b>7 – Referências</b>   | <b>75</b> |
| <b>Anexo I</b>   |           |
| Artigo: Characterization of TGF- $\beta$ type II receptor expression in cultured cortical astrocytes |           |
| <b>Anexo II</b>  |           |
| Aprovação do comitê de ética   |           |
| <b>Anexo III</b>   |           |
| Curriculum vitae   |           |



# **1 - Introdução**

## **1.1 - O cerebelo**

### **1.1.1 - Anatomia e histologia**

O cerebelo é uma estrutura do sistema nervoso central (SNC) que está localizada no interior da caixa craniana, interposto entre o tronco cerebral e os lobos occipitais do cérebro. Está situado dorsalmente ao bulbo e à ponte, contribuindo para a formação do teto do IV ventrículo. Pode-se dividir esta estrutura em duas porções laterais, os hemisférios cerebelares, unidas por uma massa central, o vérmis. A superfície desta estrutura apresenta sulcos que delimitam as folhas cerebelares, de direção predominantemente transversal; estes sulcos denominam-se lâminas que se apresentam na superfície do órgão.

Ao se examinar o cerebelo ao microscópio, pode-se observar que ele é constituído de um córtex, formado por três camadas celulares, e uma substância branca em cujo interior encontram-se quatro núcleos profundos em cada hemisfério: o núcleo fastigial, os interpostos (globuloso e emboliforme) e o núcleo denteado. Os núcleos fastigiais recebem aferência da região do vermis, os interpostos recebem das zonas longitudinais intermediárias situadas entre o vérmis e os hemisférios e os núcleos denteados recebem das regiões mais laterais dos hemisférios. O córtex do lóbulo flóculo-nodular conecta-se com os núcleos vestibulares, que deste ponto de vista, também podem ser considerados núcleos profundos cerebelares, apesar de estarem localizados no

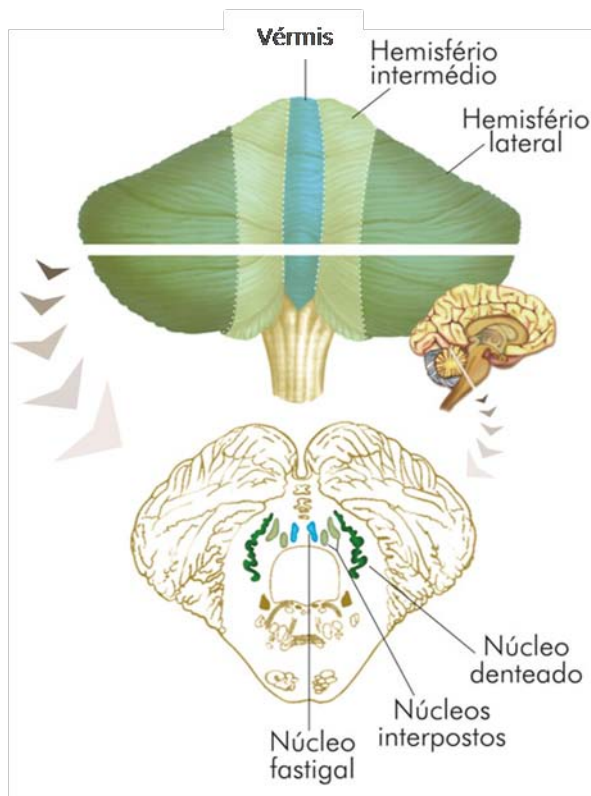
tronco encefálico. Com base nestas relações conectivas, os histologistas propuseram um novo zoneamento do cerebelo, que seria formado por quatro regiões de cada lado: o vérmis, o hemisfério intermédio, o hemisfério lateral e o lóbulo flóculo-nodular (Lent, 2004) (**Figura 1**).

No córtex cerebelar, encontra-se a maior densidade de corpos celulares. O cerebelo constitui apenas 10% do volume total do encéfalo, mas contém cerca de 80% dos neurônios do SNC, principalmente devido à alta densidade celular dos neurônios granulares localizados no córtex cerebelar (Azevedo *et al*, 2009).

O cerebelo pode ser dividido em duas principais regiões do ponto de vista histológico: a substância branca e a cinzenta. A primeira é constituída, principalmente, de astrócitos e fibras nervosas, sendo a maioria mielinizada por oligodendrócitos. A segunda localiza-se no córtex. Esta apresenta uma maior densidade celular e é uma região onde ocorre grande quantidade de sinapses, sendo que os axônios aferentes de modo geral são não mielinizados.

Histologicamente, o córtex cerebelar é formado por oito diferentes populações neuronais, são estas: células de Purkinje, células de Golgi, células de Lugaro, células granulares, células em cesto, células estreladas, células unipolares em escova e células candelabro. As camadas celulares que constituem o córtex cerebelar adulto são: *camada molecular (ML)*, *camada de células de Purkinje (PC)* e *camada granular*. A camada molecular é formada pelas células estreladas e em cesto, além das fibras paralelas (formadas pelos axônios dos neurônios granulares) e dos dendritos das células de Purkinje. A camada de Purkinje é constituída pelos corpos desses neurônios, além dos corpos da glia de Bergmann e das células de Lugaro, candelabro e Golgi. Já na

camada granular encontram-se as células unipolares em escova e os numerosos neurônios granulares, estas são células esféricas com pouca quantidade de citoplasma e providas de curtos dendritos e que constituem o grupamento de neurônios mais numeroso do cerebelo (Machado, 1993).

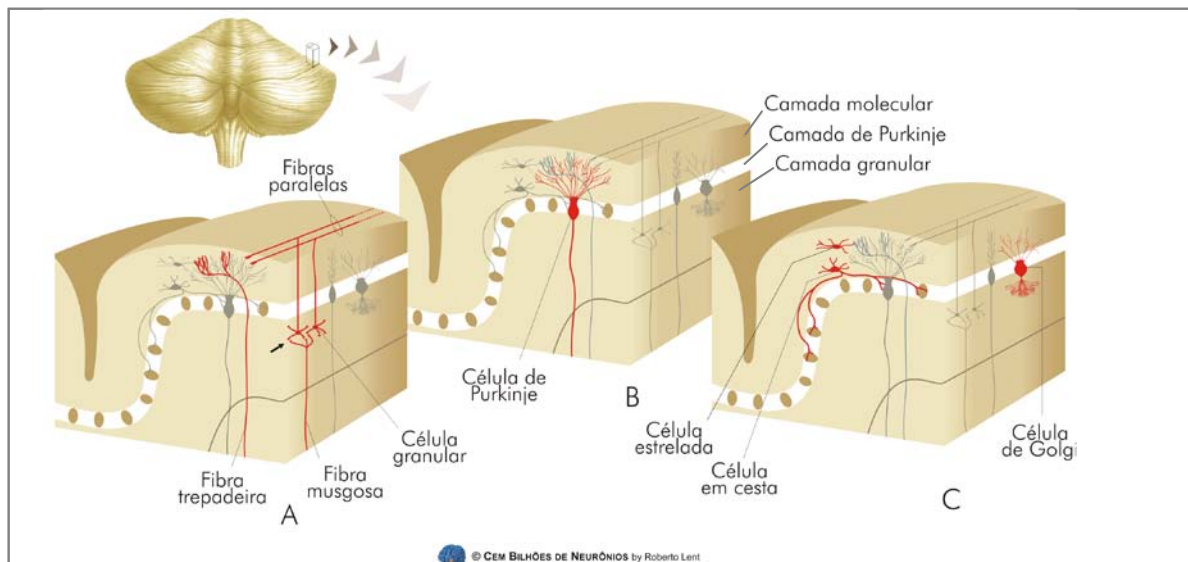


**Figura 1:** *Conexões cerebelares.* O cerebelo, do ponto de vista de suas conexões com os núcleos profundos, divide-se em: vérmis, hemisfério intermédio, hemisfério lateral. Os núcleos fastigiais recebem aferência do vérmis, os interpostos, das zonas longitudinais intermediárias e os núcleos dentados recebem das regiões mais laterais dos hemisférios. O córtex do lóbulo flóculo-nodular conecta-se com os núcleos vestibulares. Adaptado de Lent, 2004.

## 1.1.2 - Fisiologia

O cerebelo é associado a atividades motoras, à promoção do equilíbrio e do ajuste fino do movimento. Lesões cerebelares, na fase adulta, podem causar alterações na coordenação dos membros, no equilíbrio e diminuição no tônus muscular (Dietrichs *et al*, 2008). Também funções envolvendo atividades sensoriais, e mais recentemente, atividades cognitivas e emocionais, vêm sendo atribuídas ao cerebelo (Alder *et al*, 1999; Xu *et al*, 2006 e Tavano *et al*, 2007). A idéia do cerebelo como órgão que participa em atividades cognitivas, vem ganhando força nos últimos anos devido a novas descobertas, como a caracterização da síndrome afetiva e cognitiva cerebelar. Nela, pacientes com lesões no lóbulo posterior possuem maiores problemas cognitivos; lesões no vérmis causam desordem social e afetiva com sintomas próximos ao autismo e já, no lóbulo anterior, os pacientes possuem sintomas menos pronunciados (Tavano *et al*, 2007). Além disso, a análise por ressonância magnética revelou que crianças com déficit de atenção/desordens hiperativas possuem redução na área do vérmis cerebelar, associando assim o cerebelo com funções cognitivas (Bledsoe *et al*, 2009).

O cerebelo possui circuitos intrínsecos básicos para todas as regiões do SNC (**Figura 2**). O processamento da informação é semelhante em todo o cerebelo, modificando-se apenas o seu significado em função da origem das fibras aferentes que chegam a cada região cerebelar e o destino das fibras eferentes.



**Figura 2:** Componentes celulares e camadas cerebelares no adulto. Em **A**, destacam-se as fibras trepadeiras, musgosas e paralelas, além das células granulares. Em **B**, têm-se as células de Purkinje e as camadas cerebelares destacadas. Em **C**, mostram-se as células estreladas, em cesto e de Golgi. Adaptado de Lent, 2004.

Os circuitos intrínsecos do cerebelo começam com as fibras aferentes; as fibras trepadeiras e as fibras musgosas. As primeiras originam-se especificamente no núcleo olivar inferior, situado no bulbo. São excitatórias e terminam exclusivamente no córtex cerebelar. Cada fibra trepadeira estabelece contato sináptico com os dendritos de apenas uma célula de Purkinje (Lent, 2004). Já as fibras musgosas são provenientes de vários núcleos da medula espinhal, do tronco cerebral e dos núcleos profundos do cerebelo. Estas constituem o principal sistema de entrada de informações do cerebelo. São fibras excitatórias que terminam no córtex cerebelar, emitindo projeções colaterais para os núcleos profundos, logo ao entrar no cerebelo. Estas fibras se comunicam indiretamente com neurônios de Purkinje através dos neurônios granulares, cujos axônios atingem a camada molecular bifurcando-se em T e formando as fibras paralelas, através das quais uma única fibra musgosa pode afetar inúmeras células de Purkinje (Rammani *et al*, 2006).

As células de Purkinje exercem um papel de extrema importância dentro dos circuitos intrínsecos do cerebelo, pois constituem a única via eferente do córtex cerebelar.

## **1.2 - Ontogênese cerebelar**

O SNC se desenvolve a partir da placa neural, que tem origem no epitélio dorsal formado durante a gastrulação. No decorrer do desenvolvimento, a placa neural se fecha dorsalmente e forma o tubo neural. Este, por sua vez, irá formar uma série de vesículas sendo a mais anterior chamada de prosencéfalo (que se subdivide em telencéfalo e diencéfalo), seguida pelo mesencéfalo, rombencéfalo (que também se subdivide em mielencéfalo e metencéfalo), e pela medula espinhal (Chizhikov & Millen, 2003). O cerebelo origina-se a partir do metencéfalo.

O cerebelo apresenta parte de sua formação durante o período pré-natal, porém, diferente da maioria dos componentes do SNC, a formação deste se dá em grande parte no período pós-natal. Durante o seu desenvolvimento, há o aparecimento de duas zonas germinativas que são formadas em períodos distintos da ontogênese cerebelar, uma com o pico migratório no período embrionário e a outra no pós-natal (Chizhikov & Millen, 2003).

A primeira zona proliferativa a surgir é tem origem no neuroepitélio germinativo adjacente ao teto do quarto ventrículo e em seus recessos laterais. Esta dá origem aos núcleos profundos e às células de Purkinje. O período de proliferação destas populações celulares praticamente coincide, porém os neurônios dos núcleos profundos são gerados ligeiramente antes das células

de Purkinje (Sotelo, 2004). Logo após a geração destas populações celulares, estas iniciam a migração para suas camadas de destino. As células de Purkinje migram através da glia radial (também formada a partir do neuroepitélio germinativo do quarto ventrículo). Logo após o estabelecimento destes neurônios em sua camada de destino, a glia radial se diferencia em glia de Bergmann, que irá então dar sustentação a uma segunda onda migratória mais tardia (Choi *et al*, 1980).

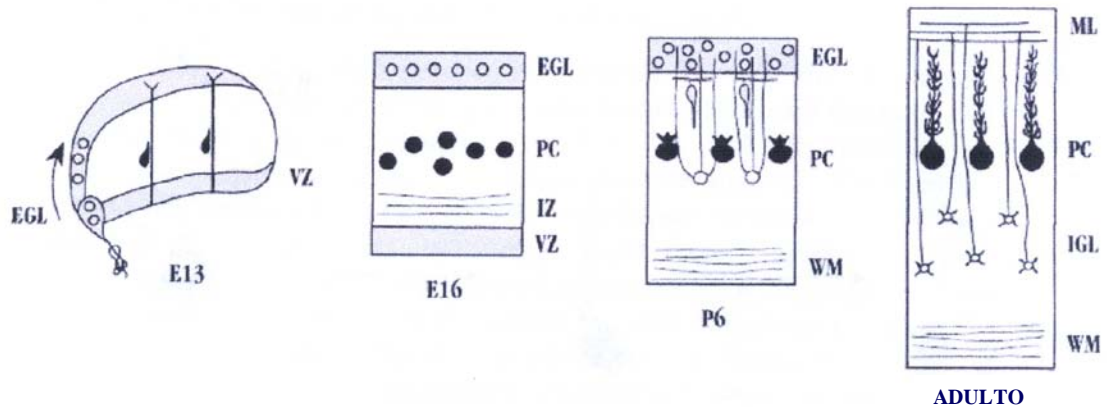
A segunda zona proliferativa ocorre na camada granular externa (EGL), originada a partir da margem livre entre o mesencéfalo e o metencéfalo, região chamada de lábio rômboide. Os precursores dos neurônios granulares, que formarão a EGL, migram tangencialmente a partir do lábio rômboide, sobre a superfície cerebelar até cobri-la totalmente. Estes precursores, uma vez na EGL, migrarão radialmente através das fibras da glia de Bergmann, que guiarão os mesmos até a camada granular interna (IGL), onde estas células se diferenciarão. Este tipo de migração tem início no final do período embrionário e pico na primeira semana pós-natal. Ao final deste processo, há o desaparecimento da EGL, permanecendo somente a IGL no adulto (**Figura 3**) (Rakic, 1990, Rakic, 1971 e Sotelo, 2004).

Várias moléculas estão envolvidas no processo de proliferação, amadurecimento e migração celular no cerebelo, dentre elas encontram-se as integrinas, o morfógeno Sonic hedgehog (Shh) e a proteína morfogenética óssea tipo 2 (BMP2). As primeiras estão envolvidas na proliferação dos precursores dos neurônios granulares na EGL (Blaess *et al*, 2004 e Mills *et al*, 2006) e também na diferenciação das fibras da glia de Bergmann (Belvindrah *et al*, 2006). O Shh é sintetizado pelas células de Purkinje, e está diretamente

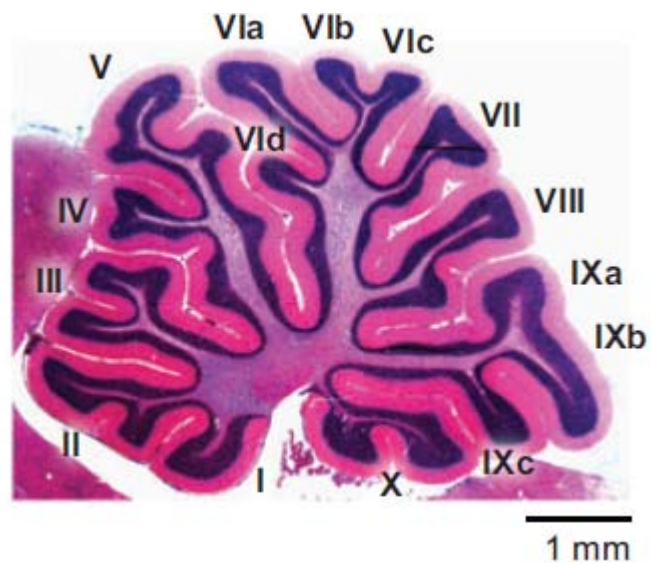
relacionado com a expansão dos precursores dos neurônios granulares na EGL (Lewis *et al*, 2004). Observou-se um sinergismo entre as vias de sinalização de Shh e do fator de crescimento epidermal (EGF), em ensaios de proliferação em neuroesferas. Na presença do EGF há a potencialização do efeito de Shh e quando se bloqueia a via de Shh há a diminuição da expressão de EGFR (Palma & Altaba, 2004). Já BMP2, expresso na IGL, é um conhecido antagonista de Shh, uma vez que suprime a ação proliferativa de Shh e induz a diferenciação dos precursores dos neurônios granulares (Rios *et al*, 2004).

Durante o desenvolvimento cerebelar ocorre um evento de grande importância, que irá formar a tridimensionalidade desta estrutura, conferindo a ela o aspecto enrugado que esta apresenta, este evento é a foliação. A foliação do cerebelo de roedores começa a ocorrer antes das células de Purkinje formarem uma monocamada. Este processo pode ser dividido em duas etapas principais: o primeiro é a formação dos cinco lóbulos cardinais ao longo do eixo antero-posterior no final do período embrionário e o segundo é a formação dos lóbulos e sublóbulos, que ocorre no período pós-natal. Os mecanismos genéticos envolvidos no processo de foliação não são bem conhecidos. Porém sabe-se que a foliação cerebelar tem início na formação os pontos de ancoragem, onde os axônios das células de Purkinje se ligam aos núcleos profundos, favorecendo assim a formação das primeiras fissuras. Em uma segunda etapa ocorre à rápida proliferação da camada granular externa, que irá moldar a formação dos lóbulos. Isto se deve à ação de fatores como Shh. Nos ratos, existem 10 lóbulos distintos e estes são designados por algarismos romanos de I-X e são novamente divididos em sub-lóbulos com número variável, de acordo com a espécie (Larsell, 1952) (**Figura 4**).





**Figura 3:** *Ontogênese cerebelar.* Esquema ilustrando cortes sagitais de cerebelos de roedores, em diferentes estágios do desenvolvimento. A camada granular externa dá origem a maior parte dos neurônios granulares. EGL: camada granular externa, embrionário de 13 (E13) e 16 (E16) dias e pós natos de 6 dias (P6): respectivamente; VZ: zona ventricular; PC: camada das células de Purkinje; IZ: zona intermediária; WM: substância branca; IGL: camada granular interna; e ML: camada molecular. Adaptado de Hatten, 1999.



**Figura 4:** *Lóbulos cerebelares de um rato adulto.* Corte transversal cerebelar mostrando a nomenclatura dos diferentes lóbulos cerebelares de um rato adulto, que vão de 1 a 10 em algarismo romano. Adaptado de Sudarov & Joyner, 2007

### 1.2.1 – Migração neuronal

Para que ocorra a migração neuronal é necessário que existam pontos de ancoragem, onde as células possam gerar tração sobre o substrato e conseqüentemente consigam puxar o seu próprio corpo para frente. Estes pontos de ancoragem são proporcionados por moléculas de adesão celular. Estas, em geral, são moléculas trans-membrana que na porção extracelular se ligam ao substrato (podendo este ser outra célula ou moléculas de matriz extracelular) e na porção intracelular se ligam ao citoesqueleto (Alberts *et al*, 2006). Alguns exemplos de moléculas de adesão celular são astrotactina, axonina-I, NCAM e N-caderina. A astrotactina é uma proteína de adesão expressa por neurônios granulares, quando migram sobre as fibras gliais, ainda não foi descoberto seu ligante na glia de Bergmann. Sabe-se que em um mutante nulo para esta molécula há uma redução de 10% no tamanho cerebelar além de haver uma menor ligação entre neurônio migratório e a glia de Bergmann e conseqüentemente uma migração mais lenta (Adams *et al*, 2002). A axonina-I é necessária para a formação das fibras paralelas, pois na ausência desta molécula há a formação irregular destas fibras (Baeriswyl & Stoeckli, 2008). Por fim NCAM e N-caderina são moléculas transmembrana que, além de serem moléculas adesivas, também exercem o papel de sinalizadores celulares associando-se a receptores de fatores de crescimento, como o FGFR, para promover o crescimento neurítico (Hansen *et al*, 2008).

Existem dois tipos de migração principais no cerebelo em desenvolvimento a tangencial e a radial. A primeira ocorre ainda durante o

período embrionário e consiste na migração dos precursores dos neurônios granulares do lábio rômboico formando da camada granular externa. Esta não necessita de células gliais para guiar sua migração (Alvarez *et al*, 1993, Hallonet *et al*, 1993, Rakic, 1971 e Komuro *et al*, 2001). A segunda ocorre no período pós-natal e consiste da migração dos precursores dos neurônios granulares da camada granular externa para a interna. Esta é dependente das fibras da glia de Bergmann para guiá-la a migração entre as camadas (Komuro & Rakic 1995 e Komuri *et al*, 2001).

### **1.2.2 – Glia de Bergmann**

Durante a as fases de migração neuronal radial no cerebelo a glia de Bergmann é de extrema importância. Ela possui seu corpo celular junto às células de Purkinje, e emite seus prolongamentos em direção à pia mater. Durante o desenvolvimento cerebelar, a glia de Bergmann guia a migração celular, assim como a glia radial no córtex cerebral. Ambas as células compartilham morfologia e funções semelhantes, pois possuem morfologia radial e servem como arcabouço para a migração neuronal, guiando os neurônios para que cheguem as suas camadas de destino. A morfologia radial de ambos os tipos celulares é de extrema importância para guiar a migração e os neurônios podem interferir nela. Os neurônios Cajal-Retzius, no córtex cerebral, ajudam a regular a migração celular e a manter o fenótipo radicalizado da glia radial, além de não permitir a sua diferenciação antes do término da migração cerebral (Super *et al.*, 2000). A secreção de proteínas de matriz extracelular e relina pelas células Cajal-Retzius, se transplantadas para

o cerebelo adulto fazem com que a glia de Bergmann se “desdiferencie” e volte a expressar marcadores de glia radial, além de fazer com que estas estendam seus processos e até mesmo reverta a migração neuronal (Soriano *et al*, 1997).

Apesar da glia radial e de Bergmann serem muito parecidas, elas possuem algumas diferenças fundamentais, pois passado o período migratório, a glia radial do córtex cerebral desaparece, diferenciando-se em astrócitos (Merkle *et al*, 2004 e Malatesta *et al*, 2008). Porém, ao contrário da glia radial, a glia de Bergmann não desaparece no adulto.

Evidências recentes sugerem que a glia de Bergmann possa, também, dar origem a outros tipos celulares em um cerebelo maduro, pois expressa moléculas como Sox1 e 2, que estão envolvidas com a auto-renovação celular e manutenção de progenitores neurais indiferenciados (Sottile *et al*, 2006 e Alcock *et al*, 2007). Outra descoberta recente que corrobora a hipótese da glia de Bergmann como progenitora cerebelar é que, aparentemente, em um cerebelo de coelhos adultos ela é capaz de dar origem a sinantócitos (Ponti *et al*, 2008). Os sinantócitos ou células NG2+ são células gliais recentemente descritas que possuem a capacidade de proliferar. *In vitro* elas se diferenciam em astrócitos e oligodendrócitos, porém *in vivo* elas somente expressam marcadores de células comprometidas com a linhagem de oligodendrocítica, como O4 e Gal-C (Levine *et al*, 1993 e Diers-Fenger *et al*, 2001).

A glia de Bergmann, também é capaz de guiar e organizar os axônios das células estreladas que diretamente inervam as células de Purkinje, através da molécula de reconhecimento CHL1, que é expressa na porção apical das fibras gliais e também nos axônios das células estreladas (Ango *et al*, 2008). A glia de Bergmann pode ajudar nas sinapses neuronais através da retirada do

excesso do glutamato do meio extracelular, pois expressa transportadores, como GLAST. O glutamato é um neurotransmissor que, quando em excesso no meio extracelular pode provocar morte neuronal. Problemas na captação de glutamato, pode causar doenças como a ataxia espinocerebelar tipo 7 (Custer *et al*, 2006).

### **1.2.3 - Fatores extracelulares reguladores da migração neuronal**

Diversas moléculas formam um microambiente propício ao desenvolvimento cerebelar, dentre estas, encontram-se fatores solúveis e também fatores de contato. Dentre os fatores de contato cruciais ao desenvolvimento cerebelar encontra-se a molécula de adesão astrotactina. Foi mostrado que um mutante nulo para esta molécula apresenta redução no tamanho do cerebelo, déficit na interação neurônio-glia, redução da migração e desenvolvimento anormal das células de Purkinje (Adams *et al*, 2002). Sabe-se também que o contacto da glia com a astrotactina faz com que ela alongue seus prolongamentos, guiando assim a migração. Outros fatores de contato muito importantes para o desenvolvimento são,  $\beta$ 1-integrina, *Jagged 1* e a relina. A primeira é crítica para a proliferação dos precursores dos neurônios granulares e para a diferenciação da glia de Bergmann e por isso para a migração radial dos precursores dos neurônios granulares (Blaess *et al*, 2004, Belvindrah *et al*, 2006). Já *Jagged 1* é um conhecido ligante de Notch I, uma molécula que geralmente está associada à manutenção do fenótipo

indiferenciado da célula e à formação da glia radial. Em ausência de *Jagged 1*, há uma migração aberrante dos precursores dos neurônios granulares, além de uma diferenciação neural ectópica (Weller *et al*, 2006). A reelina é uma glicoproteína da matriz extracelular que durante o desenvolvimento ajuda na regulação da migração celular, pois pode atuar como molécula quimioatratora do arcabouço glial (Förster *et al*, 2002).

Dentre os fatores solúveis mediadores do processo de migração neuronal destacam-se, por exemplo, a neuregulina, responsável pela manutenção da morfologia radial e o fator de crescimento fibroblástico 9 (FGF9). Recentemente foi demonstrado que um mutante nulo para este fator apresentava sintomas como ataxia, fibras gliais interrompidas, assim como déficits na migração radial, além de apresentar células de Purkinje não diferenciadas (Lin *et al*, 2009).

A família TGF- $\beta$  é uma família de proteínas, que inclui vários fatores de crescimento que podem influenciar o desenvolvimento cerebelar, dentro dela temos o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), o TGF- $\beta$ 2 (fator de crescimento transformante beta2) e o TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento transformante beta1). O primeiro é de extrema importância para a especificação glial, e para a diferenciação neuronal na IGL. Recentemente, foi demonstrado que gradiente de concentração de BDNF é capaz de guiar a migração dos precursores dos neurônios granulares para a IGL através da polarização do gradiente. O BDNF ativa o seu receptor TrkB que promove a secreção de mais BDNF, aumentando assim o gradiente deste fator no meio, este gradiente induz a endocitose do TrkB causando a acumulação assimétrica do receptor na membrana, sendo a maior concentração de TrkB onde BDNF é

máximo (Qin *et al*, 2006; Rios *et al*, 2004 e Zhou *et al*, 2007). O segundo ajuda na proliferação dos precursores dos neurônios granulares, e na sobrevivência celular. Na presença de TGF- $\beta$ 2, os precursores dos neurônios granulares proliferam por mais tempo e formam uma segunda onda proliferativa, porém na ausência deste fator há uma diminuição da proliferação e um aumento na apoptose (Elvers *et al*, 2005). O TGF- $\beta$ 1 foi descrito como um dos fatores capazes de promover aumento na migração no córtex cerebral de ratos. Este fator modula a expressão de moléculas de adesão celular, mais especificamente, aumenta a expressão de NCAM de modo concentração dependente (Siegenthsler & Miller, 2004). Sua participação em eventos migratórios de outras regiões do SNC ainda é desconhecida.

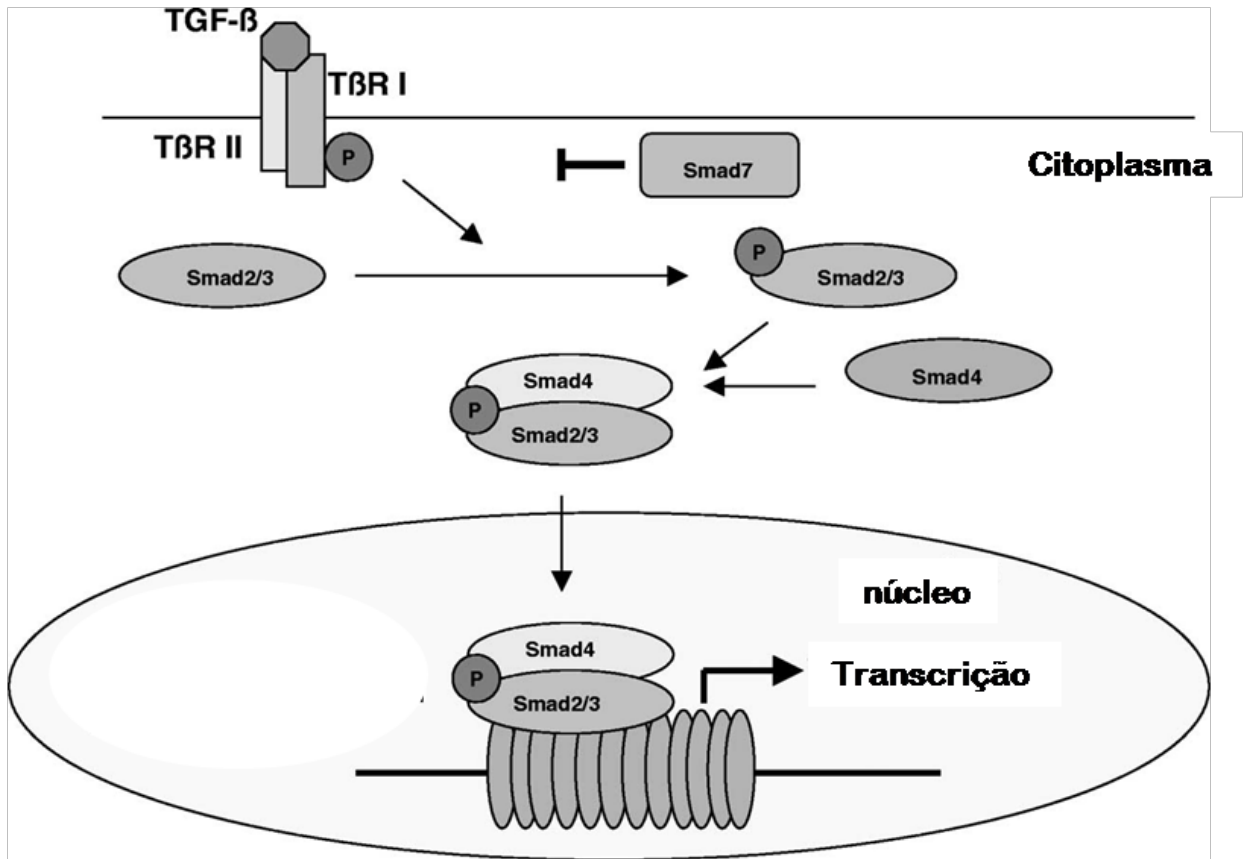
### **1.3 - Fator de crescimento transformante $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)**

O TGF- $\beta$ 1 é um fator de crescimento pertencente à família TGF- $\beta$ . Este fator de crescimento é comumente apontado como uma citocina relacionada a doenças neurodegenerativas e com a progressão tumoral. No primeiro caso, podemos exemplificar a doença de Alzheimer, onde ele é apontado como um dos indutores da neurotoxicidade presente na doença e, no segundo caso, TGF- $\beta$ 1 induz um aumento na vascularização de gliomas, permitindo assim a manutenção do tumor (Salins *et al*, 2008 e Breier *et al*, 2002).

A via de sinalização consiste nos receptores TGFRI e TGFRII, ambos do tipo serina treonina cinase. O TGF- $\beta$ 1, primeiramente, liga-se ao TGFRII que irá recrutar TGFRI; este se auto fosforila e dá início a uma cascata de fosforilação que envolve proteínas da família Smads. Esta família possui cerca

de oito membros, as Smads 2/3 são as primeiras a serem recrutadas e, após sua fosforilação, formam um complexo com Smad 4. O complexo Smad2/3-Smad4 é translocado para o núcleo onde se ligará ao promotor dos genes ativados por TGF- $\beta$ 1 promovendo sua transcrição (Gomes *et al*, 2005). As Smads 6/7 são inibidoras do processo de sinalização e as Smads 1/5/8 são ativadas pelos receptores de BMP, que também é um membro da família TGF- $\beta$  (**Figura 5**).





**Figura 5:** *Via de sinalização do TGF-β1.* O TGF-β1 se liga ao TβR II, este recruta TβR I, que se auto fosforila e fosforila Smad2/3; a via pode ainda ser regulada por Smads inibitórias, como a Smad7. As proteínas Smad2/3 formam um complexo com Smad 4 que, então, transloca para o núcleo onde se ligará ao promotor dos genes específicos, ativando a transcrição destes. Adaptado de Zhang & Laiho 2003.

As ações fisiológicas do TGF-β1 no SNC ainda são incertas. O TGF-β1 pode induzir o amadurecimento astrocitário da glia radial, que se dá através da indução da expressão de um filamento intermediário característico de células astrocíticas GFAP (proteína ácida fibrilar glial), isto pode se dar em resposta ao excesso de glutamato no meio, secretado por neurônios. Sabe-se que a responsividade glial a este fator de crescimento é modulado ao longo do desenvolvimento, apesar de não existir modulação do receptor ao longo do desenvolvimento (Stipursky & Gomes 2007; Romão *et al*, 2008 e Sousa *et al*,

2006). O TGF- $\beta$ 1 também pode ajudar na formação de sinapses. Foi mostrado recentemente, que este fator é secretado por células de Schwann, no sistema nervoso periférico, e as ajuda na formação de sinapses nas junções neuromusculares (Feng & Ko, 2008).

Os receptores do TGF- $\beta$ 1 estão presentes em diferentes regiões do SNC, tanto durante o desenvolvimento quanto no adulto. O RNAm para TGFRII está presente no cerebelo, cérebro, tronco encefálico, mesencéfalo e hipocampo. A glia radial, presente no córtex cerebral, também expressa este receptor assim como astrócitos e neurônios. Os receptores TGFRI e TGFRII são regulados temporal e espacialmente ao longo do desenvolvimento (Gomes *et al*, 2005)

No cerebelo, sabe-se que a deleção de uma das proteínas envolvidas na via de sinalização do TGF- $\beta$ 1, a Smad 4, causa danos irreversíveis como a diminuição no número de células de Purkinje (Zhou *et al*, 2003).

No córtex cerebral de rato Miller e colaboradores demonstraram que TGF- $\beta$ 1 induz a migração celular, através da modulação da expressão de proteínas de adesão celular, como NCAM e integrina  $\alpha_3$  e  $\beta_1$ . A expressão destas proteínas aumenta de modo progressivo, devido ao aumento da concentração de TGF- $\beta$ 1 no meio (Siegenthasler & Miller, 2004). Recentemente, têm crescido evidências do papel do TGF- $\beta$ 1 no desenvolvimento do SNC. Entretanto não se sabe qual é sua ação no cerebelo, principalmente no que diz respeito à migração celular.

## 1.4 - Fator de crescimento epidermal (EGF)

O fator de crescimento epidermal (EGF) pertencente à família EGF, e compartilha com esta a alta afinidade pelo receptor EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal). O EGF é sintetizado na forma de um precursor que possui 1217 resíduos de aminoácidos. Este pode atingir a forma madura do fator através de proteólise, já que o EGF em sua forma final é um polipeptídeo com 53 aminoácidos. O precursor do EGF é uma proteína glicosilada transmembrana com cerca de 140-150 kDa, e este compete com o próprio EGF pela ligação ao receptor EGFR. O precursor do EGF pode ter um importante papel na interação célula-célula. A ligação do precursor de EGF de uma célula e o EGFR da célula vizinha pode gerar efeitos biológicos localizados como crescimento celular, mudanças morfológicas e migração celular (Wong & Guillaud 2004).

O EGFR foi o primeiro receptor do tipo tirosina cinase a ser descrito, portanto ele também recebe o nome de ErbB1. Ele possui um domínio extracelular, que se liga ao fator, e um intracelular, responsável por inicializar cascatas de sinalização. Esta tem início com a ligação do EGF com o seu receptor, que se dimeriza e se autofosforila, no resíduo tirosina. A porção intracelular do EGFR possui sítio de ligação para diversos mensageiros secundários como a da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfoinositol 3 cinase (PI3K), proteína cinase A (PKA), entre outras (Wong & Guillaud 2004). Cada mensageiro secundário envolvido nesta via de

sinalização foi descrito em um modelo celular diferente e promovendo eventos celulares diferentes.

O EGF está envolvido em diversas atividades no SNC, inclusive em eventos do comportamento. Foi visto em *C.elegans*, que a expressão ectópica de um ligante parecido com o EGF em qualquer momento do desenvolvimento, causa a parada reversível da alimentação e locomoção do animal, e isto é por via neuronal (Van Buskirk & Sternberg 2007). Sabe-se também que a integridade e a organização do domínio citoplasmático do EGFR é importante para a sinalização da progressão de alguns tipos de tumores (Lajoie *et al*, 2007). Além do EGF ser capaz de induzir neuritogênese em neurônios cerebelares, quando ativa a via de MAPK e de PI3K (Martinez & Gomes, 2002).

O EGF, fator de crescimento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e o fator de crescimento epidermal ligador de heparina (HB-EGF) podem se ligar ao EGFR. Todos membros da família EGF. Quando se mede o nível de expressão do EGFR e seus ligantes, no SNC, se observa que a ligação de EGFR a HB-EGF é mais freqüente que a de TGF- $\alpha$ , que por sua vez é maior que a de EGF. O EGFR encontra-se distribuído por todo o SNC (Piao *et al*, 2005).

Na década passada, Seroogy e colaboradores (1995) identificaram altas concentrações, de RNAm para EGFR na EGL de animais recém-natos, principalmente na porção mais interna (constituída de neurônios pré-migratórios) dessa camada, havendo uma posterior diminuição na intensidade da marcação em neurônios da IGL (Seroogy *et al*, 1995). Recentemente, demonstrou-se que gradientes de concentração do fator de crescimento epidermal (EGF), são capazes de estimular e direcionar a migração celular de células HeLa (Sun *et al*, 2007). Além disso, EGFR é comprovadamente um

mediador de fatores quimiotáticos na migração durante o desenvolvimento do telencéfalo. Células precursoras que permanecem em um momento mais tardio do desenvolvimento expressam o receptor em grande quantidade, principalmente as que ainda migram (Caric *et al*, 2001 e Ciccolini *et al*, 2005). Juntos estes dados sugerem um envolvimento do EGF na migração celular. No entanto, a participação desta molécula, assim como de TGF- $\beta$ 1 na ontogênese cerebelar não foi previamente abordada.

## 1.5 – Justificativa do trabalho

O Cerebelo é um bom modelo para estudar interações celulares, pois ele é dividido histologicamente em camadas bem definidas, caracterizadas por poucos tipos celulares. Historicamente, este órgão está associado a atividades motoras, à promoção do equilíbrio e do ajuste fino do movimento. Recentemente, porém, o cerebelo vem sendo associado a funções cognitivas, desordens afetivas e sociais e o autismo (Tavano *et al*, 2007). Desta forma, o interesse por se entender os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento e patologias ganhou destaque recentemente.

Evidências da literatura sugerem o envolvimento de TGF- $\beta$ 1 e EGF durante o desenvolvimento cerebelar, principalmente na migração neuronal. O primeiro por estar envolvido em processo semelhante no telencéfalo; o segundo devido à alta expressão do seu receptor em precursores pré-migratórios e à diminuição da expressão deste no período pós-migratório. Portanto neste trabalho, será investigado o papel de ambos os fatores de crescimento no desenvolvimento cerebelar com ênfase na migração radial.

## **2 - Objetivos**

### **2.1 - Geral:**

2.1.1 - Analisar os efeitos dos fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 1 e EGF, na migração de neurônios granulares cerebelares, *in vitro* e *in vivo*.

### **2.2 - Específicos:**

2.2.1 - Analisar o efeito de TGF- $\beta$ 1 e EGF sobre a migração cerebelar *in vitro*;

2.2.2 - Analisar o efeito de TGF- $\beta$ 1 e EGF sobre a morfologia da glia de Bergmann *in vitro*;

2.2.3 - Caracterizar a distribuição dos receptores TGFRII e EGFR na glia de Bergmann *in vitro*;

2.2.4 - Caracterizar a via de sinalização pela qual esses fatores influenciam a migração cerebelar e a morfologia da glia de Bergmann.

2.2.5 – Estudar o efeito de EGF na migração cerebelar *in vivo*.

## **3 - Materiais e métodos**

### **3.1 – Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, mantidos no Centro de Ciências da Saúde, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ- Rio de Janeiro, Brasil. Foram utilizados ratos de 5 a 7 dias após o nascimento (P5-P7, sendo P0 o primeiro dia pós-nato) e embrionários com 18 dias de gestação (E18, sendo E0 atribuído ao primeiro dia gestacional). A manipulação dos animais e todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UFRJ (protocolo DHICB006, em anexo).

### **3.2 - Cultura de explante**

Os cerebelos de ratos, E18 e P5-P7, foram isolados e as meninges retiradas de forma delicada, e então, o tecido foi fragmentado na superfície dos hemisférios em pedaços de cerca de 1 mm e plaqueado (um explante por poço), em uma placa de 96 poços, previamente tratada com polilisina (Sigma, 40 µg/mL) e laminina (Invitrogen Life Technologies, 40 µg/mL). O plaqueamento foi feito em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen Life Technologies), suplementado com o nutriente F-12 (DMEM/F12; Invitrogen Life Technologies), e com 10% de soro fetal bovino (MCS) por 30 a 40 minutos. Após este período, o meio foi substituído por meio Neurobasal (Invitrogen Life Technologies), suplementado com 2% de B-27 (Invitrogen Life Technologies). A cultura recebeu tratamento com o TGF-β1 (R&D systems), na

concentração de 2,5, 10 ou 40 ng/mL ou com o EGF (Invitrogen Life Technologies), na concentração de 10 ng/mL (na situação controle não houve acréscimo destes fatores). Os explantes foram mantidos em cultura por aproximadamente 48 horas, em estufa à 37° C com 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.3 - Quantificação da migração *in vitro***

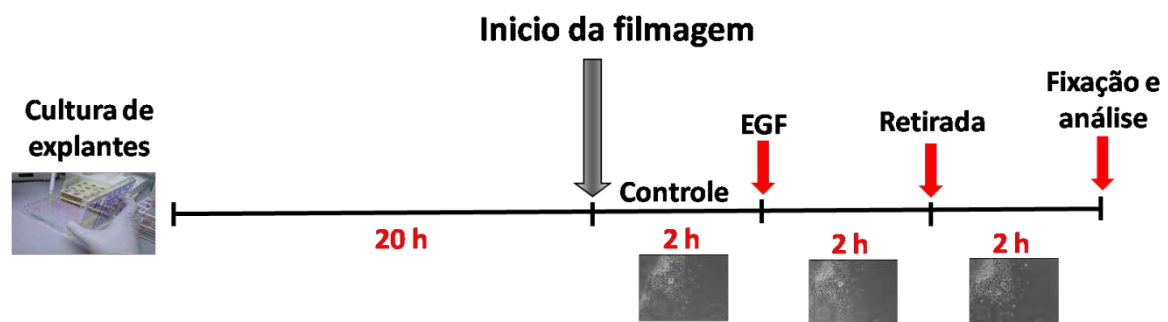
Para análise da migração celular, os explantes foram fotografados após diferentes tempos de plaqueamento (6, 12, 24 e 48 horas), ou apenas em 48 horas, no caso das diferentes concentrações de TGF-β1. As imagens foram obtidas através do microscópio óptico invertido Nikon TE2000. Foram realizados cinco fotos por explante e foram consideradas as cinco células com o maior raio de migração a partir da borda do explante, por foto. Cada experimento foi realizado no mínimo três vezes e em triplicata. Para a análise da distância de migração foi utilizado o programa ImageJ.

### **3.4 - Videomicroscopia**

Após 20 horas de plaqueamento, culturas de explantes foram filmadas em três etapas seguidas com duas horas de duração cada: 1) as duas primeiras horas foram utilizadas como controle do experimento; 2) nas duas horas seguintes, a cultura foi mantida com o acréscimo de 10ng/mL de EGF; 3) nas duas horas finais, trocou-se o meio para retirar-se o fator (**Figura 6**). A videomicroscopia foi realizada com o microscópio Nikon com fotografias seriadas a cada 30 segundos (no laboratório de pinça óptica, Rio de Janeiro,



UFRJ em colaboração com o professor Natan Lessa). Durante todo o experimento, as células foram mantidas em uma câmara à 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Ao final da videomicroscopia, as células foram fixadas por 20 minutos em paraformaldeído 4% (Reagen – Quimibrás Indústrias Químicas S.A) sacarose 4% (Nuclear – Casa da Química Ind. e Com. Ltda).



**Figura 6:** Esquema ilustrativo da videomicroscopia. Após 20 horas de cultura, deu-se início à filmagem, as 2 primeiras horas foram utilizadas como controle, quando, então, foram acrescentadas 10 ng/mL de EGF; filmou-se por mais 2 horas, quando o meio foi retirado para eliminação do fator e após ser trocado por outro meio, seguiram-se mais 2 horas de filmagem.

### 3.5 - Quantificação da Videomicroscopia

Para se calcular a distância percorrida pelas células, ao longo de cada situação, utilizou-se o programa imageJ. Foi filmado o mesmo campo ao longo de todo o experimento e foram acompanhadas e medidas sempre as mesmas 10 células ao longo de todas as três etapas do experimento. A velocidade foi calculada através da divisão da distância percorrida pelo tempo, considerando-se a unidade final em  $\mu\text{m}/\text{min}$ . O experimento foi realizado três vezes.

### 3.6 - Cultura mista de células cerebelares

Para a cultura mista de neurônios e células gliais foram utilizados ratos de 5 a 7 dias pós-natos (P5-P7). Os ratos tiveram suas cabeças decapitadas, os cerebelos isolados e a meninge retirada, em presença de PBS-Glicose (Tampão salina fosfato: 8% de NaCl; 5,36% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,9% de KCl com glicose a 0,6%). Após estes procedimentos, os cerebelos foram picotados, em pedaços de aproximadamente 5mm, e mantidos em presença de tampão A (constituído de BSA 0,003g/mL; glicose 0,014M; MgSO<sub>4</sub> 0,075M e tripsina 0,25mg/mL), por 15 minutos à 37°C. Acrescentou-se soro fetal bovino para inibição da atividade de tripsina e a cultura foi centrifugada por 30 segundos a 1500 rpm. O tecido foi ressuspensão em tampão C (constituído de soro albumina bovina -BSA- Sigma 0,003g/mL; glicose 0,014M; MgSO<sub>4</sub> 0,081M), dissociado mecanicamente com pipetas Pasteur, quando então foi adicionado tampão D (constituído de BSA 0,043g/mL; glicose 0,014M; MgSO<sub>4</sub> 0,075M) lentamente ao fundo do recipiente, o que determinou a formação de duas fases. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 850 a 1000 rpm (centrífuga eppendorff 5402), e o precipitado foi ressuspensão em meio de cultura neurobasal (Invitrogen Life Technologies) acrescido de 2% de B-27. Após a contagem, foram plaqueadas 1000 células por mm<sup>2</sup> nas placas de cultura tratadas previamente com poliornitina (Sigma 1,5µg/mL). A duração total da cultura foi de 72 horas, e os fatores (TGF-β1 e EGF, ambos na concentração de 10 ng/mL) foram adicionados após 24 horas do plaqueamento.

### 3.7 - Cultura de glia de Bergmann

A cultura foi feita de acordo com Custer *et al*, 2006. Para o preparo da cultura de glia de Bergmann, foram utilizados ratos de 5 a 7 dias após o nascimento (P5-P7). Os ratos foram sacrificados, e tiveram os seus cerebelos isolados, a meninge retirada e o tecido picotado em presença de PBS-glicose. Após estes procedimentos, o material foi decantado, e ao sobrenadante, acrescentou-se 1mL de tripsina 0,25% por 5 minutos à 37°C. Decorrido este tempo, foi adicionado meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen Life Technologies), suplementado com o nutriente F-12 (DMEM/F12; Invitrogen Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Seguiu-se então à dissociação com pipeta Pasteur e agulha gauge 21, o que elimina grande parte dos neurônios cerebelares. O material foi decantado por 10 minutos e o sobrenadante centrifugado por 10 minutos à 3000 rpm. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em volume conhecido e o número de células determinado por contagem em câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 1000000 células por mm<sup>2</sup> nas placas de cultura (TPP, Techno plastic products), previamente tratadas com poliornitina (1,5µg/mL). A duração da cultura foi de 5 dias em incubadora à 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. Nos três primeiros dias, o meio foi trocado diariamente por meio DMEM/F12 com o acréscimo de 10% de soro fetal bovino, após este período a cultura foi mantida por mais 48 horas em meio DMEM/F12 sem soro e com o acréscimo do EGF na concentração de 10 ng/mL. As células foram mantidas na estufa à 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.8 - Imunocitoquímica

As células foram fixadas por 20 minutos em paraformaldeído-sacarose 4%. Após o que foram lavadas e permeabilizadas com PBS - triton 0.2% (Triton X-100 2% Vetec Química Fina LTDA) por 5 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% (BSA: soro albumina bovina) por 1 hora. As células foram incubadas por 12 horas à 4°C com o anticorpo primário e por 2 horas, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário. Os núcleos foram marcados com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole; Sigma 1µg/mL) e as lâminas foram montadas em N-propil galato (Sigma 0.05g/mL). Foram utilizados os anticorpos descritos na **Tabela 1**. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: Anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 ou 546 (Molecular Probes).

| <b>Antígeno</b>     | <b>Animal</b> | <b>Firma</b> | <b>Técnica</b>   |
|---------------------|---------------|--------------|------------------|
| GFAP                | coelho        | Dako         | Imunocitoquímica |
| GFAP                | camundongo    | Chemicon     | Imunocitoquímica |
| $\beta$ -tubulinIII | camundongo    | Promega      | Imunocitoquímica |
| BLBP                | coelho        | Chemicon     | Imunocitoquímica |
| Vimentina           | camundongo    | Chemicon     | Imunocitoquímica |
| TGFR II             | coelho        | Santa Cruz   | Imunocitoquímica |
| EGFR                | coelho        | Santa Cruz   | Imunocitoquímica |
| BrdU                | rato          | Accurate     | Imunocitoquímica |

**Tabela 1:** Lista dos anticorpos primários

### **3.9 - Análise morfológica da glia de Bergmann**

Após imunomarcção para GFAP, das culturas de glia de Bergmann e mistas, foram feitas análises morfológicas onde os prolongamentos da glia de Bergmann foram medidos de uma extremidade a outra da célula passando pelo núcleo, através do programa Image J. Foram analisadas, no mínimo, vinte células por experimento e estes repetidos pelo menos 3 vezes.

### **3.10 - Ensaios de inibição de vias de sinalização**

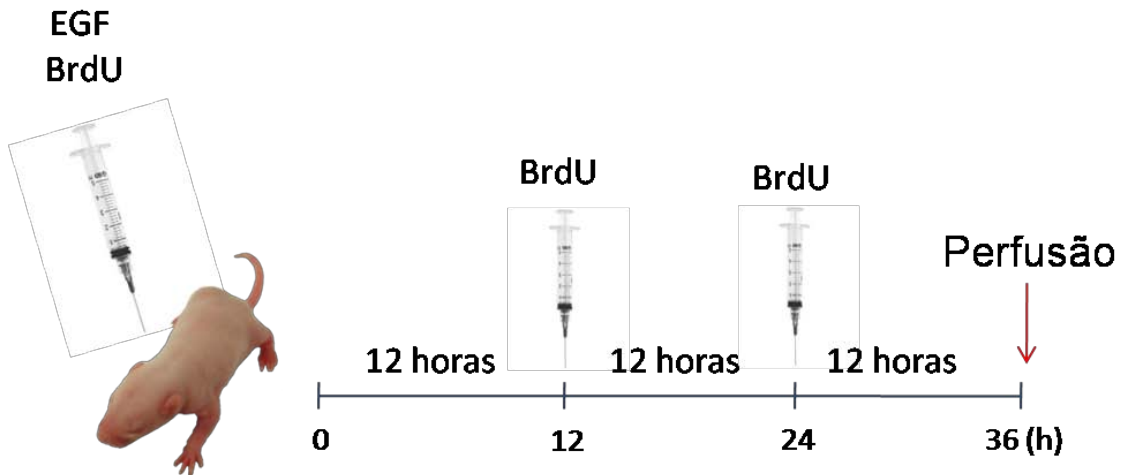
Para os ensaios de inibição de vias de sinalização em culturas mistas, os inibidores foram adicionados ao meio de cultivo, após a confluência celular ter sido atingida, e o tratamento foi mantido por três dias. Para os ensaios de

migração, os inibidores foram adicionados aos explantes após 2 horas de cultura. Os seguintes inibidores foram usados: PD98059 e U0126, inibidores da via de MAPK (50 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente); LY294002, inibidor de PI3K (5 $\mu$ M); KT5720, inibidor de PKA (400nM); Staurosporina, inibidor de PKC (1nM). Todos os inibidores foram comprados de Calbiochem e dissolvidos em metil-sulfóxido (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>OS, Sigma).

### 3.11 - Ensaios de injeção de fatores *in vivo*

Para ensaios de injeção de fatores de crescimento *in vivo*, animais de sete dias pós-natais receberam uma injeção de EGF (100 ng/mL) ou salina na cisterna magna e simultaneamente injeções intraperitoneais do análogo de timidina 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdU; Sigma, 50mg/Kg, dissolvido em NaOH a 0,007%), e depois a cada 12 horas até o momento da perfusão (**Figura 7**). O BrdU foi utilizado para que se pudesse rastrear as células que proliferaram e migraram após a injeção do fator. Após 36 horas da primeira injeção, os animais foram anestesiados e perfundidos com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M em pH 7,4. Seus cerebelos foram então removidos, crioprotégidos por imersão em gradiente de sacarose 10, 20 e 30% em tampão fosfato e então processados em criostato em secções de 10 $\mu$ m, que foram coletadas em lâminas revestidas por poli-L-lisina (Sigma), para posterior marcação por imunistoquímica e/ou coloração por cresilvioleta.

## Injeções de EGF



**Figura 7:** *Esquema ilustrativo do processo de injeção.* Foram injetadas 100 ng/mL de EGF na cisterna magna de ratos P7 e 100mg/Kg de BrdU a cada 12 horas até a perfusão.

### 3.12 - Perfusão e preparação do tecido

Foi realizada a perfusão por via intracardíaca com o objetivo de promover a fixação eficiente do encéfalo. Inicialmente, foi injetada a solução salina 0,9% para remover todo o sangue circulante. Quando esta etapa foi concluída, iniciou-se a injeção da solução fixadora contendo paraformaldeído a 4% até se notar o enrijecimento do animal. Após a perfusão, o encéfalo foi retirado da caixa craniana e o cerebelo foi dissecado e submetido a um gradiente crescente de sacarose (10%, 20% e 30%) para crioproteção. Para o emblocamento, o cerebelo foi dividido em duas metades através de uma secção mediana, passando pelo vérmis, e esta face foi utilizada como apoio para o bloco. O cerebelo foi, então, emblocado no meio de inclusão O.C.T. (Tissue-Tek) e congelado em nitrogênio líquido. No criostato, à temperatura de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram feitos cortes parassagitais com  $12\mu\text{m}$  de

espessura que foram colhidos em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. Foram desprezados os cortes da região mais lateral dos hemisférios e as análises foram feitas preferencialmente em região medial próximo ao vérmis, na qual é possível a visualização de todos os lóbulos. Após estes procedimentos, os cortes foram então submetidos à técnica imunoistológica para o marcador de interesse.

### **3.13 – Análise da migração neuronal *in vivo***

#### **3.13.1 – Preparação histológica**

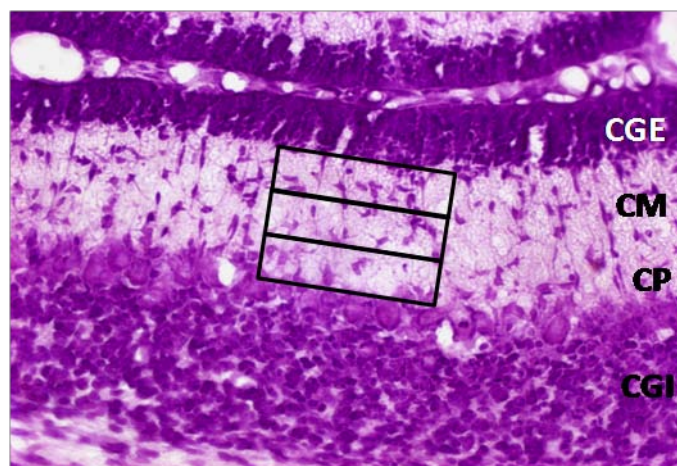
Para análise histológica do cerebelo, foi utilizada a técnica de Nissl (coloração por cresil-violeta). As secções do tecido cerebelar foram montadas em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (200µg/ml - Sigma) e, após o tempo mínimo de 24 horas, foram submetidas à coloração seguindo o seguinte protocolo: as secções foram lavadas com água destilada para retirar o O.C.T. (5 minutos); desidratadas em álcool 75%, álcool 95% e álcool 100% (3 minutos cada); desengorduradas em álcool 100% + clorofórmio (1:1) (10 minutos); reidratadas em álcool 100%, álcool 95% e álcool 75% (3 minutos cada), lavadas em água destilada (3 minutos) e coradas na solução de cresil-violeta à 37°C (por, no mínimo, 1 minuto). Após nova lavagem com água destilada, seguiram-se outra desidratação e diferenciação com álcool 75% + 10 gotas de ácido acético (observando-se a coloração); álcool 95% + 10 gotas de ácido acético (observando-se a coloração); álcool 95% e álcool 100% (3 minutos cada); álcool 100% + butanol (1:1) (3 minutos observando-se a



coloração) e, por fim, as lâminas foram mergulhadas em xilol até a montagem. As lâminas foram, então, seladas com Entellan (Merck) e cobertas com lamínula. Foram feitas fotomicrografias, do lóbulo IX, utilizando-se o microscópio óptico invertido Nikon TE2000.

### 3.13.2 - Quantificação da migração neuronal *in vivo* – cresil violeta

A análise da migração em tecidos corados com cresil violeta foi feita dividindo-se a camada molecular em três partes iguais de 80 por 21  $\mu\text{m}$  considerando-se como células migratórias aquelas com morfologia fusiforme e aquelas com morfologia arredondada foram chamadas de células estacionárias da camada molecular.



**Figura 8:** Esquema ilustrativo mostrando a divisão da camada molecular. A camada molecular, de ratos injetadas com 100 ng/mL de EGF ou com solução salina, foi dividida em três partes iguais medindo 80 por 21  $\mu\text{m}$  para a quantificação. CGE – Camada granular externa; CM – Camada molecular; CP – Camada de Purkinje; CGI – Camada granular interna.

### 3.13.3 – Imunoistoquímica

Cortes histológicos de cerebelo de ratos com 7 dias pós-natais foram lavados duas vezes com água destilada e depois incubados duas vezes com HCl 2N à 50°C por 15 minutos. Posteriormente, as preparações foram lavadas duas vezes com tampão borato a 0,1M por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados três vezes com PBS por 5 minutos cada. Posteriormente, os cortes foram permeabilizados com PBS/triton x-100 0.3% por 5 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% (BSA: soro albumina bovina) por 1 hora. As células foram incubadas por 12 horas à 4°C com o anticorpo anti-BrdU conforme **Tabela 1**. Após a reação com o anticorpo primário, os tecidos foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti IgG de rato conjugado à Alexa Fluor 546 (Molecular Probes). Os núcleos foram marcados com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole; Sigma) na concentração de 1 µg/mL por 30 minutos e as lamínulas montadas em N-propil galato (Sigma) na concentração de 0.05g/mL.

### 3.13.4 - Quantificação da migração neuronal *in vivo*-BrdU

Nos cortes histológicos, as células migratórias foram quantificadas como sendo as células marcadas positivamente para BrdU nas camadas do córtex cerebelar localizadas internamente à EGL. O número de células foi dividido pela área da camada molecular de cada foto e comparado entre as diferentes situações (tratado com EGF e controle) elegendo-se o lóbulo IX cerebelar para

a quantificação, tendo-se em vista as diferentes taxas de mitose entre esses lóbulos.

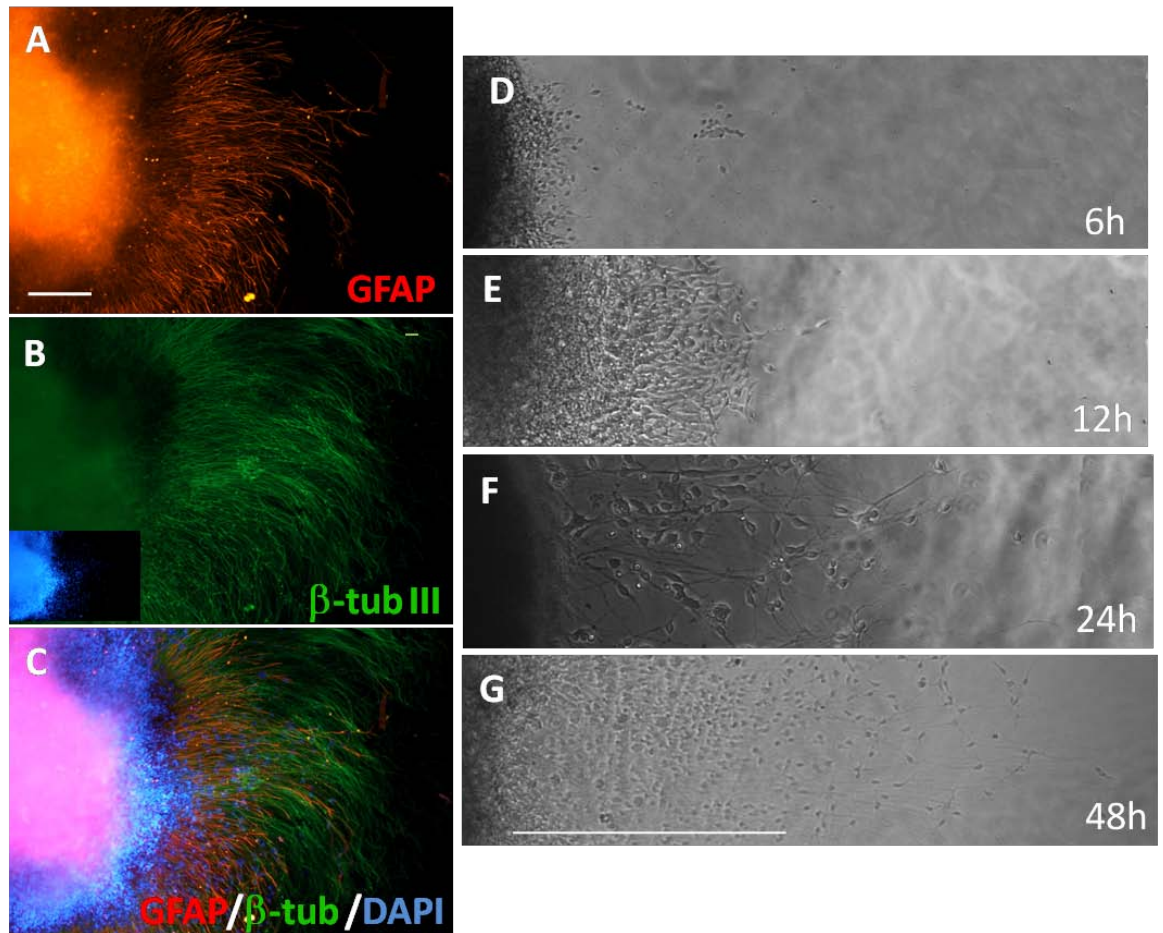
### **3.14 - Análise estatística**

No caso de três ou mais grupos de resultados, foi utilizado o teste estatístico Anova e o pós-teste de Tukey, para verificar se os resultados foram significativamente diferentes do controle. No caso de haver somente dois grupos de resultados foi utilizado o teste t, com o mesmo objetivo. Para todos os testes foi utilizado o intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ).

## 4 – Resultados

### 4.1 - Cultura de explantes

Com o objetivo de estudar o efeito de fatores tróficos na migração cerebelar, implementamos em nosso laboratório o modelo de cultura em explante descrito por Santiago e colaboradores (Santiago *et al*, 2001). Este modelo consiste na retirada e plaqueamento de explantes da superfície cerebelar. Após um período em cultura, as células migram para fora do explante. O processo migratório que ocorre neste modelo mimetiza, parcialmente, o processo de migração radial que ocorre *in vivo*, pois há a migração de células  $\beta$ -tubulina de classe III positivas (neurônios) sobre as fibras de células GFAP positivas (glia de Bergmann) (**Figura 8**). No entanto, a migração neste modelo pode ocorrer também independente de glia (Santiago *et al*, 2001).



**Figura 8:** *Caracterização da cultura de explante cerebelar.* A cultura foi realizada a partir de explantes cerebelares de ratos P7, cultivados por 48 horas em meio neurobasal suplementado com 2% de B-27. Notar o aumento progressivo de células migratórias (D-G) e a sobreposição das fibras GFAP positivas com as  $\beta$ -tubulina positivas (A-C). Barra de calibração: 100 $\mu$ m (A) e (G).

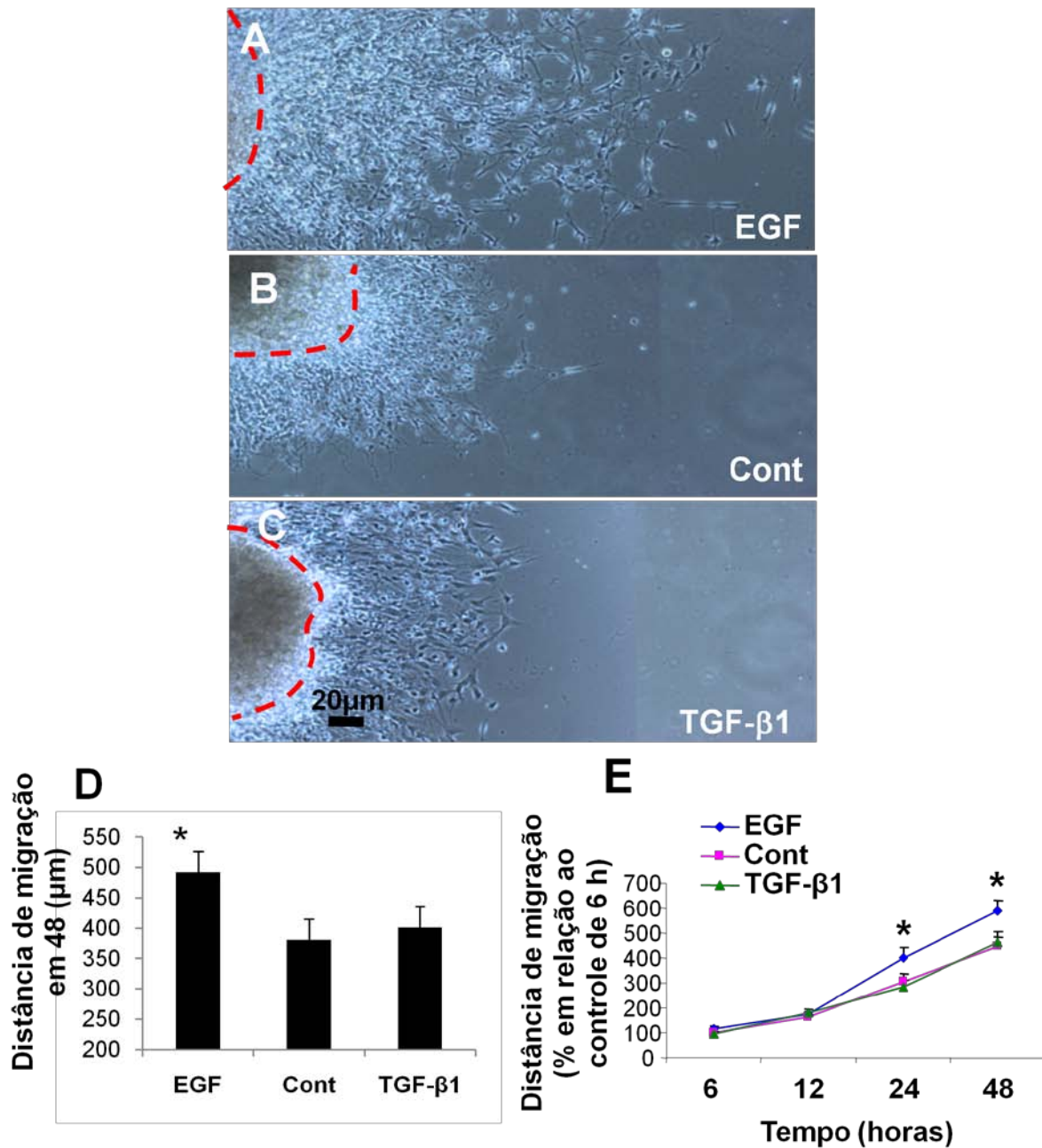
## 4.2 - Efeitos do TGF- $\beta$ 1 e do EGF na migração neuronal cerebelar

### 4.2.1 - Cinética da migração neuronal nos explantes cerebelares de ratos pós-natos

O EGF é uma molécula cujo receptor (EGFR) é altamente expresso por neurônios pré-migratórios da EGL. O término da migração está associado à diminuição da expressão deste receptor nesta camada (Seroogy *et al*, 1995), o que sugere fortemente um papel de EGF neste processo. Para analisar o papel deste fator durante a migração cerebelar, explantes de ratos P7 foram tratados com EGF por 48 horas. A distância de migração foi analisada após 6, 12, 24 e 48 horas de tratamento. Como se pode observar na **Figura 9**, o EGF induziu um aumento de cerca de 30% na distância migrada por neurônios da camada externa do cerebelo, em relação ao controle, após 24 horas de tratamento.

O TGF- $\beta$ 1 foi descrito, por Siegenthaler e Miller em 2004, como sendo capaz de induzir a migração neuronal no córtex cerebral, quando usado na concentração de 10 ng/mL. Utilizando o modelo acima descrito, verificamos se este fator possuiria o mesmo efeito na migração cerebelar *in vitro*. No entanto, não observamos alteração na distância de migração quando os explantes foram tratados com TGF- $\beta$ 1 (**Figura 9**). Com o intuito de verificar se os explantes tratados com TGF- $\beta$ 1 apresentariam algum tipo de alteração na migração nos primeiros momentos de tratamento, foram feitos experimentos de cinética migratória.

Para isso, os explantes foram fotografados em contraste de fase após 6, 12, 24 e 48 horas de plaqueamento. Em todas as condições, observou-se um aumento na migração com o passar do tempo. Porém, se compararmos a migração de neurônios submetidos ao TGF- $\beta$ 1 com o EGF, observa-se que o EGF foi capaz de promover o aumento na distância de migração após 24 horas de tratamento. No entanto, o TGF- $\beta$ 1 não foi capaz de promover alterações na distância de migração em nenhum dos períodos analisados, demonstrando que este fator realmente não possui efeito sobre a migração neuronal em explantes cerebelares (**Figura 9**).



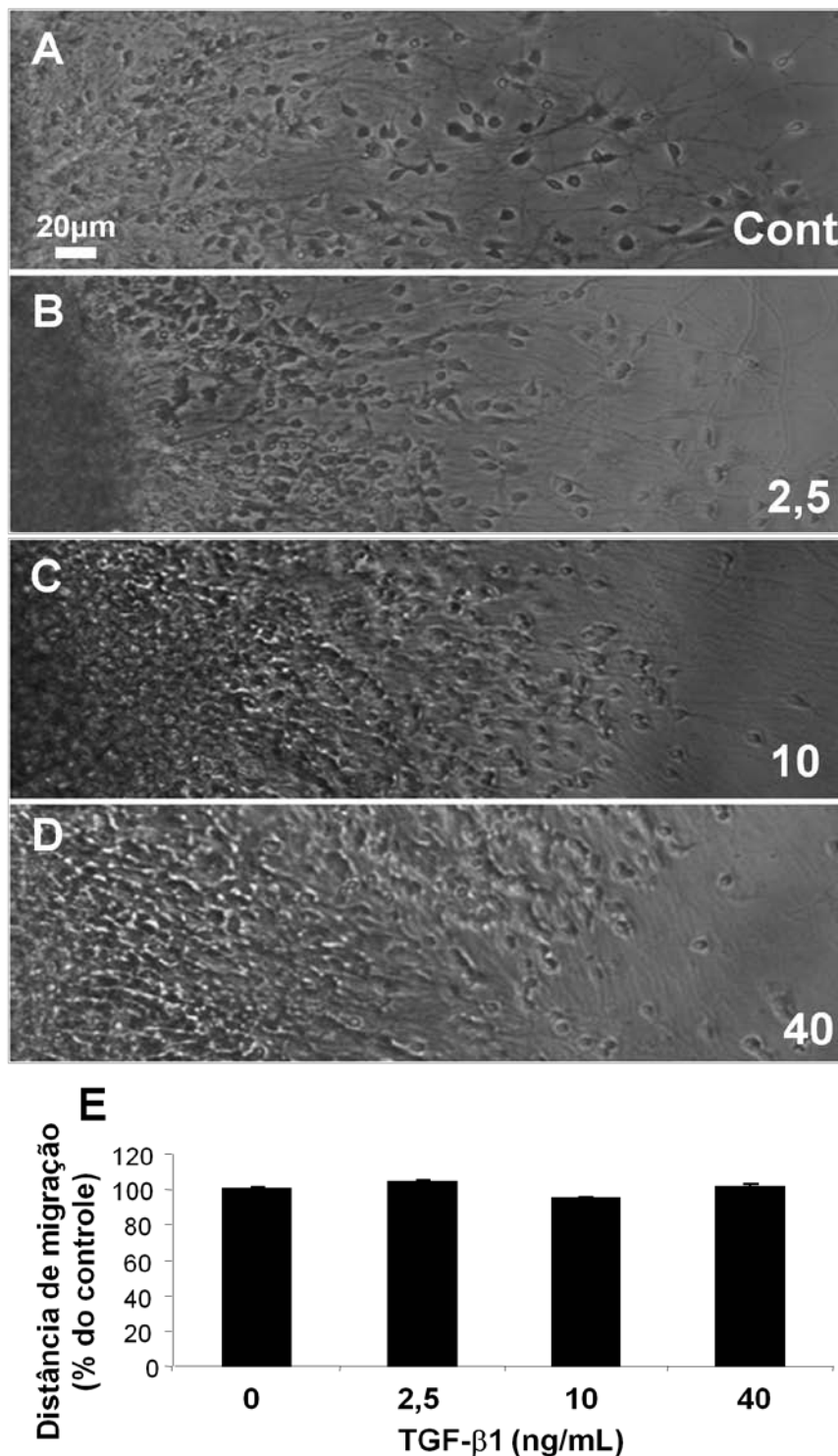
**Figura 9:** EGF promove aumento na migração neuronal de ratos pós-natos. Explantes cerebelares de ratos P7 foram cultivados por 48 horas em meio neurobasal suplementado com 2% de B-27 em presença de 10 ng/mL de TGF-β1 (C), ou 10 ng/mL de EGF (A). A quantificação da migração após 48h foi feita através do programa imageJ e é apresentada sob a forma de porcentagem em relação ao controle (D). A análise temporal da distância de migração foi quantificada em explantes cerebelares por cinética migratória após 6, 12, 24 e 48 horas de plaqueamento. Os resultados se apresentam sob a forma de porcentagem em relação ao controle de 6 horas após o plaqueamento (E). EGF promove aumento da migração a partir de 24 horas de plaqueamento. \* P<0,05. Barra de calibração, 20μm. Número de experimentos: 9.



## 4.2.2 – Titulação de TGF- $\beta$ 1

No córtex cerebral, Siegenthaler e Miller descreveram que o TGF- $\beta$ 1 afeta a migração neuronal de modo concentração dependente. Enquanto baixas concentrações, como 2,5 ng/mL de TGF- $\beta$ 1, não causam diferenças significativas, na concentração de 10 ng/mL este fator induz um aumento da migração cortical, e altas concentrações, como 40 ng/mL, inibem a migração. Desta forma, analisamos o efeito de diferentes concentrações de TGF- $\beta$ 1 na migração cerebelar.

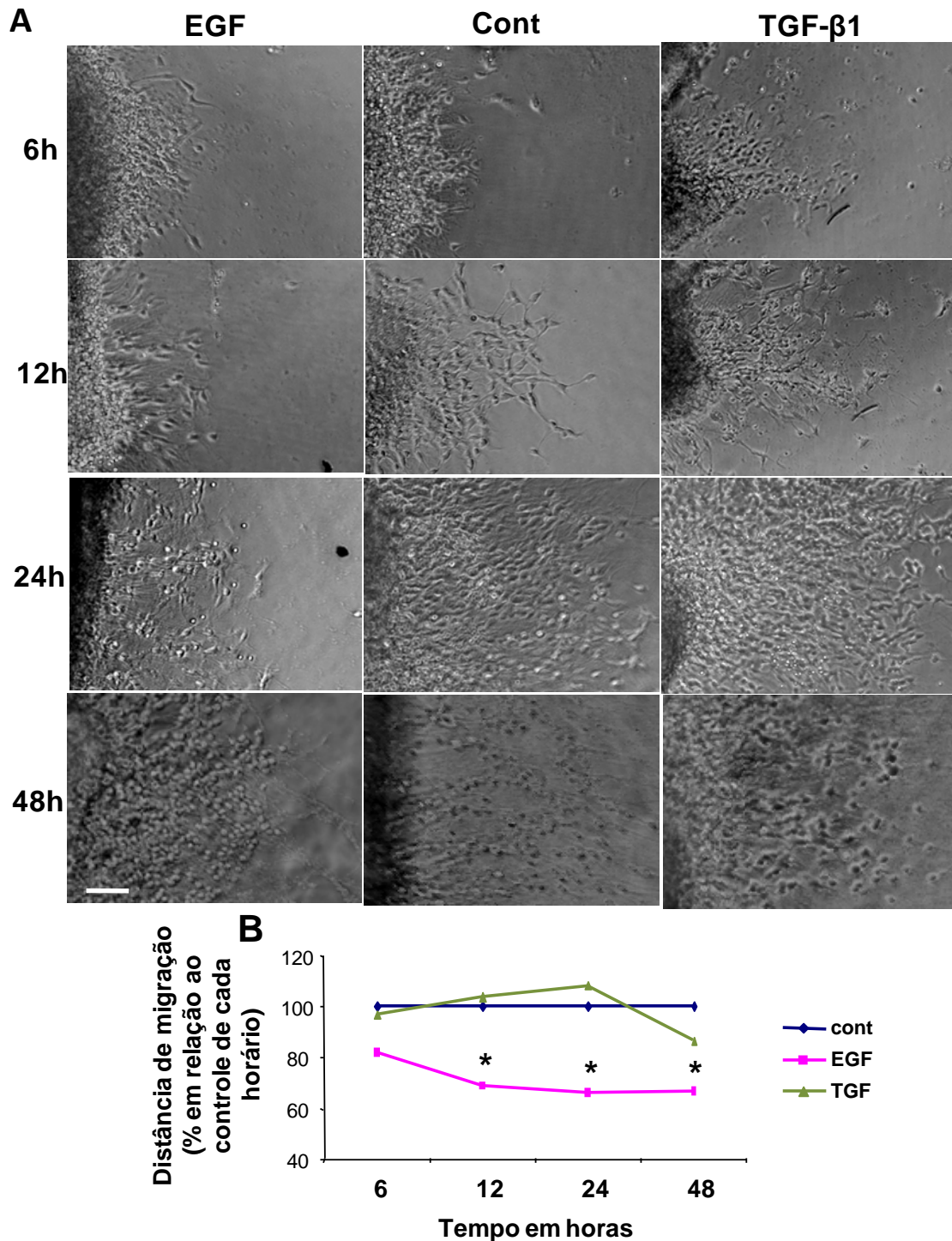
Como demonstra a **Figura 10**, TGF- $\beta$ 1 não promoveu qualquer tipo de alteração na migração cerebelar, mesmo se utilizado nas diferentes concentrações descritas para córtex cerebral. Isto sugere que este fator de crescimento realmente não exerça efeito na migração cerebelar, pelo menos, neste período do desenvolvimento.



**Figura 10:** *Gradiente de concentração de TGF-β1.* Explantes cerebelares de ratos P7 foram cultivados em meio neurobasal suplementado com 2% de B-27. Os explantes foram tratados com diferentes concentrações de TGF-β1– 0 ng/mL (A), 2,5 ng/mL (B), 10 ng/mL (C) e 40 ng/mL (D) - por 48 horas. Após este período, as culturas foram fotografadas em microscópio de contraste de fase e a distância de migração medida através do programa image J. O resultado é apresentado em E sob a forma de porcentagem em relação ao controle (0 ng/mL). TGF-β1 não altera a distância de migração, nas diferentes concentrações. Barra de calibração, 20 μm. Número de experimentos: 6.

### 4.3 - Cinética da migração neuronal nos explantes cerebelares de ratos embrionários

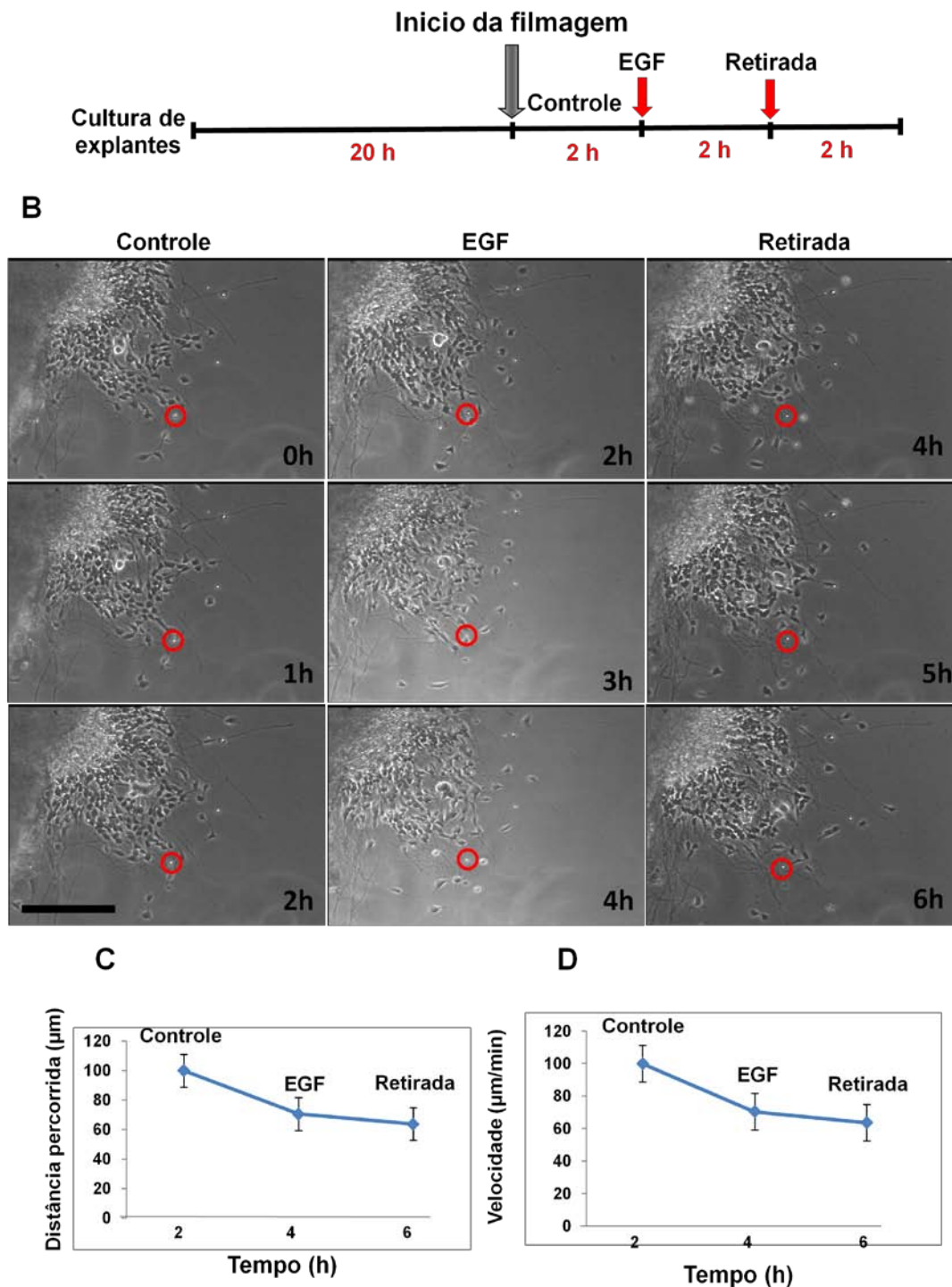
O cerebelo possui a maior parte de seu desenvolvimento no período pós-natal. Durante o final do período embrionário, a maior parte da estrutura não está formada, a EGL ainda está proliferando e praticamente não ocorre migração radial. O EGF conseguiu promover um aumento de 30% na migração neuronal de ratos P7. Analisou-se então se este fator seria capaz de promover um aumento da migração, mesmo em condições onde ela normalmente não ocorreria. Além disto, também se testou a capacidade do TGF- $\beta$ 1 em promover alterações na migração cerebelar em períodos mais precoces do desenvolvimento, pois Siegenthaler e Miller (2004) demonstraram que este fator é capaz de aumentar a migração neuronal no córtex cerebral de ratos embrionários. Explantes cerebelares de embriões de ratos com aproximadamente 16-17 dias de gestação foram tratados com TGF- $\beta$ 1 e com EGF. Os resultados deste experimento demonstraram que o TGF- $\beta$ 1 não induz a migração, mesmo em períodos mais precoces do desenvolvimento cerebelar. Surpreendentemente, o EGF provou ser um inibidor da migração neste período, como se pode observar na **Figura 11**.



**Figura 11:** Cinética migratória a partir de explantes de cerebelos de ratos embrionários. Explantes cerebelares de ratos embrionários com 18 dias de gestação foram cultivados em meio neurobasal suplementado com 2% de B-27. Tratou-se com os fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e EGF, ambos na concentração de 10 ng/mL. (A) Os explantes foram fotografados em microscopia de contraste de fase em quatro horários diferentes após o plaqueamento 6, 12, 24 e 48 horas. (B) A distância de migração foi medida através do programa image J. Os resultados se apresentam no gráfico sob a forma de porcentagem em relação ao controle de cada horário. EGF inibiu a migração a partir de 12h de tratamento TGF- $\beta$ 1 não teve efeito na migração. \* P<0,05. Barra de calibração, 50 $\mu$ m. Número de experimentos: 3.

#### 4.4 - Videomicroscopia de explantes tratados com EGF

Com o objetivo de analisar se o EGF é capaz de modular a mobilidade neuronal, realizou-se uma videomicroscopia de culturas de explantes após aproximadamente 20 horas do plaqueamento. Esta videomicroscopia foi feita sempre sobre um mesmo campo. O experimento dividiu-se em três etapas, cada uma com a duração de duas horas. A primeira etapa foi utilizada como controle do experimento. Na segunda, tratou-se o explante com 10 ng/mL de EGF. Na terceira etapa, o meio foi trocado por um na ausência do fator. Foram medidas a velocidade e a distância de migração nas três situações. Como se pode observar na **Figura 12**, ambos os parâmetros analisados permanecem semelhantes, nas diferentes situações.

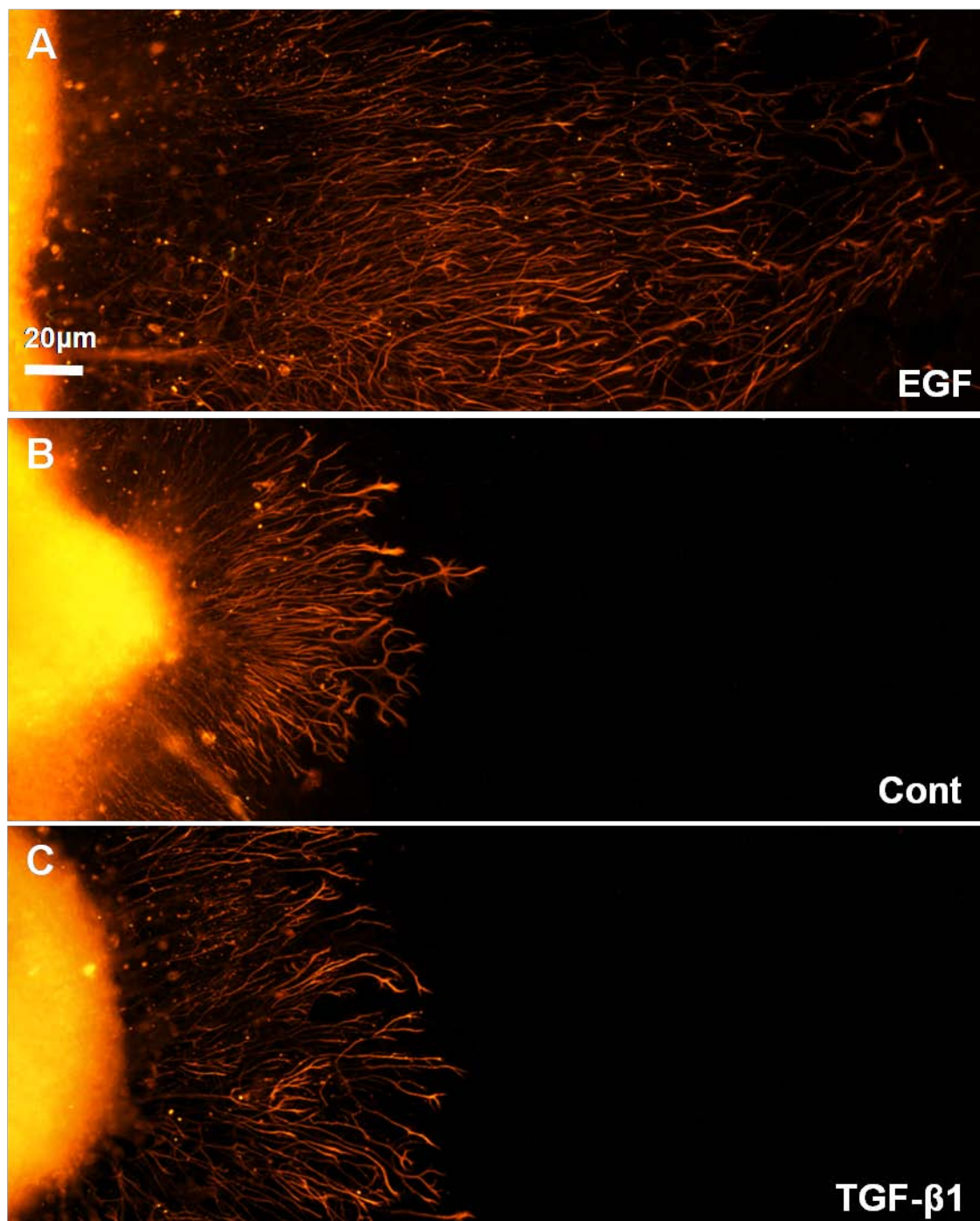


**Figura 12:** Videomicroscopia de explantes cerebelares. Explantes cerebelares de ratos P7 cultivados por 20 horas, quando então se deu início a captura de imagens, com 30 segundos de intervalo entre a captura de cada imagem, num total de 6 horas de duração. As duas primeiras horas de videomicroscopia foram utilizadas como controle do experimento. Depois deste período, a cultura foi tratada com EGF na concentração de 10 ng/mL por duas horas, quando então o meio foi trocado, retirando-se assim o fator, e filmado por mais duas horas (A). A quantificação da migração dos explantes foi feita acompanhando-se 10 células durante as 6 horas (B) de filmagem e medindo-se a distância (C), e a velocidade de migração (D). EGF não promoveu alteração nos padrões migratórios com apenas 2 horas de tratamento. Barra de calibração, 100 µm. Número de experimentos: 3.

## 4.5 - Efeito de EGF e TGF- $\beta$ 1 no alongamento da glia de Bergmann

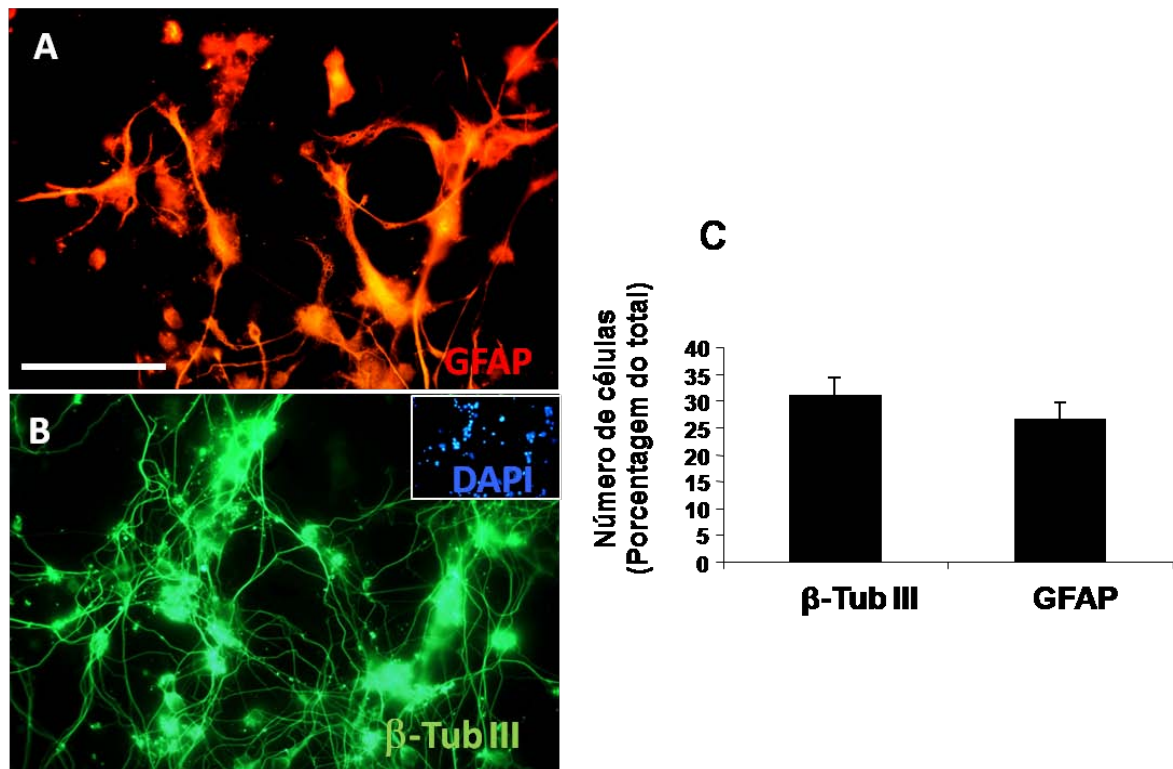
A morfologia da glia de Bergmann é de extrema importância, *in vivo*, já que a morfologia radial de seus processos é que irá guiar a migração neuronal. Os precursores neuronais da EGL utilizam-se da glia de Bergmann como guias da sua migração para a IGL. Alterações na morfologia podem provocar sérios atrasos no desenvolvimento cerebelar, além de algumas anomalias na citoarquitetura cerebelar (Belvindrah *et al.*, 2006).

Nos resultados anteriores, mostrou-se um aumento da distância de migração nos explantes tratados com EGF. Desta forma, nos perguntamos se o EGF poderia agir na migração, indiretamente através da modificação da morfologia radial da glia de Bergmann. Como podemos observar na **Figura 13**, a imunocitoquímica para GFAP revelou que essas células se mostravam mais alongadas em resposta ao EGF, porém não é possível medir o tamanho das fibras devido ao grande número de células presentes no local. Em contrapartida o TGF- $\beta$ 1, como mostrado anteriormente, não promoveu modificação na migração neuronal e, aparentemente, também não foi capaz de interferir na morfologia glial. Para melhor analisar a morfologia glial em presença dos fatores de crescimento passou-se a utilizar uma cultura mista, de neurônios granulares e glia de Bergmann. Este tipo de cultura foi utilizado na maioria dos experimentos e apresenta cerca de 30% de células  $\beta$  tubulina III positivas e cerca de 30% de células GFAP positivas (**Figura 14**).



**Figura 13:** *Alongamento das células gliais em explante.* Explantes cerebelares de ratos P7. Foram cultivados em meio neurobasal suplementado com 2% de B-27 e tratados com os fatores de crescimento EGF (A) e TGF-β1 (B) ambos na concentração de 10ng/mL, por 48 horas, fixados e analisados por imunocitoquímica para o marcador glial, GFAP. As culturas tratadas com EGF apresentam prolongamentos gliais mais alongados. Barra de calibração, 20µm.

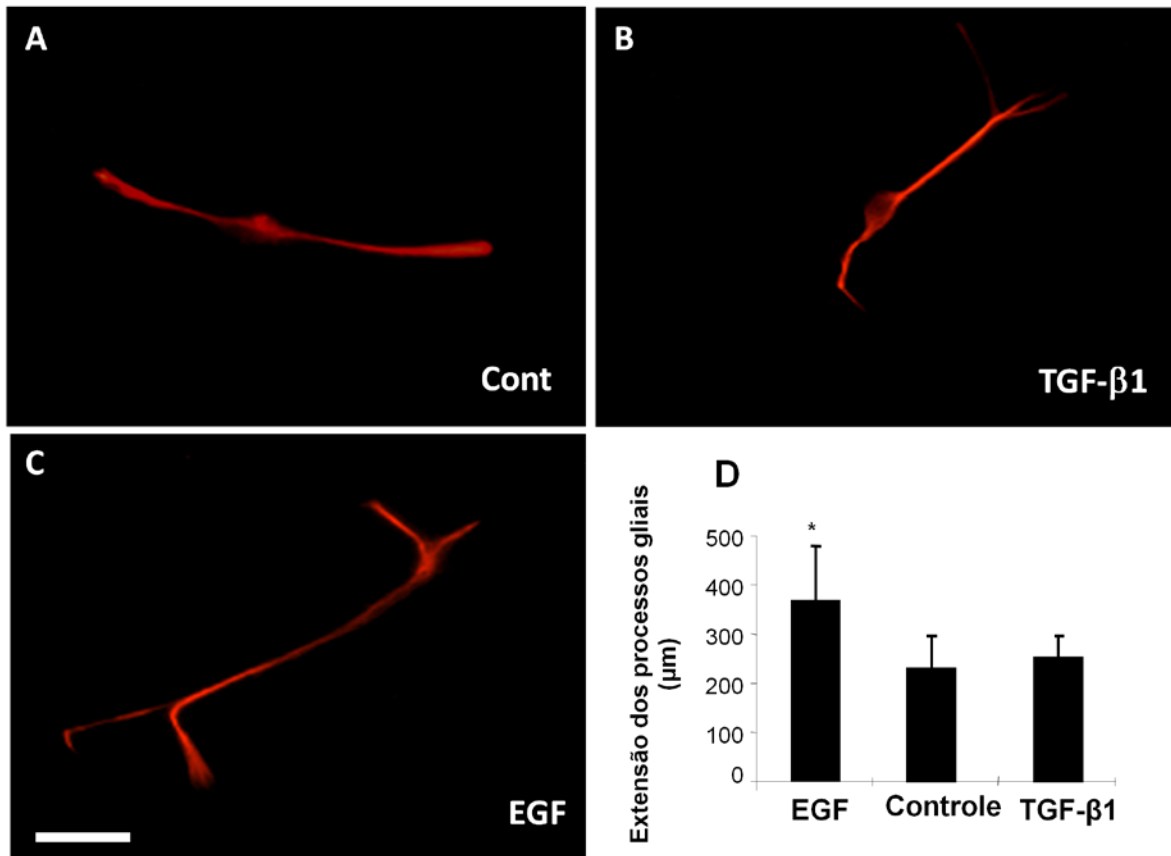




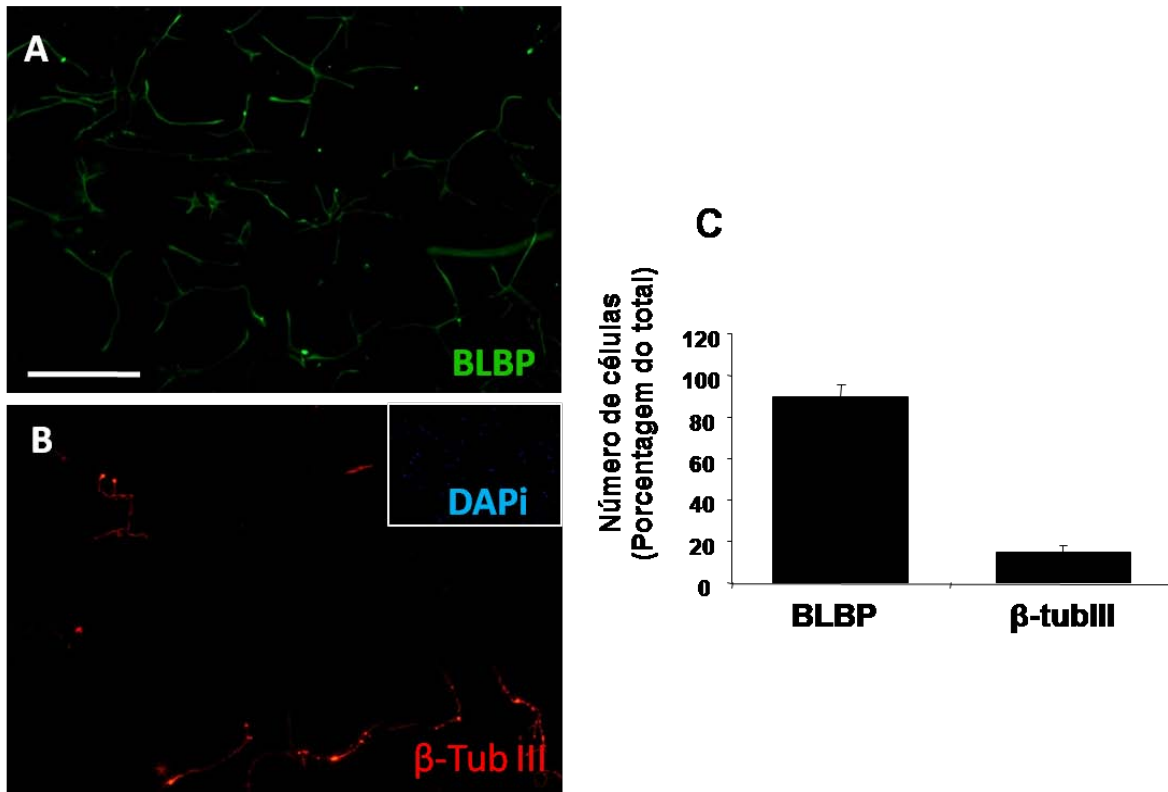
**Figura 14:** *Caracterização da cultura mista.* Culturas dissociadas de cerebelos de ratos P7 foram cultivadas por 48 horas em meio neurobasal acrescido com 2% de B-27. Após 48 horas de cultivo, as culturas foram fixadas em paraformaldeído-sacarose 4% e imunomarcadas para GFAP (A), β-Tubulina III (B). Barra de calibração, 100µm

As culturas tratadas com EGF apresentaram células gliais mais alongadas que na situação controle (**Figura 15**). Já o TGF-β1, não foi capaz de promover alteração na morfologia da glia de Bergmann, em cultura, como se pode observar na **Figura 15**. Isto sugere que o aumento da distância de migração, promovido pelo EGF, pode ter sido causado pelo alongamento da glia de Bergmann. No entanto para confirmar qual tipo celular seria o alvo da ação do EGF (se a glia de Bergmann ou se o neurônio granular e esta apresentar os efeitos de alongamento secundariamente), foi feito um novo tipo de cultura onde se obtém cerca de 90% de pureza de glia de Bergmann (**Figura 16**). Este novo tipo de cultura foi tratada com EGF e como se pode observar na **Figura 17**, este fator promoveu o alongamento celular, mesmo na

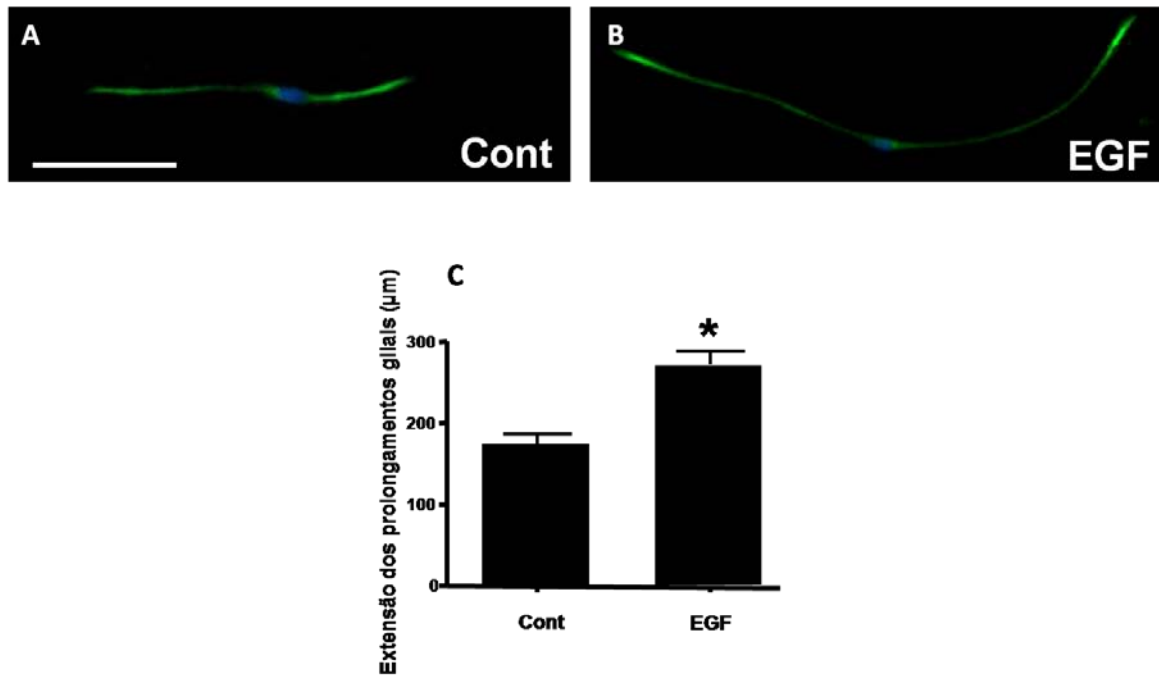
ausência de neurônios, mostrando assim que a ação do EGF é direta sobre a glia de Bergmann.



**Figura 15:** Efeito dos fatores, *TGF-β1* e *EGF*, no alongamento da glia de Bergmann. Culturas mistas cerebelares de ratos P7 foram tratadas com os fatores de crescimento *TGF-β1* (B) e *EGF* (C), ambos na concentração de 10ng/mL, desde o plaqueamento. Após o término do período de cultivo, as células foram fixadas e imunomarcadas para GFAP. O tamanho dos prolongamentos de B e C foram medidos através do programa image J e comparados a cultura sem tratamento (A). *EGF* promove alongamento na glia de Bergmann (D). \* $P < 0,05$ . Barra de calibração, 100 μm.



**Figura 16:** *Caracterização da cultura de glia de Bergmann.* Culturas dissociadas de cerebelos de ratos P7 foram cultivadas por 5 dias *in vitro*, fixadas em paraformaldeído-sacarose 4% e imunomarcadas para (A) BLBP, marcador de glia de Bergmann, e para (B)  $\beta$ -tubulina III, marcador neuronal. Note o enriquecimento da população de glia de Bergmann nesta cultura (C). Barra de calibração, 200  $\mu$ m.



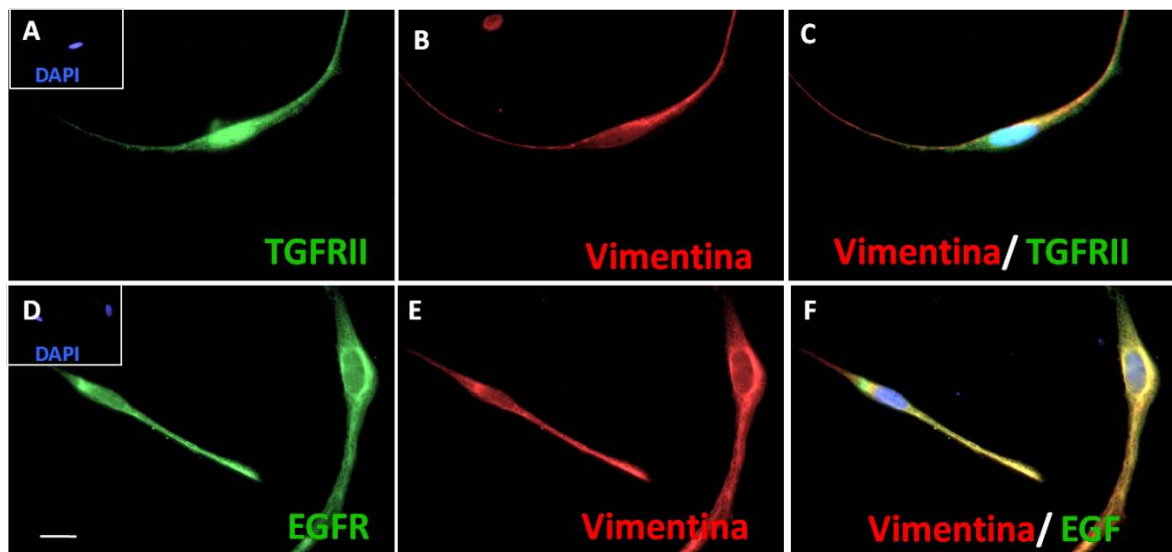
**Figura 17:** Efeito do EGF diretamente sobre o alongamento da glia de Bergmann. Culturas de glia de Bergmann de ratos P7, foram tratadas com o fator de crescimento EGF (B), na concentração de 10ng/mL, por 48 horas, fixadas e imunomarcadas para GFAP. O tamanho dos prolongamentos de B foram medidos através do programa image J e comparados a cultura sem tratamento (A). EGF promove de forma direta o alongamento na glia de Bergmann (C). \*P<0,05. Barra de calibração, 100 µm. Número de experimentos: 2.

#### 4.6 – Identificação de receptores para TGF-β1 (TGFRII) e EGF (EGFR) na glia de Bergmann

Como mostrado anteriormente, o EGF é capaz de induzir migração e promover o alongamento glial, já TGF-β1 não possui efeito nos parâmetros analisados. O mecanismo pelo qual EGF induz a migração não é conhecido. Entretanto, duas alternativas podem ser sugeridas: 1) EGF age diretamente na célula granular; 2) EGF age diretamente na glia de Bergmann induzindo a sua

radialização e, desta forma, indiretamente promovendo a migração neuronal. Nossos dados apontam a segunda hipótese, no entanto, para tentar elucidar esta questão, analisou-se se a glia de Bergmann expressa os receptores EGFR e TGFRII, ou seja, se ela seria capaz de responder diretamente aos estímulos dos fatores de crescimento, EGF e TGF- $\beta$ 1. Para isto, as culturas foram imunomarcadas para vimentina e para os respectivos receptores.

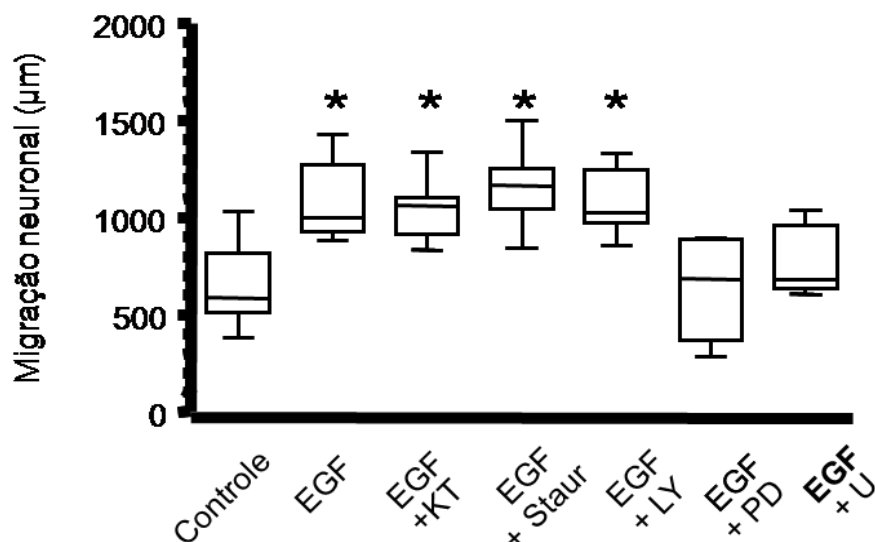
Como pode ser observado na **Figura 18**, a glia de Bergmann expressa EGFR e TGFRII *in vitro*. Isto mostra que ela seria capaz de responder diretamente aos estímulos destes fatores.



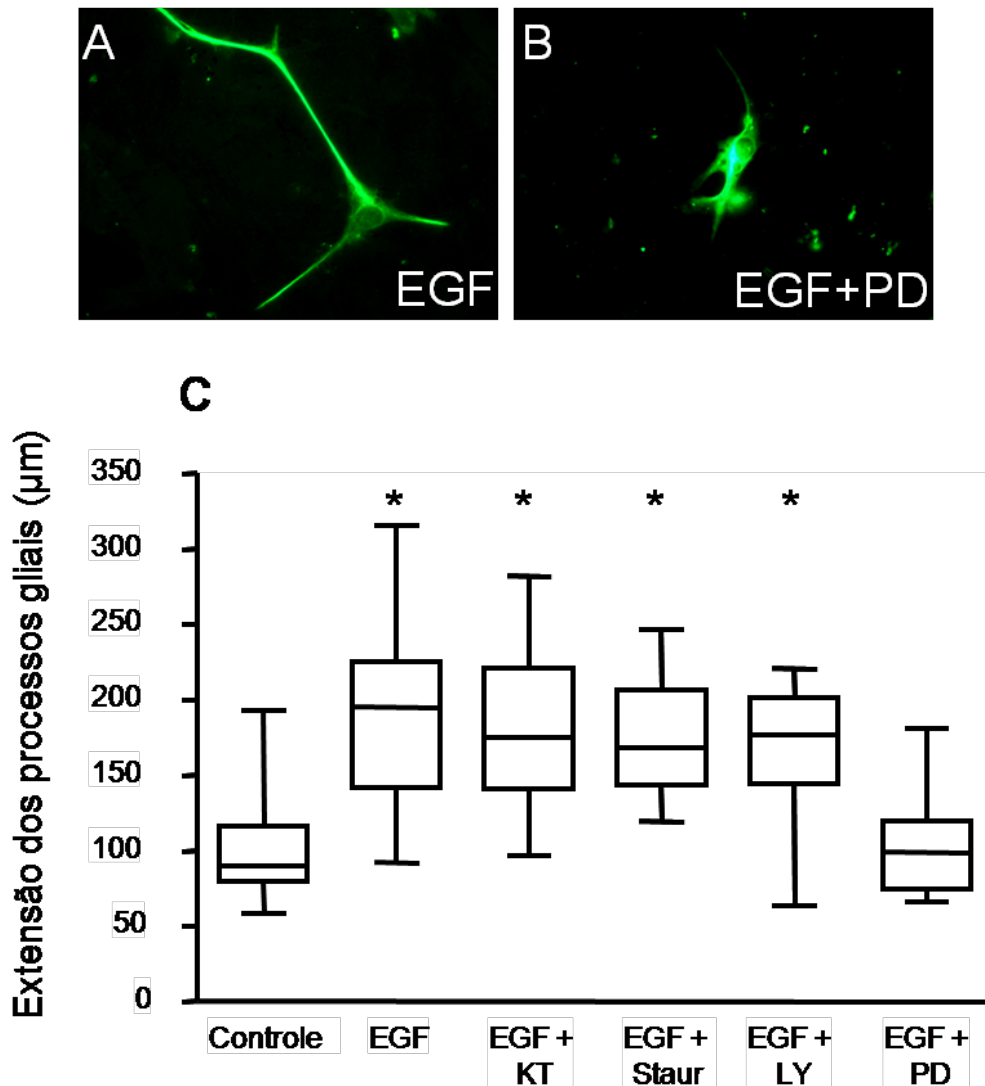
**Figura 18:** *Glia de Bergmann expressa EGFR e TGFRII.* Culturas de glia de Bergmann de ratos P7 foram cultivadas por 5 dias em meio DMEM/F12. Após este período as células foram fixadas e imunomarcadas para os receptores TGFRII (**A**) e EGFR (**D**) e para o marcador glial vimentina (**B** e **E**). Em **C** e **F** sobreposição das imagens de **A**, **B** e **D**, **E** respectivamente, demonstrando co-localização das marcações em uma mesma célula. Barra de calibração, 100 $\mu$ m. Número de experimentos:14.

## 4.7 – Análise da via de sinalização ativadas por EGF

Com o intuito de se analisar a via de sinalização pelo qual EGF promove migração neuronal e o alongamento das fibras da glia de Bergmann, analisaram-se explantes cerebelares e culturas mistas de ratos P7. Para o estudo de migração foram utilizados explantes cerebelares tratados com EGF e inibidores de vias de sinalização, pelas quais este fator pudesse atuar, tais como KT5720 (inibidor de PKA), Staurosporina (inibidor de PKC), LY294002 (inibidor de PI3K), U0126 e PD98059 (inibidores de MAPK). Como se pode observar, na **Figura 19**, os únicos inibidores capazes de reverter o efeito do EGF na migração neuronal foram o PD98059 e o U0126, ambos inibidores de ERK 1 e 2, membros da via de MAPK. Para os ensaios de alongamento foram utilizadas culturas mistas e estas foram tratadas de forma semelhante aos explantes. Novamente, como o observado na **Figura 20**, o único inibidor capaz de reverter o efeito de EGF no alongamento glial foi o PD98059, inibidor da via de MAPK. Estes dados demonstraram que o EGF promove o aumento da distância de migração e o alongamento das fibras da glia de Bergmann através da ativação da via de MAPK sugerindo uma correlação entre os dois eventos.



**Figura 19:** Efeito de inibidores farmacológicos de via de sinalização na migração neuronal. Explantes cerebelares obtidos de ratos com 7 dias pós-nascidos foram plaqueados sobre superfícies previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina na presença de meio de cultura neurobasal apenas (Controle) ou acrescido de EGF (EGF; 10ng/mL) e simultaneamente com diversos inibidores de vias de sinalização. Após 48 horas de cultivo, o raio máximo de migração de cada explante foi aferido pela visualização dos explantes por microscopia de contraste de fase. \*  $P < 0,05$ . **PD98059** e **U0126**, inibidores de ERK 1 e 2 (50 e 10 $\mu$ M, respectivamente); **LY294002**, inibidor da PI3K (5 $\mu$ M); **KT5720**, inibidor da proteína cinase-A (400nM); **Staurosporina**, inibidor de proteína cinase C (1nM). EGF promove aumento da migração através da via de MAPK.

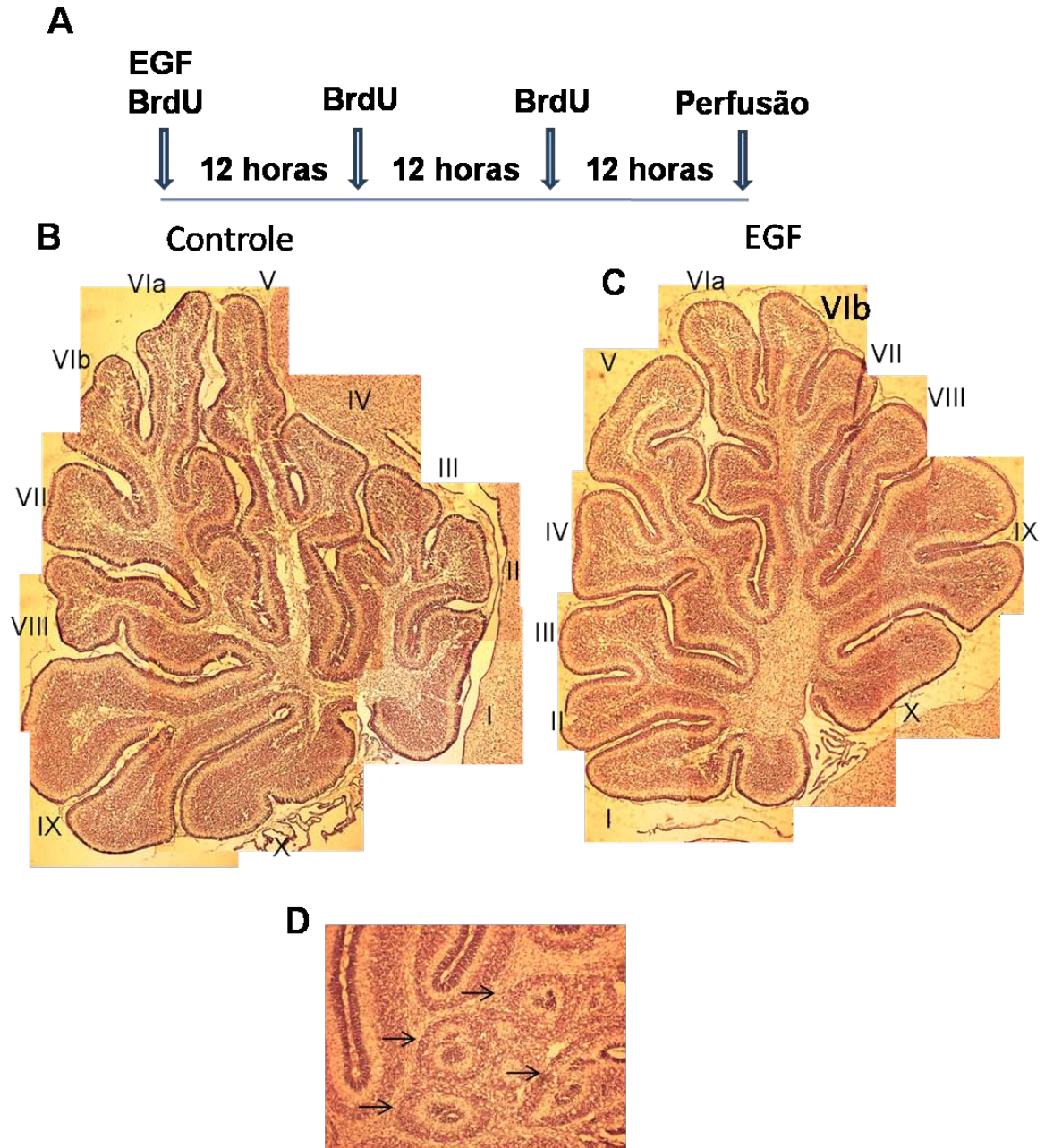


**Figura 20:** Efeito de inibidores farmacológicos de via de sinalização no alongamento glial. Culturas de células mistas foram preparadas a partir de cerebelos de ratos de 7 dias pós-natos. Após 24 horas de cultivo em meio de cultura neurobasal, as células foram tratadas com EGF (10ng/mL) acrescido de diversos inibidores de vias de sinalização, por 48h. EGF + PD (EGF e PD98059, inibidor da MAPK, 50µM); E + LY (EGF e LY294002, inibidor da PI3K 5µM); E + KT (EGF e KT5720, inibidor da proteína cinase-A, 400nM); E+Staur (EGF e Staurosporina, inibidor de proteína cinase C, 1nM). Subseqüentemente, as culturas foram fixadas e submetidas à imunocitoquímica para GFAP e a extensão máxima dos prolongamentos gliais foi quantificada (C) (\* P < 0,05). O inibidor da via de MAPK aboliu completamente a habilidade de EGF em induzir a extensão dos prolongamentos gliais (B). EGF promove alongamento celular através da via de MAPK.



## 4.8 – Morfologia cerebelar

Após a observação de que o EGF promove alongamento da glia de Bergmann e indução da migração neuronal *in vitro*, o próximo passo foi analisar se o EGF seria capaz de alterar a migração neuronal *in vivo*. Para isto, ratos P7 receberam uma injeção de EGF e três pulsos de BrdU, com intervalo de 12 horas entre eles. Inicialmente analisamos a morfologia cerebelar por cresil violeta através de coloração de cortes, retirados da região do vermis cerebelar (**Figura 21**). Como se pode observar não houve diferença aparente na morfologia da maioria dos animais injetados com o fator de crescimento, porém em um dos animais injetados com EGF houve uma grande desorganização das camadas cerebelares, como mostra a **Figura 21 D**.

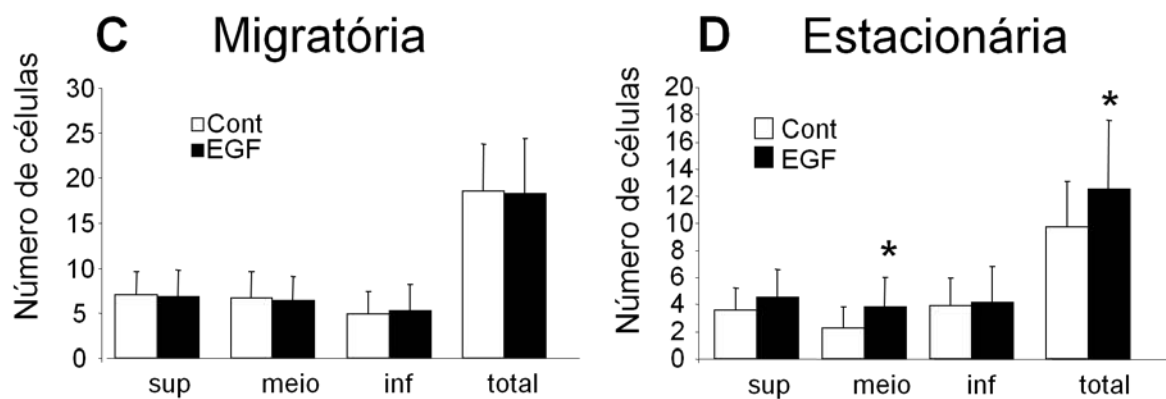
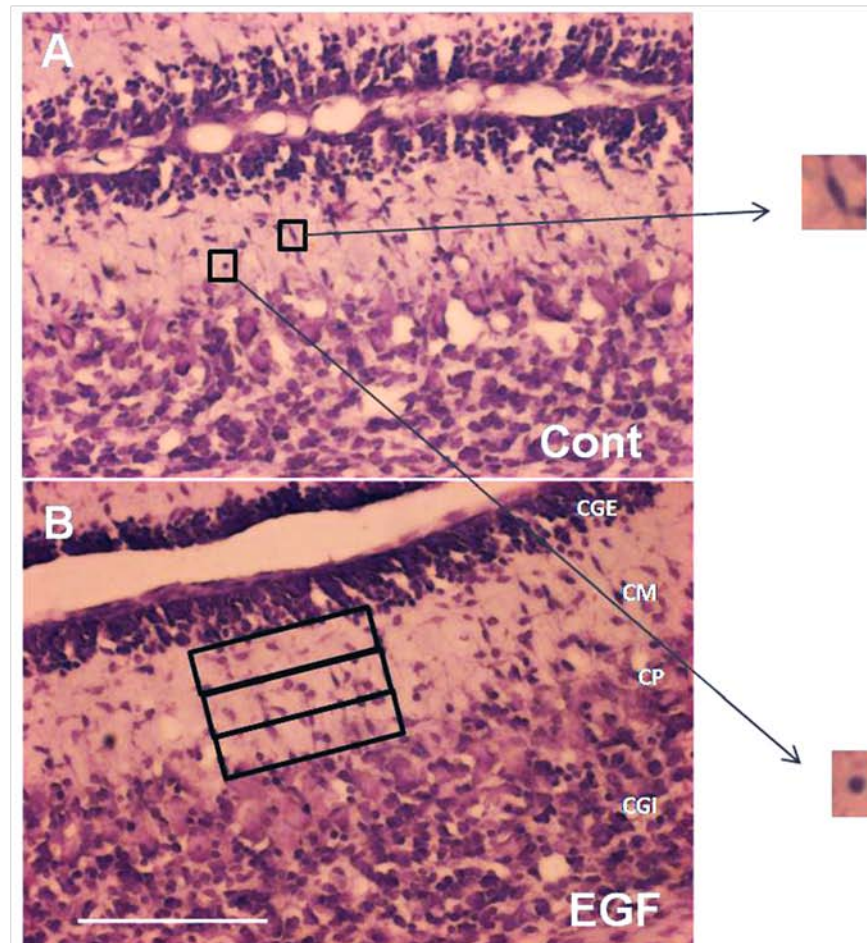


**Figura 21:** *Morfologia cerebelar dos animais injetados com EGF.* Injetou-se EGF na cisterna magna de ratos P7 e seguida de três injeções de BrdU intraperitoneal, com intervalo de 12 horas entre elas, quando então os animais foram perfundidos (**A**). Realizou-se coloração por cresil violeta dos cortes histológicos, tanto do controle (**B**) quanto do injetados com EGF (**C**). Não houve alterações aparentes na morfologia dos animais, porém um dos injetado com EGF apresentou uma desorganização das camadas cerebelares com formações de EGL ectópicas presentes na substância branca cerebelar (seta) (**D**). Número de experimentos: 6, sendo 3 controle e 3 injetados com EGF.

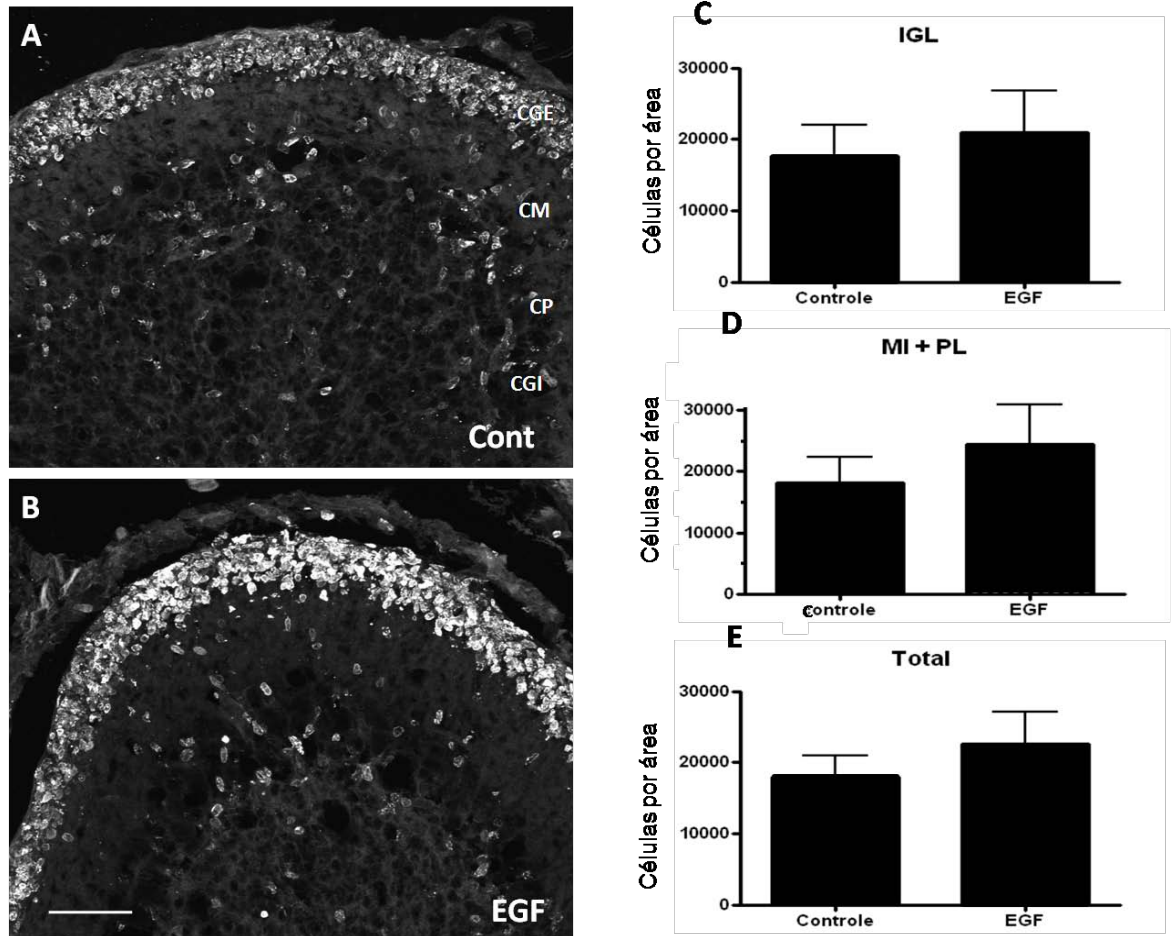
## 4.9 – Efeito do EGF na migração neuronal cerebelar *in vivo*

A segunda etapa das análises *in vivo*, consistiu em estudar a migração no tecido cerebelar. Para isto, foi escolhido aleatoriamente o lóbulo IX do cerebelo, onde foram feitas todas as quantificações. Primeiramente, foram feitos cortes histológicos na região do vérmis cerebelar e estes corados por cresil violeta. A quantificação da migração foi feita dividindo-se a camada molecular em três partes iguais (de 80X~~20~~<sup>20</sup>) e contando -se o número de células migratórias (morfologia alongada) e estacionárias (morfologia arredondada). Como se pode observar **Figura 22**, o EGF não promoveu alteração no número de células migratórias, porém ele aumentou o de células estacionárias presentes no meio da camada molecular.

Após as análises da migração através da morfologia celular, partiu-se para a análise através da incorporação de BrdU. A injeção e a detecção de BrdU foram realizadas como previamente descrito nos materiais e métodos. As células migratórias foram quantificadas como sendo as BrdU+, localizadas nas camadas molecular e de Purkinje e as pós migratórias as presentes na camada granular interna. O número de células foi dividido pela área das camadas de cada imagem. Como se pode observar na **Figura 23**, novamente, o EGF não promoveu alteração na migração *in vivo*.



**Figura 22:** Efeito do EGF na migração neuronal *in vivo*: histologia por coloração com cresil violeta. Injetou-se EGF cisterna magna de ratos P7, perfundiou-se após 36 horas e corou-se com cresil violeta. A quantificação foi feita dividindo-se a camada molecular em três partes iguais de 80 por  $\mu\text{m}$  (como mostrado em B), considerou-se célula migratória apenas as células com morfologia alongada e as que possuíam morfologia arredondada foram chamadas de células estacionárias (como mostrado em A). A, animal injetado com salina; B, injetado com EGF. C e D, quantificação do número de células migratórias e estacionárias, respectivamente. EGF não promoveu alteração na migração *in vivo*. \* $P < 0,05$ . Barra de calibração, 100  $\mu\text{m}$ . Número de experimentos: 6, sendo 3 controle e 3 injetados com EGF.



**Figura 23:** Efeito do EGF na migração neuronal *in vivo*: ensaio BrdU. Injetou-se EGF na cisterna magna de ratos P7 e simultaneamente BrdU intraperitoneal. Após a primeira injeção administraram-se mais duas de BrdU intraperitoneal com intervalo de 12 horas entre elas, após as quais os animais foram perfundidos e imunomarcados para BrdU. Imunomarcção para BrdU animal injetado com salina (A) injetado com EGF (B). Quantificação do número de células dividido pela área, (em mm<sup>2</sup>) respectivamente: camada granular interna (C), camada molécula mais camada de Purkinje (D) e do somatório de todas as áreas (E). Não há diferença no número de neurônios migratórios entre controle e os injetados com EGF. Barra de calibração 50  $\mu$ m. Número de experimentos: 8, sendo 4 controle e 4 injetados com EGF.

## 5 - Discussão

### 5.1 - Migração celular

Neste trabalho estudamos os efeitos dos fatores de crescimento EGF e TGF- $\beta$ 1 na migração de precursores de neurônios granulares *in vitro*. Demonstramos que através da análise de explantes cerebelares, que o EGF induz a migração, porém o TGF- $\beta$ 1 não é capaz de promover nenhuma alteração na migração. Este evento é mediado pelo alongamento da glia de Bergmann e envolve ativação da via de sinalização de MAPK.

Durante o desenvolvimento do SNC a maioria dos precursores celulares surge nas zonas proliferativas e, em seguida, migra para a sua camada de destino final, o que torna o processo migratório essencial para o desenvolvimento das estruturas do SNC. No cerebelo, a primeira onda migratória formará a camada granular externa (EGL) composta, principalmente, por precursores de neurônios granulares. Na segunda onda migratória, estes precursores migrarão radialmente através das fibras da glia de Bergmann e formarão a camada granular interna (IGL) no adulto (Ghashghaei *et al*, 2007; Hatten, 1999).

Muitas moléculas já foram apontadas como indutoras da migração tais como, fatores solúveis, como o FGF9, que é capaz de manter a morfologia da glia de Bergmann, (Lin *et al*, 2009) ou moléculas que regula a adesão célula-substrato, como a integrina- $\beta$ 1, que tem um papel importante na proliferação dos precursores dos neurônios granulares e na diferenciação da glia de

Bergmann (Blaess *et al*, 2004 e Belvindrah *et al*, 2006). Neste trabalho, analisamos o papel de dois fatores de crescimento o TGF- $\beta$ 1 e o EGF cuja ação na migração cerebelar era desconhecida. Nossa hipótese foi baseada, dentre outras evidências, no fato de TGF- $\beta$ 1 induzir a migração de precursores neuronais, no córtex cerebral de ratos (Siegenthaler & Miller, 2004). Além disso, na década passada, Seroogy e colaboradores (1995) identificaram RNAm para EGFR na EGL, principalmente na porção constituída de neurônios pré-migratórios dessa camada, havendo uma posterior diminuição na intensidade da marcação em neurônios da IGL (Seroogy *et al*, 1995). Associado a este fato, mais recentemente, EGF foi demonstrado como guia da migração de células Hela, a partir da geração de gradiente do fator (Sun *et al*, 2007). Juntos estes dados sugerem um envolvimento do EGF e TGF- $\beta$ 1 na migração celular. Portanto, nós analisamos os efeitos destas duas moléculas, durante o desenvolvimento cerebelar, mais especificamente durante a migração radial.

Nossos dados demonstraram que o EGF promove um aumento significativo na distância média do raio de migração celular, em relação ao controle, e isto pode ser observado já a partir de 24 horas de tratamento e se mantendo com 48 horas, como o demonstrado pela **Figura 10**. Já TGF- $\beta$ 1, que apesar de ter sido demonstrado previamente capaz de promover a migração no córtex de ratos, não alterou significativamente a migração cerebelar em nenhum dos tempos analisados, como mostra a mesma figura. Foram feitos, também, estudos na migração cerebral utilizando a mesma técnica de explantes cerebelares, para se analisar uma possível ação dos fatores de crescimento na migração radial desta estrutura. Como o desenvolvimento das

duas regiões ocorre em períodos diferentes, às análises de migração no córtex foram feitas utilizando ratos no período embrionários. Porém a migração das células corticais no modelo de explantes é praticamente nula, tornando inviável a utilização da técnica para estudos de migração cortical. Esta diferença observada pode ter sido devido à heterogeneidade celular do SNC (cerebelo X córtex cerebral). Já está bem estabelecido que o SNC possui um desenvolvimento diferenciado para cada região (o córtex, por exemplo, possui a maior parte do seu desenvolvimento no período embrionário, já o cerebelo no período pós-natal), apresentando tipos celulares específicos e mesmo quando apresentam o mesmo tipo celular, estes podem responder de forma diferente aos mesmos estímulos. No córtex cerebral a camada que prolifera e migra é a camada sub-ventricular, onde existem células migratórias em pouca quantidade e muito sensíveis aos explantes enquanto no cerebelo a camada proliferativa é mais externa (EGL), onde existem muitas células e estas são mais resistentes ao explante.

Outra questão também muito importante a ser considerada, é o fato de termos utilizado uma metodologia diferente para a análise de migração que a empregada por Miller e colaboradores (2004). Em seu estudo, Miller utilizou cultura de fatias de córtex cerebral e mediu a migração celular diretamente no tecido. Nós, no entanto, medimos a distância migratória a partir dos precursores neuronais que migravam para fora dos explantes através das fibras da glia de Bergmann. Apesar de o nosso modelo ser bem aceito para estudos de migração cerebelar, nele se perde a organização tecidual, em camadas, e com isto muitas das interações celulares que ocorrem *in vivo* podem ser perdidas.



Neste mesmo trabalho, Miller e colaboradores também demonstraram que a migração celular no córtex cerebral promovida pelo TGF- $\beta$ 1 era dependente da concentração do fator no meio onde baixas concentrações (2,5 ng/mL) não promovem efeito, concentrações intermediárias (10 ng/mL) promoviam um aumento significativo na migração e altas (40 ng/mL) inibem a migração cortical. Quando analisamos os efeitos do TGF- $\beta$ 1 na migração de precursores granulares em diferentes concentrações, observamos que, ao contrário do que ocorre no córtex cerebral, nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de promover alteração na migração dos explantes, mostrando que TGF- $\beta$ 1 não interfere na migração neuronal cerebelar mesmo em diferentes concentrações.

Portanto nossos resultados demonstraram que somente o EGF foi capaz de promover a migração dos precursores granulares cerebelares de animais pós natos *in vitro*. Entretanto, já é sabido que um mesmo fator pode induzir respostas distintas dependendo do período de desenvolvimento analisado.

Sendo assim fomos investigar se estes fatores de crescimento são capazes de induzir uma migração prematura dos precursores granulares em uma época do desenvolvimento em que este evento ainda não estaria acontecendo, ou seja, no período embrionário. O processo de formação do cerebelo envolve diversas etapas, uma delas é a proliferação dos precursores dos neurônios granulares (de E16-18), que já ocuparam o seu lugar na camada granular externa onde posteriormente iniciam a migração radial (Sotelo, 2004). Os precursores granulares principalmente proliferando e não migrando, durante o período embrionário, sendo que esta migração só tem início mais tarde no desenvolvimento. Sabe-se que o EGF é capaz de promover a proliferação de

precursores de neurônios granulares na EGL, portanto estas células são responsivas a pelo menos um dos fatores estudados (Martinez & Gomes 2005). Nossos resultados mostram que quando utilizamos animais E16-E18 o tratamento com o TGF- $\beta$ 1 não alterou a migração enquanto EGF a inibiu (como se pode observar na **Figura 12**). Isto provavelmente se deve ao fato de que, nesta fase do desenvolvimento não há quase migração radial, pois é um período em que os precursores do neurônios granulares estão principalmente proliferando e a glia de Bergmann está ainda se diferenciando. Acreditamos que em fases mais precoces do desenvolvimento o EGF iniba a migração de precursores granulares cerebelares, e em fases mais tardias, entretanto promova a migração, ao passo que o TGF- $\beta$ 1 não possui nenhum efeito neste evento. O TGF- $\beta$ 1 é importante no início do desenvolvimento, pois sabe-se que em células tronco/ progenitoras este fator de crescimento consegue aumentar o número de neurônios, porém, ao que os nossos resultados indicam, ele não afeta a migração radial cerebelar (Misumi *et al*, 2008).

Analisou-se a taxa de mobilidade e a velocidade dos neurônios migratórios, através da videomicroscopia de tempo intervalado dos explantes. Com isto tentamos determinar qual a forma de ação do EGF sobre o aumento da distância de migração neuronal. Concluímos com o experimento que o EGF não tem efeito direto aparente sobre a mobilidade neuronal, portanto passamos a hipotetizar que a ação do EGF seria, na verdade, sobre as fibras gliais e não nos neurônios migratórios.

## 5.2 - Alongamento da glia de Bergmann

Durante o processo de migração os precursores neuronais utilizam como suporte as fibras da glia de Bergmann. Tal processo é diretamente dependente da morfologia radial desta célula, que irá guiar os neurônios migratórios. Existem diversos fatores, que são capazes de promover a manutenção do fenótipo radial da glia de Bergmann, como por exemplo, as neuregulinas, da família do EGF, e proteínas de adesão como a astrotactina, dentre outros. As primeiras, as neuregulinas, são uma superfamília de proteínas que apresentam domínios EGF, a via de sinalização delas inclui membros da família ErbB de receptores. A neuregulina1 pode agir como molécula quimioatratadora ou repulsora, durante a migração para guiar os axônios dos neurônios durante o processo de desenvolvimento, além de ser importante para a manutenção da morfologia radial da glia radial hipocampal (Birchmeier, 2009 e Zheng & Feng 2006). A segunda, a astrotactina, é uma molécula de adesão neuronal, expressa durante a migração, cujo ligante na glia de Bergmann permanece desconhecido (Adams *et al*, 2002).

Os neurônios, também, são componentes muito importantes para a manutenção do fenótipo radial das células gliais, por exemplo, células Cajal-Retzius secretam relina que é fundamental para a manutenção do fenótipo radial (Super *et al*, 2000 e Soriano *et al*, 1997). No presente trabalho, foi demonstrado que EGF é capaz de induzir a migração neuronal no cerebelo. Entretanto não tínhamos visto se o efeito era direto nos precursores granulares ou indireto via glia de Bergmann.

Nosso dados mostraram que TGF- $\beta$ 1 não promoveu alteração na morfologia glial, o que corrobora os achados de Asano e colaboradores (2009), que recentemente demonstraram que camundongos com a via de TGF- $\beta$  interrompida apresentam desenvolvimento cerebelar normal (Asano *et al*, 2009). Em contraste o EGF promoveu um alongamento de até 30% das fibras gliais.

Foram utilizados para este experimento tanto culturas mistas como culturas com cerca de 90% de pureza de glia de Bergmann. Em ambos os modelos de cultura o EGF promoveu o alongamento glial. Este resultado sinaliza uma ação direta deste fator sobre a glia de Bergmann, pois, mesmo em culturas com praticamente nenhuma contaminação de outros tipos celulares o fator de crescimento promoveu o alongamento glial. Este achado, no entanto, não descarta uma possível ação indireta, ou seja, o EGF atuaria no neurônio fazendo com que estes produzissem algum fator que então teria ação sobre a glia de Bergmann, visto que, ainda existem neurônios nesta cultura.

### 5.3 – Análise da via de sinalização

Previamente, nosso grupo demonstrou que astrócitos cerebelares derivados de camundongos embrionários e recém-nascidos expressam o receptor tipo II para TGF- $\beta$ 1 (Sousa *et al*, 2004). Como mostra a **Figura 19** também demonstramos que a glia de Bergmann expressa o receptor para este fator, porém TGF- $\beta$ 1 não apresenta nenhum efeito aparente sobre a migração cerebelar. Sabe-se, porém, que o TGF- $\beta$ 1 está envolvido em outros eventos

como no amadurecimento da glia radial no córtex cerebral, durante o desenvolvimento (Stipursky & Gomes 2007).

Nosso grupo demonstrou também que a glia de Bergmann possui o receptor para EGF o EGFR, este receptor ainda não havia sido descrito na neste tipo celular pela literatura. Portanto este fator poderia agir diretamente sobre a glia de Bergmann induzindo a sua radialização e desta forma indiretamente promovendo a migração neuronal.

Sabe-se que fatores da família de EGF atuam através de receptores tirosina cinases que ativam diversas vias intracelulares. Dentre estas vias, as principais ativadas por este fator são as que envolvem, PKA, PKC, PI3K e MAPK. Observamos em nosso modelo que EGF foi capaz de induzir alterações morfológicas na glia de Bergmann, em culturas mistas, e também promover o aumento da distância de migração de precursores granulares, em explantes. Aparentemente, estes eventos são mediados pela via de MAPK, uma vez que a utilização de inibidores desta via impedem a ação de EGF. A via de MAPK já foi relacionada, anteriormente, a migração. NCAM140 (uma molécula de adesão celular) promove a migração celular sobre a fibronectina (proteína de matriz extracelular) na migração através da ativação da via de MAPK (Diestel *et al.*, 2005). A utilização de inibidores para as outras vias ativadas por EGF, não afetou os eventos observados.

Estes resultados corroboram nossa hipótese de que o EGF promove o alongamento celular da glia de Bergmann e conseqüentemente o aumento da distância de migração, e este evento é mediado pela ativação da via de MAPK.

## 5.4 - Migração de células granulares no período pós-natal

### *in vivo*

Vimos até então que EGF é um fator essencial para a regulação da morfologia da glia de Bergmann e para a indução da migração de precursores granulares cerebelares *in vitro*. Entretanto, não se sabe se estes eventos são regulados pelo EGF *in vivo*. Portanto foram feitas análises de animais P7, que receberam injeções de EGF na cisterna magna. Sabe-se que este fator de crescimento aumenta a proliferação de neurônios granulares na EGL (Martinez & Gomes 2005). Porém nossos resultados mostram que ele não promoveu alteração na foliação cerebelar (**Figura 22**). O EGF, também, não alterou o número de neurônios migratórios, como mostrado na **Figura 24**. Entretanto, observamos um aumento do número de células com morfologia estacionária na camada molecular como o observado na **Figura 23**. Portanto o EGF não é capaz de aumentar o número de células migratórias *in vivo*. No entanto, aumenta o número de células estacionárias. Estes dados sugerem que, assim como *in vitro*, o EGF promove uma alteração morfológica da glia de Bergmann, não permitindo a migração neuronal, porém sem alterar o número de neurônios migratórios.

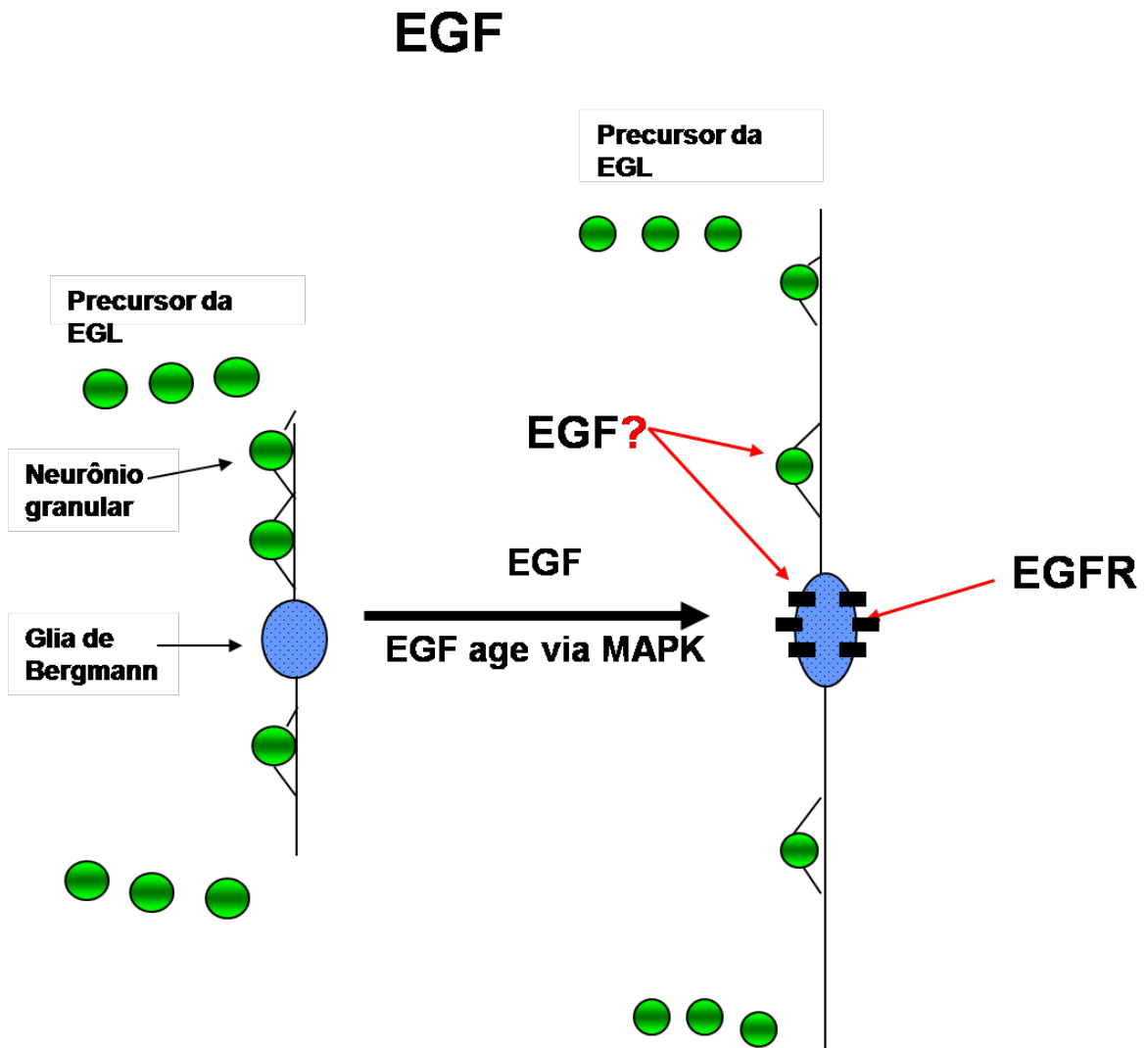
Portanto estes dados corroboram a hipótese de que o EGF atue no alongamento glial e não diretamente sobre o neurônio migratório. Os animais injetados, no entanto, estavam em um estágio do desenvolvimento propício ao estudo da migração neuronal, mas não ao estudo da formação da glia de Bergmann, pois esta, neste período, já se encontrava formada. A glia de Bergmann amadurece ainda no período embrionário, quando as primeiras

camadas surgem no cerebelo, portanto provavelmente este seria o momento ideal para se verificar a ação do EGF (Sotelo, 2004).

## 5.5 – Conclusões

O cerebelo vem ganhando grande importância recentemente devido às novas descobertas que o relacionam com eventos cognitivos e emocionais (Alder *et al*, 1999 ; Xu *et al*, 2006 e Tavano *et al*, 2007). Portanto o interesse em entender o funcionamento e o desenvolvimento desta estrutura vem crescendo ao longo dos anos.

Nossos resultados nos permitem concluir que o TGF- $\beta$ 1 não possui efeito sobre a morfologia da glia de Bergmann (apesar desta expressar os receptores para este fator), assim como na distância de migração (**Figura 25**). Em conjunto nos permitem sugerir o seguinte modelo de ação do EGF através do alongamento das fibras gliais, EGF induz um aumento na distância de migração em explantes cerebelares, mediado pela via de MAPK (**Figura 23**). Para descartarmos completamente a hipótese da ação direta do EGF ser sobre o neurônio granular e através deste sobre a glia de Bergmann através de interação neurônio-glia, pretendemos tratar culturas puras de glia de Bergmann com o EGF e depois realizar western blots para MAPK e MAPK fosforilada, mostrando assim que a ativação da via de MAPK seria realizada pela glia de Bergmann.



**Figura 25:** Esquema representando os efeitos do EGF. A glia de Bergmann se alonga e aumenta a migração neuronal, através da via de MAPK.



# TGF- $\beta$ 1

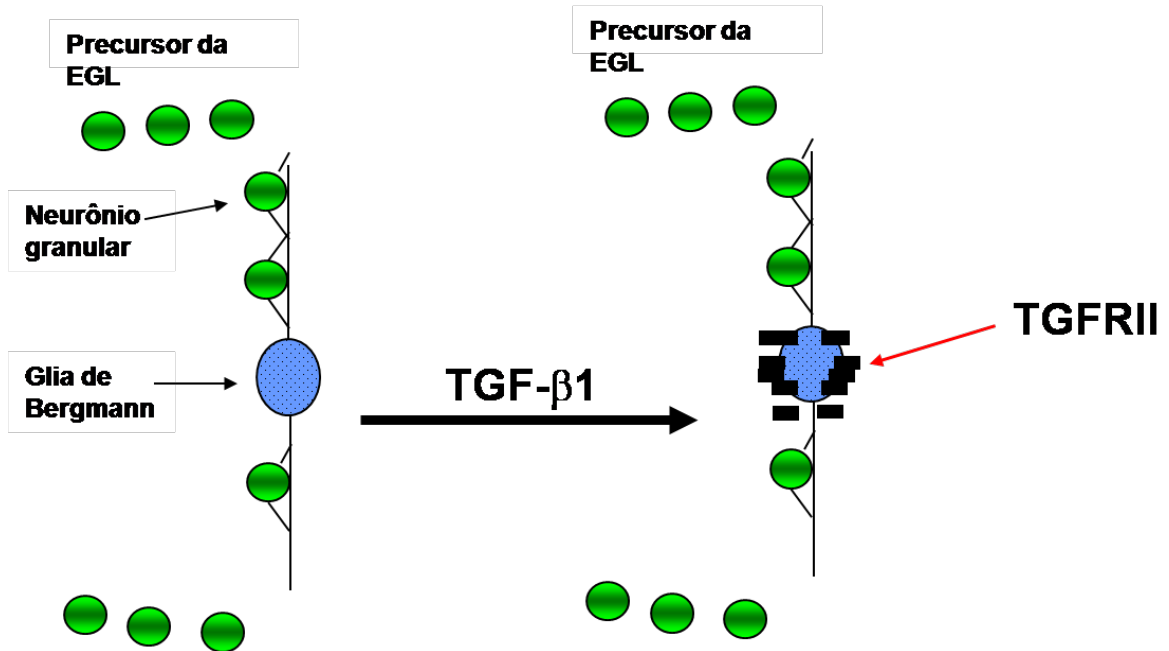


Figura 26: Representação dos efeitos do TGF- $\beta$ 1 sobre a glia de Bergmann.

## 6 – Conclusões

Em conjunto nossos dados indicam que há respostas diferenciadas para cada um dos fatores estudados. Enquanto TGF- $\beta$ 1 é relevante para o processo de migração no córtex cerebral, este fator não parece exercer efeito no cerebelo. Nossos dados apontam o EGF como um importante fator para a migração radial, pois ele modularia a morfologia glial do cerebelo, que é responsável por guiar os neurônios durante o desenvolvimento. Nosso trabalho enfatiza o papel dos fatores de crescimento como mediadores das interações neuro-gliais durante o desenvolvimento do sistema nervoso central

## 7 - Referências

Adams NC, Tomoda T, Cooper M, Dietz G, Hatten ME (2002) Mice that lack astrotactina have slowed neuronal migration. *Development*. **129**(4):965-72.

Alcock J., Scotting P., Sottile V. (2007). Bergmann glia as putative stem cells of the mature cerebellum. *Medical hypotheses* **69**(2):341-5.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Malter P. (2004). **Citoesqueleto**. In Alberts B. (editor) *Biologia molecular da célula* Atheneu Press, São Paulo.

Alder J., Lee K.J., Jessell T.M., Hatten M.E. (1999). Generation of cerebellar granule neurons *in vivo* by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. *Nature Neuroscience* **2**(6):535-40.

Alvarez O.R., Sotelo C., Alvarado-Mallart R.M. (1993). Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *Journal of Comparative Neurology* **333**(4):597-615.

Ango F., Wu C., Van der Want J.J., Wu P., Melitta Schachner Z., Huang J., (2008). Bergmann Glia and the Recognition Molecule CHL1 Organize GABAergic Axons and Direct Innervation of Purkinje Cell Dendrites *Plos Biology* **6**(4):e103.

Asano Y., Koishi K., Frugier T., McLennan I.S. (2009). Mice with Disrupted *TGF $\beta$*  Signaling Have Normal Cerebella Development, but Exhibit Facial Dysmorphogenesis and Strain-Dependent Deficits in Their Body Wall. *Cell molecular neurobiology*. In press

Azevedo F.A.C., Carvalho I.R.B., Grinberg I.T., Farfel J.M., Ferretti R.E.I., Leite R.E.P., Jacob Filho W., Lent R., Herculano-Houzel S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The journal of comparative neurology* **513**(5):532-41.

Baeriswyl T., Stoeckli E.T. (2008). Axonin-1/TAG-1 is required for pathfinding of granule cell axons in the developing cerebellum. *Neural Development* **17**;3:7.

Belvindrah R., Nalbant P., Ding S., Wu C., Bokoch G.M., Müller U. (2006). Integrin-linked kinase regulate Bergmann glial differentiation during cerebellar development. *Molecular and Cellular Neuroscience* **33**(2):109-25.

Birchmeier C. (2009). ErbB receptors and the development of the nervous system. *Experimental cell research* **315**(4):611-8.

Blaess S., Grauss-Porta D., Belvindrah R., Radakovistis R., Pons S., Littlewood-Evans A., Senften M., Guo H., Li Y., Miner J.H., Reichardt L.F., Müller U. (2004).  $\beta$ 1- integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *The Journal of Neuroscience* **24**(13):3402-12.

Bledsoe J., Semrud-Clikeman M., Pliszka S.R. (2009). A magnetic resonance imaging study of the cerebellar vermis in chronically treated and treatment-naïve children with attention-deficit/hyperactivity disorder combined type. *Biologic Psychiatry* **65**(7):620-4.

Breier G., Blum S., Peli J., Groot M., Wild C., Risau W., Reichmann E. (2002). Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer* **97**(2):142-8.

Caric D., Raphael H., Viti J., Feathers A., Wancio D., Lillien L. (2001). EGFRs mediate chemotactic migration in the development telencephalon. *Development* **128**(21):4203-16.

Chizhikov V., Millen K. (2003). Development and malformations of the cerebellum in mice. *Molecular Genetics and Metabolism*. **80**(1-2):54-65.

Choi B.H., Lapham L.W. (1980). Evolution of Bergmann glia in developing human fetal cerebellum: a golgi electron microscopic and immunofluorescent study. *Brain Research* **190**(2):369-83.

Ciccolini F., Mandl C., Hölzl-Wenig G., Kehlenbach A., Hellwig A. (2005). Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Development Biology* **284**(1):112-25

Custer S.K., Garden G.A., Gill N., Rueb U., Libby R.T., Schultz C., (2006). Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nature Neuroscience* **9**(10):1302-11

Diers-Fenger M., Kirchhoff F., Kettenmann H., Levine J.M., Trotter J. (2001). AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia. *Glia* **34**(3):213-28.

Diestel S., Hinkle C.L., Schmitz B. Maness P.F. (2005). NCAM140 stimulates integrin-dependent cell migration by ectodomain shedding. *Journal of Neurochemistry* **95**(6):1777-84

Dietrichs E. (2008). Clinical manifestation of focal cerebellar disease as related to the organization of neural pathways. *Acta Neurologica Scandinavica Supplementum* **188**:6-11.

Elvers M., Pfeiffer J., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B. (2005). TGF- $\beta$ 2 neutralization inhibits proliferation and activates apoptosis of cerebellar granule cell precursors in the developing cerebellum. *Mechanisms of Development* **122**(4):587-602

Feng Z., Ko C.P. (2008). Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta1. *Journal of Neuroscience* **28**(39):9599-609.

Förster E., Tielsch A., Saum B., Weiss K.H., Johanssen C., Graus-Porta D., Müller U., Frotscher M. (2002). Reelin, Disabled 1, and  $\beta$ 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(20):13178-83.

Gomes F.C.A., Sousa V.O., Romão L. (2005). Emerging roles for TGF- $\beta$ 1 in nervous system development. *International Journal of Developmental Neuroscience* **23**(5):413-24.

Ghashghaei H.T., Lai C., Anton E.S. (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nature reviews Neuroscience* **8**(2):141-51

Hansena S. M., Berezinb V., Bockb E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-Cadherin. *Cell. Molecular Life Science* **65**(23):3809-21.

Hallonet M.E., Le Douarin N.M. (1993). Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and mesencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimaeras. *The European Journal of Neuroscience* **5**(9):1145-55

Hatten M.E. (1999). Central nervous system Neuronal migration. *Annual Reviews Neuroscience* **22**:511-39

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (2003). O cerebelo. Princípios da neurociência Maolo Press, São Paulo.

Komuro, H., Rakic, P., (1995). Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *Journal of Neuroscience* **15**, 1110–1120.

Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E., Rakic, P., (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *Journal of Neuroscience* **21**, 527–540.

Lajoie P., Partridge E.A., Guay G., Goetz J.G., Pawling J., Lagana A., Joshi B., Dennis J.W., Nabi I.R. (2007). Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *The Journal of Cell Biology* **179**(2):341-56

Larsell O. (1952). The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *Journal of Comparative Neurology* **97**:281–356

Lent R. (2004). O alto comando motor – Estrutura e função dos sistemas supramedulares de comando e controle da motricidade. *In* Lent R. (editor) Cem Bilhões de Neurônios Atheneu Press, Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte.



Levine J.M., Stincone F., Lee YS. (1993). Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. *Glia* **7**(4):307-21.

Lewis P.M., Gritti-linde A., Smeyne R., Kottmann A., McMahon A.P. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Development Biology* **270**(2):393-410.

Lin Y., Chen L., Lin C., Luo Y., Tsai R.Y.L., Wang F. (2009). Neuron-derived FGF9 is Essential for Scaffold Formation of Bergmann Radial Fibers and Migration of Granule Neurons in the Cerebellum. *Developmental Biology* **329**(1):44-54.

Machado A. (1993). Cerebelo: anatomia macroscópica e divisões. *In*. Machado A. (Editor). *Neuroanatomia Funcional*. Atheneu Press, Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte, 49 -53.

Machado A. (1993). Estrutura e funções do Cerebelo. *In*. Machado A. (Editor). *Neuroanatomia Funcional*. Atheneu Press, Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte, 215 – 227.

Malatesta P., Appolloni I., Calzolari F. (2008). Radial glia and neuronal stem cells. *Cell tissue research* **331**(1):165-78.

Martinez R., Gomes F.C.A. (2002). Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extra cellular matrix proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(51):49311-8.

Martinez R., Gomes FC. (2005) Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway. *Journal of Neuroscience Research* **80**(3):341-9

Merkle F.T., Tramontin A.D., García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(50):17528-32.

Mills J., Niewmierzycka A., Oloumi A., Rico B., St-Arnaud R., Marckenzie I.R., Mawji N.M., Wilsin J., Reichardt L.F., Dedhar S. (2006). Critical role of integrin linked kinase in granule cell precursor proliferation and cerebellar development. *The Journal of Neuroscience* **26**(3):830-40.

Misumi S., Kim T.S., Jung C.G., Masuda T., Urakawa S., Isobe Y., Furuyama F., Nishino H., Hida H. (2008). Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor b1. *European Journal of Neuroscience* **28**(6):1049-59.

Palma V., Altaba A.R. (2004). Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**(2):337-45

Piao Y.S., Iwakura Y., Takei N., Nawa H. (2005). Differential distributions of peptides in the epidermal growth factor family and phosphorylation of ErbB 1 receptor in adult rat brain. *Neuroscience Letters* **390**(1):21-4

Ponti G., Peretto P., Bonfanti L. (2008). Genesis of Neuronal and Glial Progenitors in the Cerebellar Cortex of Peripuberal and Adult Rabbits. *Plos one* **3**(6):e2366.

Qin L., Wine-Lee L., J. Ahn K., Crenshaw E. B., (2006) Genetic Analyses Demonstrate That Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Embryonic Cerebellar Development. *Journal of Neuroscience* **26**(7):1896-905.

Rammani N., (2006). The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nature reviews Neuroscience* **7**(7):511-22.

Romão L.F., Sousa V.O., Neto V.M., Gomes F.C. (2008). Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF-beta1 pathways. *Journal of Neurochemistry* **106**(2):746-56.

Santiago M.F., Pinho M.B., Costa M.R., Gandra M., Cavalcante L.A., Otero R.M. (2001). Expression and function of ganglioside 9-O-Acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. *Molecular and Cellular Neuroscience* **17**(3):488-99.

Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *Journal of Comparative Neurology* **141**:283–312.

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

Rios I., Alvarez-Rodríguez R., Martí E. Pons S. (2004). Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development* **131**(13):3159-68.

Salins P., He Y., Olson K., Glazner G., Kashour T., Amara F. (2008). TGF-beta1 is increased in a transgenic mouse model of familial Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis. *Neuroscience Letters* **430**(1):81-6.

Seroogy K.B., Gall C.M., Lee D.C., Kornblum H.I. (1995). Proliferative zone of postnatal rat brain express epidermal growth factor receptor mRNA. *Brain Research* **670**(1):157-64.

Siegenthsler J.A., Miller M.W. (2004). Transforming growth factor  $\beta$ 1 modulates cell migration in rat cortex: Effects of ethanol. *Cerebral Cortex* **14**(7):791-802.

Sotelo C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in Neurobiology* **72**(5):295-339.

Sottile V., Li M., Scotting P.J. (2006). Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Research* **1099**(1):8-17.

Sillitoe R.V., Joyner A.L. (2007). Morphology, Molecular Codes, and Circuitry Produce the Three-Dimensional Complexity of the Cerebellum. *Cell Development Biology* **23**:549-77.

Soriano E., Alvarado-Mallart R.M. (1997). Cajal-Retzius Cells Regulate the Radial Glia Phenotype in the Adult and Developing Cerebellum and Alter Granule Cell Migration. *Neuron* **18**(4):563-77.

Sousa V.O., Almeida J.C., Eller C.M., Gomes F.C.A. (2006). Characterization of TGF- $\beta$ 1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes. *In Vitro Cell Development Biology Animal* **42**(7):171-5.

Stipursky J., Gomes F. C. A. (2007). TGF- $\beta$ 1/SMAD signaling indices astrocyte fate commitment *in vitro*: implications for glia development. *Glia* **55**(10):1023-33

Sun Y., Ling K., Waganer M.P., Anderson R.A. (2007). Type I $\gamma$  phosphatidylinositol phosphate kinase is required for EGF-stimulated directional cell migration. *The Journal of Cell Biology* **178**(2):297-308.

Super H., Del Río J.A., Martínez A., Pérez-Sust P., Soiano E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cerebral cortex* **10**(6):602-13.

Sudarov A., Joyner A.L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Development* **3**;2:26.

Tavano A., Grasso R., Gagliardi C., Triulzi F., Bresolin N., Fabbro F., Borgatti R. (2007). Disorders of cognitive and affective development in cerebellar malformation. *Brain* **130**(Pt 10):2646-60.

Van Buskirk C., Sternberg P.W. (2007). Epidermal growth factor signaling induces behavioral quiescence in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience* **10**(10):1300-7.

Weller M., Krautler N., Mantei N., Suter U., Taylor V. (2006). Jagged 1 ablation results in cerebellar granule cell migration defects and depletion of Bergmann glia. *Developmental Neuroscience* **28**(1-2):70-80.

Wong R.W.C., Guillyayd L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor* **15**(2-3):147-56.

Xu D., Liu T., Ashe J., Bushara K.O. (2006). Role of olivo-cerebellar system in timing. *The Journal of Neuroscience* **26**(22):5990-5.

Zhang F., Laiho M. (2003). On and off: proteasome and TGF- $\beta$  signaling. *Experimental Cell Research* **291**(2):275-81.

Zheng C.H., Feng L. (2006). Neuregulin regulates the formation of radial glial scaffold in hippocampal dentate gyrus of postnatal rats. *Journal Cell Physiology*. 207(2):530-9.

Zhou Y.X., Zhao M., Li D., Shimazu K., Sakata K., Deng C.X., Lu B. (2003). Cerebellar deficit and hyperactivity in mice lacking Smad 4. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:42313-42320.

Zhou P., Porcionatto M., Pilapil M., Chen Y., Choi Y., Tolias K.F., Bikoff J.B., Hong E.J., Greenberg M.E., Segal R. (2007). Polarized signaling endosomes coordinates BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron* **55**:53-68.

**Anexo I**



## CHARACTERIZATION OF TGF- $\beta$ 1 TYPE II RECEPTOR EXPRESSION IN CULTURED CORTICAL ASTROCYTES

VIVIAN DE OLIVEIRA SOUSA, JULIANA CARVALHO ALMEIDA, CRISTIANE MONTEIRO ELLER, AND FLÁVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES<sup>1</sup>

*Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

(Received 10 February 2006; accepted 18 April 2006)

### SUMMARY

The transforming growth factor- $\beta$ s (TGF- $\beta$ s) comprise a family of pleiotropic members that signal through two types of serine/threonine kinase receptors, named TGFRI (TGF- $\beta$  type I receptor) and TGFRII (TGF- $\beta$  type II receptor). We previously demonstrated that cortical neurons increase the astrocyte maturation marker, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and thus, astrocyte differentiation, by inducing TGF- $\beta$ 1 secretion by astrocytes in vitro. Although TGF- $\beta$  receptor expression has been described in different brain regions and cell types, their localization is still a subject of discussion. In the present work, we analyzed TGFRII expression in cultured cortical astrocytes from embryonic and newborn animals by immunocytochemistry, Western blot, and reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR). We report for the first time expression of TGFRII in embryonic glia. TGFRII immunostaining was punctual and spread throughout the cellular membrane of embryonic and newborn astrocytes. Western blot and RT-PCR assays revealed similar levels of the receptor in astrocytes from different ages. Identification of TGFRII in embryonic astrocytes is novel and might point to the multipotent precursor cell, radial glia, as a potential target for TGF $\beta$ 1 during astrocyte development.

*Key words:* CNS development; TGF- $\beta$ 1; TGFRII; astrocyte differentiation.

Transforming growth factor betas (TGF- $\beta$ s) constitute a large superfamily that plays many roles in numerous cells and tissues, including cell-cycle control, regulation of early development, differentiation, extracellular matrix formation, angiogenesis, hematopoiesis, and immune functions (Böttner et al., 2000; Massagué, 2000; Unsicker and Strelau, 2000; Abreu et al., 2002; Unsicker and Kriegstein, 2002).

Members of the TGF- $\beta$  family signal mainly through a heteromeric complex of two transmembrane proteins, designated TGF- $\beta$ 1 receptor type I isoform (TGFRI) and type II isoform (TGFRII) (Massagué, 1998). Signaling is triggered by the TGF- $\beta$  binding to a type II receptor, followed by recruitment of a type I receptor, which leads to phosphorylation of the serine and threonine residues of TGFRI by TGFRII. This results in activation of the TGFRI kinase and allows receptor I to propagate the signal to downstream elements (Massagué, 1992; Wrana et al., 1994; Massagué, 1998; Böttner et al., 2000; Massagué and Chen, 2000).

Type I and type II receptors are widely distributed in different brain regions in the developing and adult nervous system. Several works identified neuronal and astrocytic expression of these receptors in vitro and in vivo. However, available data on the localization of TGFRI and TGFRII are conflicting (Tomoda et al., 1996; Vivien et al., 1998; Böttner et al., 1996, 2000; de Sampaio e Spohr et al., 2002; Sousa et al., 2004; Gomes et al., 2005).

By taking advantage of a well-established coculture system of

neural cells, our laboratory previously demonstrated that cortical neurons induce synthesis and secretion of TGF- $\beta$ 1 by astrocytes (de Sampaio e Spohr et al., 2002). TGF- $\beta$ 1 secreted by astrocytes acts on these cells, thus activating the promoter of the astrocyte maturation marker gene, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and inducing astrocyte differentiation in vitro (Gomes et al., 1999; de Sampaio e Spohr et al., 2002). This event is modulated during astrocyte development because embryonic astrocytes are highly responsive to TGF- $\beta$ 1/neurons.

In the present work, we analyzed the expression of TGFRII—the first member of the signaling pathway—in cultured astrocytes derived from embryonic and newborn mice. Our data reveal for the first time that embryonic astrocytes express TGFRII, suggesting a role for the TGF- $\beta$  signaling pathway during glial development.

Astrocyte primary cultures were prepared from cerebral cortex derived from newborn (P0) or embryonic, 14 d (E14) Swiss mice, as previously described (Sousa et al., 2004). Pregnant females were killed by halothane, followed by cervical dislocation, and embryos were removed at E14. Newborn mice were anesthetized by hypothermia with ice and decapitated. All animal protocols were approved by the Animal Research Committee of The Federal University of Rio de Janeiro and conformed to National Institutes of Health guidelines and public law. After newborn mice were anesthetized, they were decapitated, cerebral cortexes were removed, and the meninges were carefully stripped off. Dissociated cells were plated onto 15.5-mm-diameter wells (24-well plates, Corning Incorporated, Corning, NY) that were previously coated with polyornithine (1.5  $\mu$ g/ml, molecular weight 41,000, Sigma Chemical Co., St. Lou-

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at E-mail: fgomes@anato.ufrj.br

is, MO), in Dulbecco modified Eagle medium/F12 medium, supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA). For immunocytochemistry assays, cells were plated on polyornithine-treated glass coverslips. The cultures were incubated at 37° C in a humidified 5% carbon dioxide, 95% air chamber for 10 d until reaching confluence.

Immunocytochemistry was performed as previously described (Martinez and Gomes, 2002). Briefly, cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min at room temperature. After permeabilization, cells were blocked with 10% bovine serum albumin (Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS blocking solution) for 1 h and incubated overnight at room temperature with the specified primary antibodies diluted in blocking solution. Primary antibodies were mouse anti-GFAP antiserum (1:100; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, U.K.) and rabbit anti-TGFR2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). After primary antibody incubation, cells were extensively washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Secondary antibodies were conjugated with Cy3 (sheep anti-rabbit; 1:5000; Sigma) or with fluorescein isothiocyanate (sheep anti-mouse; 1:400; Sigma). Negative controls were performed by omitting the primary antibody during staining. In all cases, no reactivity was observed when the primary antibody was absent.

Biochemical characterization of proteins was done according to Abreu et al., (2002). Cultures were lysed in 2X loading buffer (100 mM Tris-chlorine, pH6.8; 4% of sodium dodecyl sulfate; 0.2% of bromophenol blue; 20% of glycerol; and 200 mM of dithiothreitol) and then were boiled for 5 min before being loaded into the gel. Approximately 10 µg of protein per lane were submitted to electrophoresis in a 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) mini gel. After separation, proteins were electrically transferred onto a Hybond-P polyvinylidene difluoride transfer membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Miami, FL) for 1 h. Membranes were blocked in 5% PBS–milk, and primary antibodies were added for 1 hr at room temperature. After several washes, peroxidase-conjugated secondary antibody was added to the membrane and incubated for 1 hr at room temperature. Proteins were visualized using the enhancing chemiluminescence detection system (ECL-Plus, Amersham Pharmacia Biotech). The following primary antibodies were used: rabbit anti-TGFR2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and mouse anti- $\alpha$ -tubulin (1:1000; Sigma). The following secondary peroxidase-conjugated antibodies were used: goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and goat anti-mouse IgG (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech).

For reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) assays, total RNA was isolated from cells using TRIZOL (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the protocol provided by the manufacturer. After deoxyribonuclease (DNase) treatment (RQ1 ribonuclease [RNase]-free DNase, Promega, Madison, WI), RNA samples (up to 1 µg) were reverse-transcribed into cDNA using Random primers and Improm II Reverse transcriptase (Promega). cDNA was amplified by *Taq* DNA polymerase in Storage Buffer B using Promega's protocol. Sense- and antisense-specific oligonucleotides were used as follows:  $\beta$ -actin: sense 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3' and antisense 5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', giving a product of the predicted length of 550 bp; TGFR2: sense 5'-CGC TTT GCT GAG GTC TAT AAG GC-3' and antisense 5'-GAT ATT GGA GCT CTT GAG GTC CCT-3', giving a product

of the predicted length of 395 bp; GFAP: sense 5'-CTT TGC TAG CGA CAT CGA GAA GGT CCG CTT-3' and antisense 5'-CGA TTC AAC CTT TCT CTC CAA ATC CAC ACG-3', giving a product of the predicted length of 339 bp. Amplification was performed under the following conditions (25 cycles for  $\beta$ -actin and GFAP, and 35 cycles for TGFR2): denaturation at 94° C for 50 s, annealing at 60° C for 50 s, and polymerization at 72° C for 1 min 30 s. PCR products were size-fractionated by electrophoresis using a 2% agarose gel. Negative controls for contamination from extraneous and genomic DNA were carried out. Under these conditions, no apparent band was detected. All samples were normalized against the same expression value for the housekeeping  $\beta$ -actin gene.

We previously demonstrated that astrocytes synthesize and secrete TGF- $\beta$ 1 in vitro in response to neurons (de Sampaio e Spohr et al., 2002). This event is modulated by astrocyte age because embryonic astrocytes are more responsive to this influence than those derived from newborn and 10-d-old mice. Whereas newborn and postnatal astrocytes have been shown to express TGFR2, no data concerning embryonic glia is available. To address this point, we employed three different approaches: immunocytochemistry, Western blot, and RT-PCR.

Confluent astrocyte monolayers derived from embryonic and newborn cerebral cortex were prepared and immunostained for TGFR2 and GFAP. As shown in Fig. 1, we identified TGFR2 immunostaining in both embryonic and newborn astrocyte cultures. Immunostaining was punctual and spread throughout the cellular membrane of astrocytes (Fig. 1A, B, E, and F). In contrast, GFAP immunolabeling was localized in the area from the perinuclear regions through the cytoplasm, as expected for this intermediate filament protein (Fig. 1C and D). Under these culture conditions, most of the cells stain for GFAP, attesting to their astrocytic phenotype. Immunolabeling analysis did not reveal significant differences in the pattern of TGFR2 expression in the astrocytes from the two age groups. However, we observed an increase in the intensity of GFAP immunolabeling in newborn astrocytes (Fig. 1D).

Further identification of the TGFR2 protein was performed by Western blot (Fig. 2). Total extracts of the astrocyte proteins cultured from E14 and P0 cerebral cortex were submitted for electrophoresis in a SDS-PAGE gel and analyzed by immunoreaction using antibodies against TGFR2. Immune reaction to  $\alpha$ -tubulin was used to monitor protein loading. In agreement with immunocytochemistry data, Western blot analyses directly identified the TGFR2 protein in E14 astrocytes. Quantitative analyses did not reveal differences in TGFR2 levels in the embryonic and newborn astrocytes.

Next, we directly assessed TGFR2 gene expression in the astrocytes by RT-PCR (Fig. 3). Total mRNA from the cultured astrocytes derived from the E14 and P0 mice were reverse-transcribed and amplified by PCR. Amplification of  $\beta$ -actin mRNA was performed to assay RNA integrity and for loading control. We detected high and similar levels of TGFR2 transcripts in cortical astrocytes from either embryonic or newborn cultures (Fig. 3). In the immunocytochemistry data, we observed a 1.5-fold increase in the levels of GFAP mRNA in newborn astrocytes, which was probably due to the heterogeneity of the glial population present in the embryonic and newborn cultures. During the beginning of the culturing, embryonic cultures are enriched with progenitor cells, as radial glial cells, whereas the newborn cultures contain mostly young astrocytes. Those in vitro data are consistent with in vivo radial glia–astrocyte transformation, which is characterized by, among other

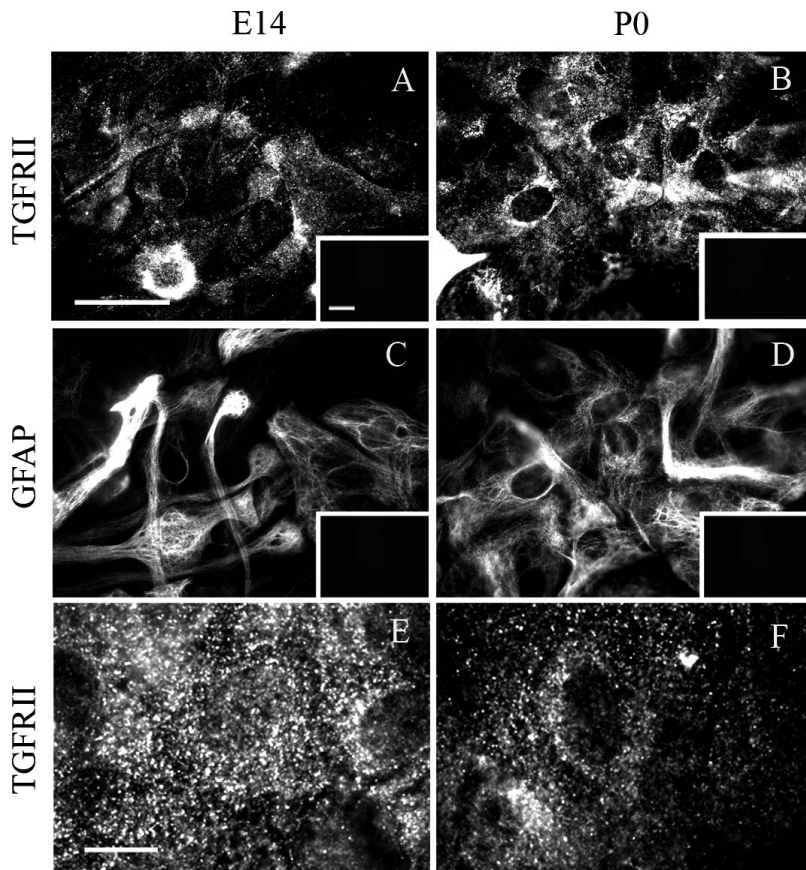


FIG. 1. Immunolocalization of transforming growth factor- $\beta$ 1 type II isoform (TGFRII) in embryonic and newborn astrocytes. Astrocytes derived from embryonic (E14) and newborn (P0) mice were cultured for 10 d and immunostained for (A, B, E, and F) TGFRII, and (C and D) glial fibrillary acidic protein (GFAP). Astrocyte cultures present punctual pattern of TGFRII expression spread throughout the cellular membrane. A higher magnification of another field is shown in Figs. E and F. Insets in A–D show negative controls for each situation. Scale bars: (A–D) 50  $\mu$ m; (E–F) 20  $\mu$ m.

things, by a replacement of the glial intermediate filament proteins from vimentin and nestin to GFAP (Dahl, 1981; Götz and Barde, 2005).

Previously, we reported that cortical neurons activate the GFAP gene promoter and induce astrocyte differentiation by inducing TGF- $\beta$ 1 secretion by the astrocytes (Gomes et al., 1999; de Sampaio e Spohr et al., 2002). The induction of GFAP expression was more effective in younger astrocytes, suggesting a developmental regulation of TGF- $\beta$ 1 responsiveness. Although embryonic astrocytes are more responsive to TGF- $\beta$ 1/neurons, we did not observe a significant difference in the TGFRII contents of embryonic or newborn astrocytes using a variety of techniques (immunocytochemistry, Western blot, and RT-PCR).

According to the current model, the TGF- $\beta$  type I receptor is required for type II receptor signaling, whereas the type II receptor is needed for binding of the type I receptor to its ligand, and both forms of receptors are indispensable for eliciting the biological responses of TGF- $\beta$  (Wrana et al., 1992, 1994; Attisano et al., 1993). In that respect, one would expect that both molecules would have a similar expression pattern. However, Tomoda et al. (1996) showed a disproportional expression of TGFRI and TGFRII in some tissues and suggested that this might have a physiological role in the local regulation of TGF- $\beta$  signals. That being the case, it would also be interesting to evaluate TGFRI expression in glial development. These data may suggest that other members of the TGF- $\beta$  pathway can be regulated, which then alters TGF- $\beta$ 1 signaling during de-

velopment. Further studies on the signaling pathways triggered by TGF- $\beta$  should provide helpful data on this mechanism.

TGF- $\beta$ 1 has been widely recognized as an injury-related cytokine, specifically associated with astrocyte scar formation in response to brain injury (Pratt and McPherson, 1997; Vivien and Ali 2006). Recently, however, increasing evidence has pointed to TGF- $\beta$ 1 as a putative key modulator in central nervous system (CNS) development (Brionne et al., 2003; Miller, 2003; Sousa et al., 2004; Gomes et al., 2005). Therefore, it would be useful to identify the types of cells that express TGF- $\beta$ 1 in pathological conditions as well as those during CNS development.

Although still a subject of discussion, TGF- $\beta$  receptor expression has been described in different regions of the brain and in different cell types (Böttner et al., 1996; Tomoda et al., 1996; Vivien et al., 1998; Galter et al., 1999; Morgan et al., 2000; Miller, 2003). In the present work, we demonstrate that astrocytes derived from embryonic mice express TGFRII *in vitro*. *In vivo*, the glial population from the embryonic cortex is mainly formed by radial glia cells, a population of multipotent precursor cells involved in neuronal migration during cortical development (Malatesta et al., 2000, 2003; Nadarajah et al., 2003; Anthony et al., 2004). Our data are supported by the previous identification of TGFRII in the hindbrain and the midbrain of E14 rats (Galter et al., 1999). More recently, the presence of TGFRII in the ventricular zone and radial fibers suggests that TGFRII is expressed in radial glia (Miller, 2003). The role of TGF- $\beta$  in glial progenitor differentiation has been previously

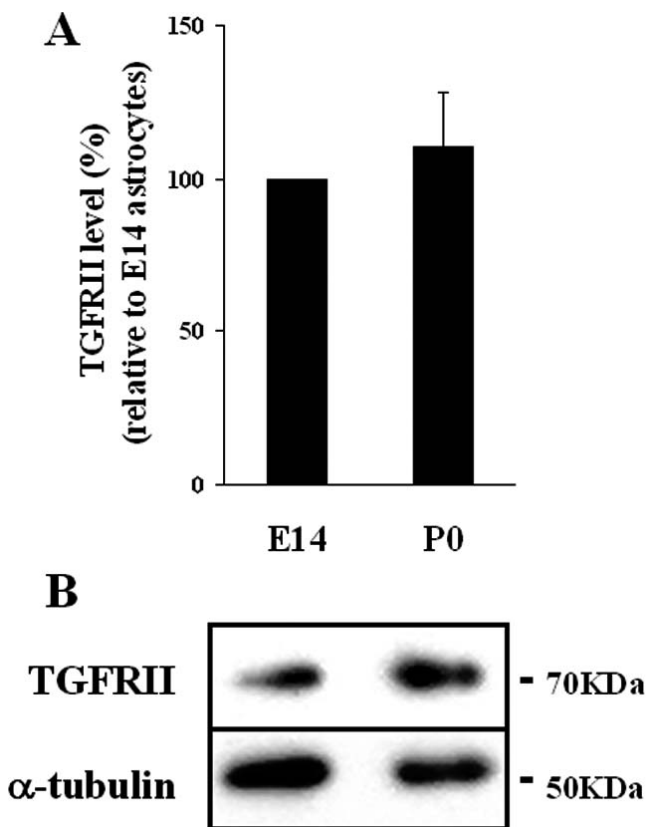


FIG. 2. Western blot analysis of transforming growth factor- $\beta$ 1 type II isoform (TGFR II) in primary cultured astrocytes. (A) Graphic analysis and (B) Western blot of three independent experiments showing TGFR II content. Astrocytes derived from embryonic (E14) and newborn (P0) mice were cultured for 10 d. Equal amounts (10  $\mu$ g) of cellular extract total proteins were resolved in 10% polyacrylamide gel and analyzed by immunoblotting for TGFR II. Immune reaction for  $\alpha$ -tubulin was used to monitor cellular protein loading. The levels of TGFR II protein immunoreactivity are expressed relative to the levels observed in E14 astrocytes. Similar levels of TGFR II content were detected in both embryonic and newborn astrocytes.

suggested by others who demonstrated that TGF- $\beta$  elicited the appearance of GFAP cells in serum-free mouse embryo cell cultures derived from 16-d-old embryo mice (Sakai et al., 1990). Together with our data, those data might point to radial glia cells as a potential target for TGF- $\beta$ 1 action during nervous system development.

Radial glia cells constitute a population of multipotent precursor cells involved in neuronal generation and migration in the cerebral cortex (Rakic et al., 1971; Noctor et al., 2001). After neuronal migration is completed, radial glia cells transform into astrocytes by a mechanism that is yet poorly understood (Culican et al., 1990). The transition from radial glia phenotype to astrocyte in the rodent CNS is characterized by several features such as loss of the bipolar morphology and the replacement of the intermediate filament proteins nestin and vimentin by the astrocyte differentiation marker GFAP (Dahl, 1981; Götz and Barde, 2005). Identification of TGFR II in the embryonic astrocytes reported here, together with our previous observation that TGF- $\beta$ 1 induces GFAP expression in embryonic astrocytes, might open new perspectives in understanding the role of TGF- $\beta$ 1 in radial glia-astrocyte transformation.

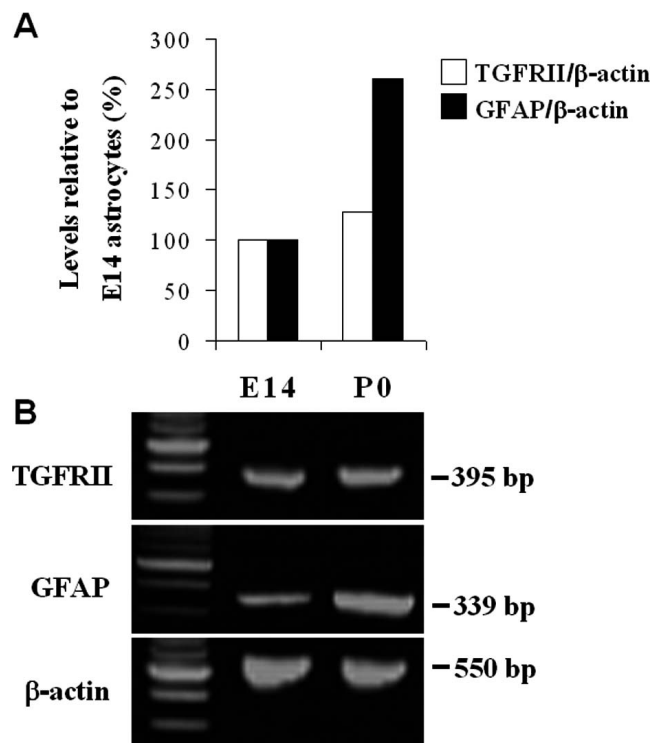


FIG. 3. Identification of transforming growth factor- $\beta$ 1 type II isoform (TGFR II) mRNA in cultured astrocytes. (A) Graphic analysis and (B) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) of TGFR II mRNA. Total RNA was extracted from embryonic (E14) and newborn (P0) mice astrocytes, reverse-transcribed, and amplified by PCR using specific primers for TGFR II, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and  $\beta$ -actin. Amplified products were size-fractionated by electrophoresis through a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The levels of mRNAs are expressed as a ratio between TGFR II and GFAP levels and  $\beta$ -actin levels. Similar levels of TGFR II mRNAs were detected in embryonic and newborn astrocytes, whereas GFAP mRNA levels were increased by 150% in the latter (P0) astrocytes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ismael Gomes and Adiel Batista do Nascimento for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT).

#### REFERENCES

- Abreu, J. G.; Ketpura, N. I.; Reversade, B.; De Robertis, E. M. Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cells signaling by BMP and TGF- $\beta$ . *Nat. Cell Biol.* 4:599-604; 2002.
- Anthony, T. E.; Klein, C.; Fishell, G.; Heintz, N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890; 2004.
- Attisano, L.; Carcamo, J.; Ventura, F.; Weis, F. M.; Massague, J.; Wrana, J. L. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 19:671-680; 1993.
- Böttner, M.; Kriegstein, K.; Unsicker, K. The transforming growth factor- $\beta$ s: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J. Neurochem.* 75:2227-2240; 2000.
- Böttner, M.; Unsicker, K.; Suter-Crazzolaro, C. Expression of TGF- $\beta$  type II receptor mRNA in the CNS. *Neuroreport* 7:2903-2907; 1996.

- Brionne, T. C.; Tesseur, I.; Masliah, E.; Wyss-Coray, T. Loss of TGF- $\beta$  1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* 40:1133–1145; 2003.
- Culican, S. M.; Baumrind, N. L.; Yamamoto, M.; Pearlman, A. L. Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J. Neurosci.* 10:684–692; 1990.
- Dahl, D. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J. Neurosci. Res.* 6:741–748; 1981.
- de Sampaio e Spohr, T.C.L.; Martinez, R.; Federowicz, E. S.; Moura-Neto, V.; Gomes, F.C.A. Neuron–glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor- $\beta$ 1. *Eur. J. Neurosci.* 16:2059–2069; 2002.
- Galter, D.; Bottner, M.; Unsicker, K. Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor- $\beta$ s. *J. Neurosci. Res.* 56:531–538; 1999.
- Gomes, F. C.; Sousa, V. de O.; Romao, L. Emerging roles for TGF- $\beta$ 1 in nervous system development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23:413–424; 2005.
- Gomes, F.C.A.; Garcia-Abreu, J.; Galou, M.; Paulin, D.; Moura Neto, V. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia* 26:97–108; 1999.
- Götz, M.; Barde, Y. A. Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46:369–372; 2005.
- Malatesta, P.; Hack, M. A.; Hartfuss, E.; Kettenmann, H.; Klinkert, W.; Kirchhoff, F.; Götz, M. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751–764; 2003.
- Malatesta, P.; Hartfuss, E.; Götz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253–5263; 2000.
- Martinez, R.; Gomes, F. C. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 277:49311–49318; 2002.
- Massagué, J. Receptors for the TGF- $\beta$  family. *Cell* 69:1067–1070; 1992.
- Massagué, J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753–791; 1998.
- Massagué, J. How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169–178; 2000.
- Massagué, J.; Chen, Y. G. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev.* 14:627–644; 2000.
- Miller, M. W. Expression of transforming growth factor- $\beta$  in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol. *J. Comp. Neurol.* 460:410–424; 2003.
- Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Sarkar, D. K.; Young-Chan, C. S.; Nichols, N. R.; Laping, N. J.; Finch, C. E. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces transforming growth factor- $\beta$ 1 and transforming growth factor- $\beta$  receptor messenger RNAs and reduces complement C1qB messenger RNA in rat brain microglia. *Neurosci.* 101:313–321; 2000.
- Nadarajah, B.; Alifragis, P.; Wong, R.O.L.; Parnavelas, J. G. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb. Cortex* 13:607–611; 2003.
- Noctor, S. C.; Flint, A. C.; Weissman, T. A.; Dammerman, R. S.; Kriegstein, A. R. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714–720; 2001.
- Pratt, B. M.; McPherson, J. M. TGF- $\beta$  in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:267–92; 1997.
- Rakic, P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 33:471–476; 1971.
- Sakai, Y.; Rawson, C.; Lindburg, K.; Barnes, D. Serum and transforming growth factor  $\beta$  regulate glial fibrillary acidic protein in serum-free-derived mouse embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8378–8382; 1990.
- Sousa, V. O.; Romão, L.; Moura Neto, V.; Gomes, F.C.A. Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor- $\beta$  1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur. J. Neurosci.* 19:1721–1730; 2004.
- Tomoda, T.; Shirasawa, T.; Yahagi, Y. I.; Ishii, K.; Takagi, H.; Furiya, Y.; Arai, K. I.; Mori, H.; Muramatsu, M. A. Transforming growth factor- $\beta$  is a survival factor for neonate cortical neurons: coincident expression of type I receptors in developing cerebral cortices. *Dev. Biol.* 179:79–90; 1996.
- Unsicker, K.; Kriegstein, K. TGF- $\beta$ s and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv. Exp. Med. Biol.* 513:353–374; 2002.
- Unsicker, K.; Strelau, J. Functions of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in the nervous system: cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. *Eur. J. Biochem.* 267:6972–6975; 2000.
- Vivien, D.; Ali, C. Transforming growth factor- $\beta$  signalling in brain disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:121–128; 2006.
- Vivien, D.; Bernaudin, M.; Buisson, A.; Divoux, D.; MacKenzie, E. T.; Nouvelot, A. Evidence of type I and type II transforming growth factor- $\beta$  receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 70:2296–2304; 1998.
- Wrana, J. L.; Attisano, L.; Wieser, R.; Ventura, F.; Massague, J. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 370:341–347; 1994.
- Wrana, J. L.; Carcamo, J., Attisano, L.; Cheifetz, S.; Zentella, A.; Lopez-Casillas, F.; Massague, J. The type II TGF- $\beta$  receptor signals diverse responses in cooperation with the type I receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 57:81–86; 1992.

**Anexo II**

----- Mensagem Original -----

-----  
Assunto: Comitê de Ética  
De: [ceua\\_ccs@biof.ufrj.br](mailto:ceua_ccs@biof.ufrj.br)  
Data: Seg, Março 3, 2008 3:39 pm  
Para: [fgomes@anato.ufrj.br](mailto:fgomes@anato.ufrj.br)  
-----

-----  
Prezada Professora;

O Comitê de Ética do CCS já possui o parecer de seu projeto de pesquisa que inclui a utilização de animais.

O número de seu protocolo aprovado é DHEICB 006

-----  
-----  
This message was sent using IMP, the Internet Messaging Program.

**Anexo III**



**Cristiane Monteiro Eller**  
Curriculum Vitae

Março/2009

# Cristiane Monteiro Eller

Curriculum Vitae

---

## Dados Pessoais

**Nome** Cristiane Monteiro Eller  
**Nome em citações bibliográficas** ELLER, C. M.  
**Sexo** feminino

**Filiação** Vilder Marcos Eller e Catia Maria Monteiro Eller  
**Nascimento** 11/06/1984 - Nova Friburgo/RJ - Brasil  
**Carteira de Identidade** 118927714 IFP - RJ - 08/03/1996  
**CPF** 05692947706

**Endereço residencial** Av Princesa Isabel, 134 ap 902  
Copacabana - Rio de Janeiro  
22011-010, RJ - Brasil  
Telefone: 21 36244846

**Endereço profissional** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Reitoria, Centro de Ciências da Saúde  
Rua: Brigadeiro Trompowski; Centro de ciências da saúde; Bloco F; Laboratório de neuro biologia celular sala F15  
Cidade universitária - Rio de Janeiro  
21949-590, RJ - Brasil  
Telefone: 21 25626460

URL da home page: [www.ufrj.br](http://www.ufrj.br)

### Endereço eletrônico

e-mail para contato : [celler@anato.ufrj.br](mailto:celler@anato.ufrj.br)

---

## Formação Acadêmica/Titulação

**2007** Mestrado em Ciências Morfológicas.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil  
Título: Efeito do fator de crescimento transformante beta I (TGF- $\beta$ 1) e do fator de crescimento da epiderme (EGF) sobre o desenvolvimento cerebelar  
Orientador: Flávia Carvalho Alcantara Gomes  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
*Palavras-chave: TGF- $\beta$ 1, cerebelo, EGF*

**2003 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil  
Título: EFEITO DOS FATORES DE CRESCIMENTO, TGF- $\beta$ 1 E EGF, NA MIGRAÇÃO NEURONAL CEREBELAR  
Orientador: Flávia Carvalho Alcantara Gomes  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

## Formação complementar

**2003 - 2003** Curso de curta duração em Biosemana.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

**2005 - 2005** Extensão universitária em Terapia celulares em doenças e lesões do sistema n.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

**2008 - 2008**

Curso de curta duração em Bases moleculares e celulares das doenças do sécul.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

#### Atividades

**01/2006 - Atual** Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biomédicas

*Participação em projetos:*

*Efeitos do fator de crescimento transformante beta I (TGF-b1) e do fator de crescimento da epiderme (EGF) sobre o desenvolvimento cerebelar*

**03/2004 - 12/2005** Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biomédicas

*Participação em projetos:*

*Estudo da expressão do receptor tipo II para TGF-beta1 (TGFRII) em astrócitos corticais*

---

#### Projetos

**2006 - Atual** Efeitos do fator de crescimento transformante beta I (TGF-b1) e do fator de crescimento da epiderme (EGF) sobre o desenvolvimento cerebelar

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Cristiane Monteiro EllerFlávia Carvalho Alcântara Gomes (Responsável); rodrigo Martinez

Financiador(es):

**2004 - 2005** Estudo da expressão do receptor tipo II para TGF-beta1 (TGFRII) em astrócitos corticais

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Cristiane Monteiro EllerFlávia Carvalho Alcântara Gomes (Responsável); Vivan Oliveira Sousa; Juliana de Carvalho Almeida

Financiador(es):

---

#### Áreas de atuação

1. Citologia e Biologia Celular
2. Histologia
3. Genética Humana e Médica

---

#### Idiomas

**Alemão** Compreende Pouco , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Pouco

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

## Prêmios e títulos

2008 Menção Honrosa NeuroLatAm, Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

## Produção em C, T & A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. SOUSA, V.O., ELLER, C. M., ALMEIDA, J. C., GOMES, F.C.A.  
Characterization of TGF-beta1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes.. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal. , v.42, p.171 - 175, 2006.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ELLER, C. M., MARTINEZ, R., GOMES, F. C. A.  
Efeito do fator de crescimento transformante beta1 e do fator de crescimento epidermal, na migração neuronal cerebelar e morfologia da glia de Bergmann. In: I congresso IBRO/LARC de neurociências da américa latina, Caribe e Península Ibérica-Neurolatam, 2008

**II congresso BRO/LARC de neurociências da américa latina, Caribe e Península Ibérica. , 2008.**

*Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Outro*

2. ELLER, C. M., MARTINEZ, R., GOMES, F.C.A.  
Efeito dos fatores de crescimento, TGF-β1 e EGF, na migração neuronal cerebelar in vitro. In: Federação de Sociedades de Biologia Experiment-FeSBE, 2007

**XXII Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experiment. , 2007.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

3. ELLER, C. M., MARTINEZ, R., GOMES, F.C.A.  
Astrócitos cerebelares modulam o efeito do hormônio da tireoide sobre a migração neuronal e do desenvolvimento da glia de Bergmann In: Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural, 2006, Rio de Janeiro, RJ.

**XXVIII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural. , 2006.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

4. ELLER, C. M., SANTIAGO, M. F., GOMES, F.C.A.  
Efeito do TGF-beta I na migração cerebelar In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia, SP.

**XXI Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2006.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

5. ELLER, C. M., SOUSA, V.O., ALMEIDA, J. C., GOMES, F.C.A.  
Expressão do receptor tipo II para TGF-beta I TGFRII em astrócitos corticais in vitro: análise por RT-PCR In: Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural, 2005, Rio de Janeiro, RJ.

**XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural. , 2005.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

6. SOUSA, V.O., ALMEIDA, J. C., ELLER, C. M., GOMES, F.C.A.  
Padrão de expressão do receptor tipo II TGFRII em astrócitos de cortex cerebral ao longo do desenvolvimento In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia, SP.

**XX Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2005.**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

## Eventos

### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica-Neurolatan**, 2008. (Congresso)  
Efeito do fator de crescimento transformante beta1 e do fator de crescimento epidermal, na migração neuronal cerebelar e morfologia da glia de Bergmann..
2. **Symposium on development & Plasticity of the nervous system**, 2008. (Simpósio)  
.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE**, 2007. (Congresso)  
Efeito do hormônio da tireóide na migração neuronal cerebelar é mediado pelas vias de sinalização de EGF e MAPK: estudos in vivo e in vitro.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE**, 2007. (Congresso)  
Efeito do hormônio da tireóide na migração neuronal cerebelar é mediado pelas vias de sinalização de EGF e MAPK: estudos in vivo e in vitro.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE**, 2007. (Congresso)  
Efeito dos fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 1 e EGF, na migração neuronal cerebelar in vitro..
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE**, 2006. (Congresso)  
Efeito do TGF- beta I na migração cerebelar.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Federação de sociedades de biologia experimentais -FeSBE**, 2005. (Congresso)  
Padão de expressão do receptor tipo II para TGF-beta I (TGFRII) em astrócitos de córtex cerebral ao longo do desenvolvimento.
8. **I Encontro Brasileiro sobre células-tronco embrionárias humanas**, 2005. (Encontro)  
.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Jornada de embriologia**, 2003. (Encontro)  
Síndrome alcoólica fetal.
10. **Semana da Biologia**, 2003. (Outra)  
.

---

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

|   |   |
|---|---|
| Artigos completos publicado em periódico..... | 1 |
| Trabalhos publicados em anais de eventos..... | 6 |

### Eventos

|   |   |
|---|---|
| Participações em eventos (congresso)..... | 6 |
| Participações em eventos (simpósio).....  | 1 |
| Participações em eventos (encontro).....  | 2 |
| Participações em eventos (outra).....     | 1 |



# 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](#)