



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Marcella Braga da Costa Reis

**O IMUNOBLOQUEIO CRÔNICO DO
GANGLIOSÍDEO 9-O-ACETIL GD3 *IN VIVO*
INFLUENCIA A MIGRAÇÃO NEURONAL NO
CEREBELO EM DESENVOLVIMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Marcella Braga da Costa Reis

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

O imunobloqueio crônico do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 *in vivo*
influencia a migração neuronal no cerebelo em desenvolvimento

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como um dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientadores: Rosalia Mendez Otero
Marcelo Felipe Santiago

Rio de Janeiro
2008

Ficha Catalográfica

Reis, Marcella Braga da Costa

O imunobloqueio crônico do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 *in vivo* influencia a migração neuronal no cerebelo em desenvolvimento

xiv, 93 f

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica)

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, 2008.

Orientadores: Rosalia Mendez Otero e Marcelo Felipe Santiago

1. 9-O-acetil GD3 2. Migração neuronal
3. Cerebelo 4. Desenvolvimento

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Esta dissertação de mestrado foi realizada no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof^a. Rosalia Mendez Otero e do Prof^o. Marcelo Felipe Santiago e sob a vigência de auxílios concedidos pelo Cnpq, CAPES e FAPERJ.

Marcella Braga da Costa Reis

O imunobloqueio crônico do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 *in vivo*
influencia a migração neuronal no cerebelo em desenvolvimento

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como um dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Aprovada em: 17/10/2008

Cecília Hedin Pereira (Revisor)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) – UFRJ

Alfred Sholl Franco

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) – UFRJ

Flávia Carvalho Alcantara Gomes

Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – UFRJ

Daniela Uziel Rozental

Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – UFRJ

Rosalía Mendez Otero (Orientadora)

Marcelo Felipe Santiago (Orientador)

Dedico esta tese aos meus pais Rosângela Braga da Costa, Luiz Henrique da Costa Amaral e Clodoaldo Acyr Reis pelo amor, carinho e confiança dedicados a mim durante todo o período em que estiveram comigo.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por mais uma etapa concretizada na minha vida. É a ele que se deve toda beleza que encontrei na biologia e, por sua vontade, meus sonhos vêm se tornando realidade.

Agradeço aos meus pais Rosângela Braga da Costa, Luiz Henrique da Costa Amaral e Clodoaldo Acyr Reis, por todo suporte financeiro, emocional e por acreditarem em mim em todos os momentos. A eles devo ser quem sou. Agradeço as caronas, a paciência, a compreensão pela ausência, as orações e as palavras de conforto.

Agradeço também a minha irmã Amanda, sempre carinhosa distribuindo beijos e abraços e contando histórias engraçadas nos momentos difíceis tornando-os sempre mais divertidos.

Agradeço aos meus avós Beny Braga da Costa, Adalberto Goullart da Costa, Zoraide Rocha Paladino e Atílio Leonardo Paladino (*in memoriam*) pelo carinho e amor sem tamanho. Esses são pessoas muitíssimo especiais nos quais me espelho e me orgulho infinitamente.

Aos meus tios e primos Eduardo, Denise, Larissa, Luana e Eduardinho pela amizade, força e apoio fundamentais para minha caminhada.

Às minhas amigas Michelle e Nathália sempre ao meu lado, cada uma ao seu jeito, ambas especialíssimas e muito importantes nas horas livres e nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Maurício Rocha de Magalhães Sampaio pelo apoio incondicional, opiniões imparciais, pela compreensão com minha ausência, pelo amor e pelo carinho que me foram concedidos.

A todo o grupo de pesquisadores do Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular que sempre me ajudaram auxiliando na execução dos experimentos entre outros.

Agradeço a Karen por ter sido meu braço direito e minha companhia, principalmente na reta final dessa caminhada.

Agradeço a Jasmin pela amizade e confiança depositadas, muito importantes para o equilíbrio emocional nos momentos difíceis.

Agradeço a Ísis pela paciência e pelo empenho em ajudar de alguma forma que nunca me faltou.

Agradeço ao Marcelo como orientador dedicado e amigo que se tornou durante minha passagem pelo laboratório.

Enfim, agradeço a Rosalia por ter me dado o voto de confiança como pesquisadora e facilitado toda a parte financeira para realização do meu trabalho.

Resumo

A expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 é correlacionada à extensão neurítica e migração celular na retina, colículo superior, cerebelo e para os bulbos olfatórios. Nosso grupo demonstrou que o imunobloqueio do 9-O-acetil GD3 inibe a migração de células granulares do cerebelo *in vivo* e *in vitro*. Além disso, demonstramos que esse gangliosídeo co-localiza com a proteína Integrina $\beta 1$ presente em pontos de adesão focal. Neste trabalho avaliamos se o imunobloqueio prolongado do 9-O-acetil GD3 *in vivo* influencia na migração neuronal no cerebelo de ratos em desenvolvimento. Além disso, avaliamos se o 9-O-acetil GD3 estaria envolvido no fenômeno de adesão celular. Com este fim, ratos com 7 dias pós-natal (P7) receberam injeções de 20 μ l de mAb Jones, IgM que reconhece especificamente o gangliosídeo 9-O-acetil GD3; de mAb A2B5, IgM que reconhece gangliosídeos da série-c; ou de solução salina, durante 7 dias consecutivos com intervalo de 12h e foram realizadas análises morfométricas. Para testar o possível papel do gangliosídeo em mediar adesão celular, realizamos culturas de células dissociadas previamente incubadas com CD60b, A2B5 ou meio sem adição de anticorpos e contamos o número de células aderidas por área. Nos animais imunobloqueados com mAb Jones nós observamos, por imunohistoquímica *in vivo*, marcação nas células do cerebelo, indicando que o anticorpo injetado chegou ao cerebelo. Estes ratos exibiram retenção de células granulares na camada granular externa além de um aumento na proporção de células com perfil estacionário e diminuição na proporção de células com perfil migratório na camada molecular em relação aos animais controle. Estes resultados indicam que o imunobloqueio prolongado do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 influencia a migração neuronal a partir da EGL. No entanto, a IGL não se encontra alterada em relação à densidade celular e espessura. Na cultura de células foi observado um decréscimo de cerca de 60% nas células aderidas no grupo em que as células foram previamente incubadas com Jones. Estes resultados em conjunto sugerem que o 9-O-acetil GD3 esteja envolvido na migração neuronal através da modulação do papel da laminina na adesão celular do cerebelo em desenvolvimento.

Abstract

The 9-O-acetyl GD3 expression is correlated with neurite extension and cellular migration in retina, superior colliculus, cerebellum and to the olfactory bulbs. We have already demonstrated that the 9-O-acetyl GD3 immunoblockage arrests cerebellar granular cell migration *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, we also demonstrated that the 9-O-acetyl GD3 co-localizes with $\beta 1$ integrin, involved in focal adhesion points. In present work, we analyzed if *in vivo* chronic immunoblockage of 9-O-acetyl GD3 interferes with neuronal migration in the rat developing cerebellum. We also evaluated if the 9-O-acetyl GD3 is involved in the cellular adhesion. For that, 7 days postnatal rats were received injections of 20 μ l of mAb Jones (IgM that recognizes 9-O-acetyl GD3 specifically), of mAb A2B5 (IgM that recognizes c-pathway gangliosides), or saline solution during 7 consecutive days at 12h intervals and morphometric analyses were performed. To test a possible role for ganglioside 9-O-acetyl GD3 mediating cellular adhesion, we cultured dissociated neurons, previously incubated with CD60b, A2B5 or control medium. We, then, quantified the number of cells adhered per area in each condition. In the animals that were injected with mAb Jones we observed, by *in vivo* immunohistochemistry, cerebellar labeled cells showing that the antibody had reached the cerebellum. These rats exhibited granular cell retention in the external granular layer and an increase in the proportion of stationary cell profiles in the molecular layer with a consequent decrease in the proportion of migratory cell profiles. These results suggest that the chronic immunoblockage of 9-O-acetyl GD3 interferes in the migration of granular neurons in the cerebellum. We also observed a decrease of about 60% in the adhered cell number in the experimental group that had been previously incubated with Jones. This result suggests that the 9-O-acetyl GD3 is involved on neuronal migration by the modulation of cellular adhesion to laminin.

Abreviações

ApoER2- Receptor de apolipoproteína E tipo 2, do inglês, *apolipoprotein E receptor type 2*.

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*.

BLBP- Proteína ligante de lipídeo do cérebro, do inglês, *brain lipid-binding protein*.

DCN- Núcleos profundos cerebelares, do inglês, *deep cerebellar nuclei*.

DCX- Doublecortina.

EGF- Fator de crescimento epidermal, do inglês, *epidermal growth factor*.

EGL- Camada granular externa, do inglês, *external granular layer*.

GFAP- Proteína acídica fibrilar glial, do inglês, *glial fibrillary acidic protein*.

GGF- Fator de crescimento glial, do inglês, *glial growth factor*.

IFAP- Proteína associada a filamento intermediário, do inglês, *intermediate filament associated protein*

IFP- . Proteína de filamento intermediário, do inglês, *intermediate filament protein*

IGL- Camada granular interna, do inglês, *internal granular layer*.

IZ- Zona intermediária, do inglês, *intermediate zone*.

mDab1- Camundongo incapacitado 1, do inglês, *mouse disabled 1*.

MEC- Matriz extracelular.

ML- Camada molecular, do inglês, *molecular layer*.

NGS- Soro normal de cabra, do inglês, *normal goat serum*.

NMDA- N-metil-D-aspartato.

PL- Prolongamento líder.

PPD- Fenil fosforodiamidato, do inglês, *phenyl phosphorodiamidate*.

r1- Rombômero 1.

RC2- Célula radial 2, do inglês, *radial cell 2*.

SDF1- Fator derivado de células estromais - 1, do inglês, *stromal cell-derived factor-1*

SNC- Sistema nervoso central.

SB- Substância Branca

SP- Subplaca, do inglês, *subplate*.

SVZ- Zona subventricular, do inglês, *subventricular zone*.

TLC- Cromatografia de camada fina, do inglês, *thin layer chromatography*.

VLDLR- Receptor de lipoproteína de densidade muito baixa, do inglês, “very low density lipoprotein receptor”

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Cerebelo	1
1.1.1. Anatomia	1
1.1.2. Histologia	3
1.1.3. A ontogênese cerebelar	7
1.1.4. Aspectos citológicos na migração radial durante a formação da IGL	9
1.1.5. Mecanismos moleculares da migração de células granulares do cerebelo	15
1.2. O gangliosídeo 9-O-acetil GD3	21
2. OBJETIVOS	26
2.1. Geral	26
2.2. Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Imunobloqueio <i>in vivo</i>	27
3.2. Perfusão	27
3.3. Processamento do tecido	28
3.4. Coloração cresil violeta	29
3.5. Cultura de células	30
3.6. Imunohistoquímica	31
3.6.1. Imunomarcacão com anti-Ki67	32
3.7. Aquisição de imagens	33
3.8. Quantificação e análise estatística	33
4. RESULTADOS	36
4.1. Jones injetado via intracerebroventricular alcança o cerebelo e marca diferentes tipos celulares	36
4.2. O imunobloqueio com mAb Jones não interfere na espessura da EGL, mas sim na densidade celular dessa camada	36
4.3. Não há alteração na proliferação celular da EGL de ratos que sofreram imunobloqueio crônico com mAb Jones	43
4.4. Não há diferença significativa na espessura da camada molecular entre ratos que receberam mAb Jones e ratos que receberam solução salina	48

4.5. Ratos imunobloqueados cronicamente possuem maior proporção de células com perfil estacionário e menor proporção de células com perfil migratório na camada molecular	48
4.6. Não há diferença significativa na espessura, área e densidade da camada granular interna entre ratos que receberam mAb Jones e ratos que receberam solução salina	54
4.7. Não há diferença significativa na área ocupada pela substância branca entre ratos imunobloqueados cronicamente com mAb Jones e ratos que receberam solução salina	54
4.8. Não há alteração no número de fibras gliais entre ratos que receberam mAb Jones e ratos que receberam solução salina	60
4.9. A expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células de Purkinje	60
4.10. O anticorpo anti-CD60b interfere na adesão de neurônios granulares à laminina <i>in vitro</i>	68
5. DISCUSSÃO	73
5.1. Análise morfométrica	73
5.2. A expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células de Purkinje	80
5.3. Ensaio de adesão celular	80
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. Introdução:

1.1. O Cerebelo:

O cerebelo está envolvido na regulação do movimento e da postura, cumprida a partir de ajustes nos impulsos eferentes nas principais vias motoras descendentes do cérebro. Desta forma, o cerebelo recebe informações a respeito de planos de movimento das estruturas envolvidas e, ao mesmo tempo, do desempenho motor a partir do “feedback” que surge da periferia durante o movimento. Assim, através da comparação entre essas informações o cerebelo realiza os ajustes necessários para obtenção do movimento refinado (Bear, 2001).

Inúmeras outras funções, além do controle motor, têm sido atribuídas ao cerebelo e postula-se um papel desta estrutura em processamento cognitivo e emocional (para revisão, Glisckstein, 2007).

1.1.1. Anatomia:

Localizado no interior da caixa craniana, em sua fossa posterior, o cerebelo é um órgão interposto entre o tronco cerebral e os lobos occipitais do cérebro e separado dessas estruturas pelo quarto ventrículo e pela tenda cerebelar, respectivamente (**Figura 1A**) (Gray & Goss, 1988).

O cerebelo é facilmente reconhecido entre os outros componentes encefálicos por sua morfologia única, organizada por um elaborado grupo de folhas dispostas em seqüência ântero-posteriores, separadas entre si por fissuras, ou sulcos horizontais (**Figura 1C**) (Bradley, 1899; 1904; Smith, 1902; Larsell, 1952; Sudarov, 2007).

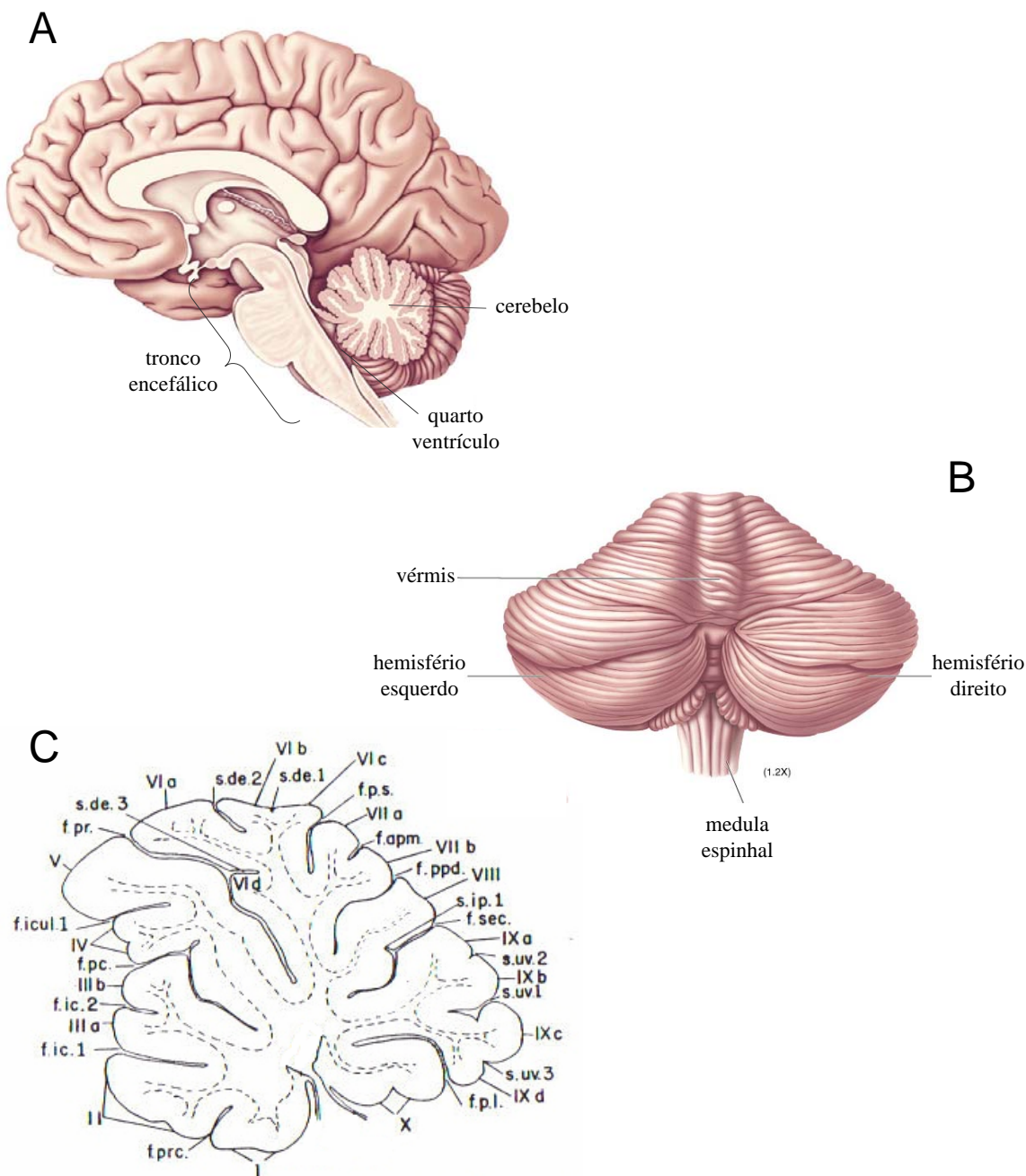


Figura 1. Vistas anatômicas de cerebelo humano e de rato. (A) Imagem representando um corte parasagital de encéfalo humano revelando a localização cerebelar em relação às demais estruturas do encéfalo (adaptado de Bear, 2001). (B) Vista dorsal de cerebelo humano indicando o vérmis e os hemisférios cerebelares (adaptado de Bear, 2001). (C) Esquema representando corte sagital cerebelar de rato indicando suas folhas, sulcos e fissuras. Números romanos acompanhados, ou não, de letras minúsculas representam a identificação das folhas ou lóbulos cerebelares; *f.prc.*, fissura pré-central; *f.ic.1*, fissura intracentral 1; *f.ic.2*, fissura intracentral 2; *f.pc.*, fissura pré-culminar; *f.icul.*, fissura intraculminar; *f.pr.*, fissura prima; *s.de.3*, sulco declivar 3; *s.de.2*, sulco declivar 2; *s.de.1*, sulco declivar 1; *f.p.s.*, fissura superior posterior; *f.apm.*, fissura ansoparamediana; *f.ppd.*, fissura pré-piramidal; *s.ip.1*, sulco intrapiramidal 1; *f.sec.*, fissura secunda; *s.uv.2*, sulco uvular 2; *s.uv.1*, sulco uvular 1; *s.uv.3*, sulco uvular 3; *f.p.l.*, fissura póstero-lateral (adaptado de Larsell, 1952).

Diferente do cérebro, o cerebelo não é tão explicitamente dividido bilateralmente. Suas folhas, ou lóbulos se estendem ininterruptamente, de um lado ao outro, porém na linha média, pode-se distinguir uma protuberância, que atravessa verticalmente toda a sua espessura, nomeada vérmis. Este é uma estrutura ímpar que separa os dois hemisférios cerebelares laterais (**Figura 1B**) (Bear e cols, 2001).

A organização dessas estruturas já foi estudada por diversos pesquisadores, na tentativa de uma melhor identificação de cada lóbulo, de acordo com sua disposição e período ontogênico em que fosse possível reconhecê-los (Bradley, 1899; 1904; Smith,1902; Larsell, 1952; Glickstein & Voogt, 1995)

Hoje em dia a organização mais aceita foi elaborada por Larsell, em 1952, que reconheceu no cerebelo dez lóbulos, ou folhas, que variam em complexidade de acordo com a espécie (**Figura 1C**) (Larsell, 1935; 1947; 1948; 1952; Corrales e cols., 2006).

1.1.2. Histologia:

O cerebelo adulto possui 5 tipos neuronais tradicionais distribuídos em três camadas corticais, já descritos por Ramón e Cajal em 1911 (Ramón y Cajal 1911 apud Altman, 1966; Rakic, 1971).

A camada molecular (ML, do inglês, *molecular layer*) representa a camada mais externa, composta principalmente por axônios das células granulares (fibras paralelas), dendritos das células de Purkinje e por feixes de fibras aferentes cerebelares, nomeadas fibras trepadeiras (**Figura 2**). Estas partem de corpos celulares localizados na oliva inferior e fazem sinapses com soma e dendritos de Purkinje. Apesar da nomenclatura, a ML não é composta apenas de fibras. Nela também são encontrados alguns poucos interneurônios típicos, os interneurônios estrelados e os em cesto (Granit & Phillips, 1956; Altman, 1972a; Mason, 1987; Mason e cols., 1990).

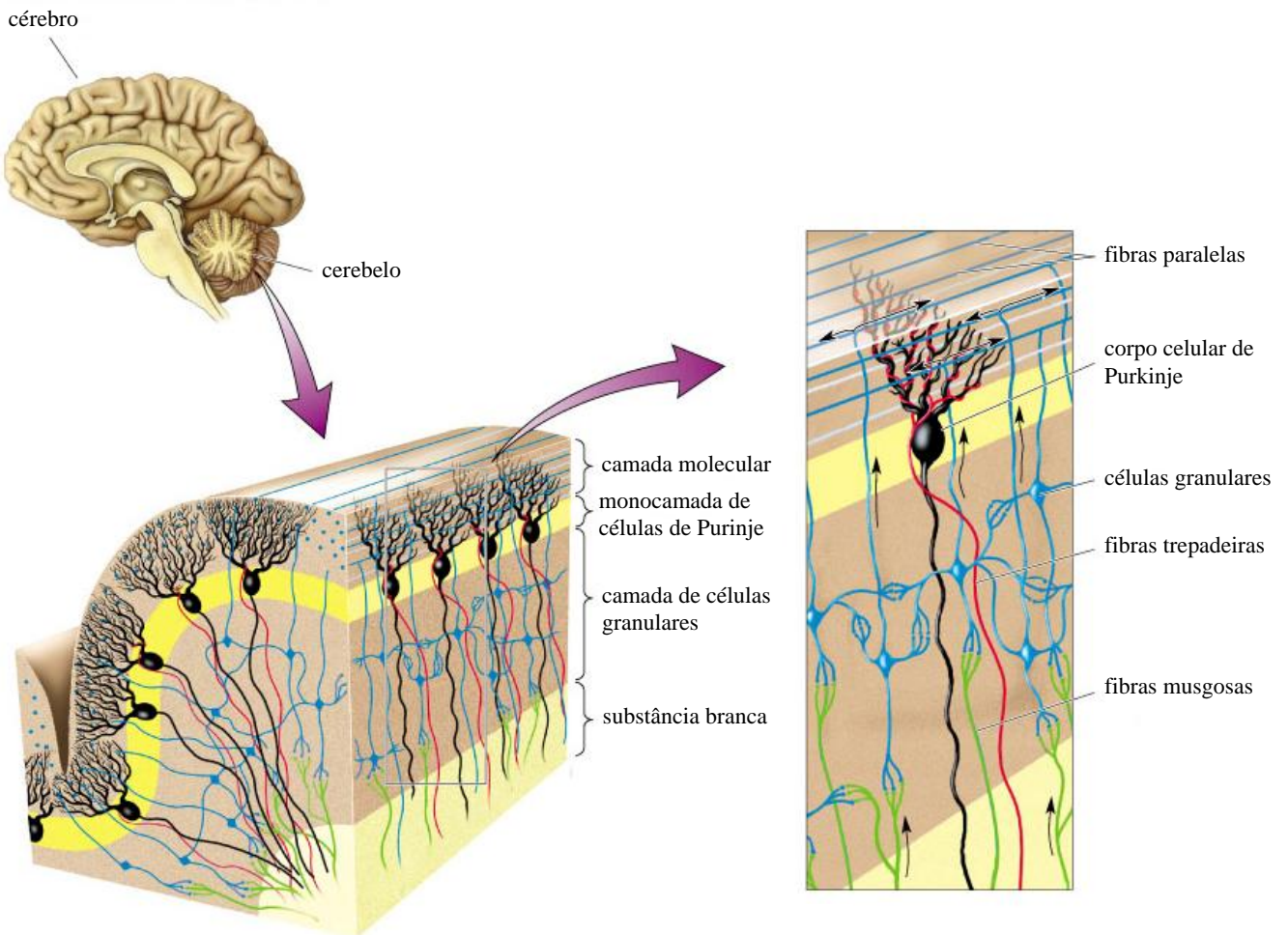


Figura 2: O cerebelo é uma estrutura laminar. Organização da camada de células granulares, camada de células de Purkinje e camada molecular. O retângulo é um esquema similar em maiores detalhes, possibilitando-nos observar as conexões entre as células de Purkinje e as fibras paralelas. Nesta figura também podemos observar as fibras trepadeiras, eferentes da oliva inferior, as células granulares, e as principais fibras que as inervam: as fibras musgosas eferentes de núcleos do tronco encefálico (adaptado de Bear, 2001).

A camada subsequente é composta por corpos celulares de Purkinje dispostos lado a lado em uma única faixa. Os axônios desses neurônios fazem sinapses com neurônios dos núcleos profundos do cerebelo e constituem parte da via eferente cerebelar. Seus dendritos invadem a camada molecular onde se ramificam em leque, achatados ortogonalmente à folha. Essas células são inervadas por fibras paralelas, por axônios de células estreladas e em cesto e por aferentes olivares (**Figura 2**) (Granit & Phillips, 1956; Altman, 1972a; Laxson & King, 1983). Posteriormente, foi demonstrada, em um modelo de cultura com fatias cerebelares, a emissão de ramos colaterais de axônios de Purkinje que retornam em direção a ML, percorrem centenas de micrômetros paralelamente a pia, e estabelecem sinapses com dendritos de células de Golgi e somas de células em cesto (Jaeger, 1988).

A camada cortical mais interna é composta em sua minoria por neurônios de Golgi e, em sua maioria, por células granulares, por esse motivo nomeada camada granular interna (IGL, do inglês, *internal granular layer*). As células granulares são muito pequenas (6-8 μ m), porém muito numerosas (80-85% do total de neurônios em humanos). Possui forma arredondada e dendritos curtos. Seus axônios tendem-se em direção à pia, bifurcando-se na ML em ramos horizontais com sentidos opostos (fibras paralelas) que, como esclarecido anteriormente, fazem sinapses com inúmeras células de Purkinje e, ocasionalmente, com somas de células estreladas e em cesto (**Figura 2**).

Na IGL, também é encontrado outro grupo de fibras aferentes cerebelares: as fibras musgosas. Estas partem de corpos celulares localizados na medula espinhal, núcleos vestibulares, pontinos ou na formação reticular e são conhecidas por estabelecerem sinapses com as células granulares, porém também se conectam às células de Golgi (**Figura 2**) (Granit & Phillips, 1956; Altman, 1966; 1972b; Rakic, 1971; Lange, 1975; Mason, 1987; Jaeger e cols., 1988).

Um sexto tipo neuronal menos estudado pela carência de informação sobre suas características fisiológicas são as células de Lugaro. Estas são interneurônios fusiformes localizados entre as células de Purkinje. Seus axônios são arborizam profusamente a camada molecular com emissão de alguns ramos colaterais para a camada granular interna e fazem sinapses com somas e dendritos proximais das células estreladas e em cesto (Lainé & Axelrad, 1994; 1998).

Posteriormente foram descritos mais dois tipos neuronais do córtex cerebelar: células em candelabro e em escova.

As células em candelabro são distribuídas uniformemente entre as células de Purkinje. Possuem o soma relativamente pequeno, piriforme e orientado verticalmente. Um ou dois dendritos, cobertos por espinhas distribuídas irregularmente, se estendem até a ML se dividindo em poucas ramificações que alcançam a pia. Alguns dendritos mais finos emergem da parte inferior do corpo celular, ou de algum tronco proximal de um dendrito molecular e se estendem por uma curta distância da IGL mais superficial. Seus axônios recobrem a camada de Purkinje horizontalmente com algumas ramificações verticais que ascendem em regiões específicas da ML (Lainé & Axelrad, 1994).

As células em escova estão presentes em maior densidade nas folhas I, IX e X, que são regiões de maior quantidade de aferências vestibulo-cerebelares. Esse tipo celular é ausente nos hemisférios cerebelares. Possuem tamanho intermediário entre as células granulares e os neurônios de Golgi. Apresentam um axônio fino e um único dendrito espesso e curto que recebe sinapses das fibras musgosas vestibulares e parecem enviar axônios para estes núcleos (Mugnaini & Floris, 1994).

Além da região cortical, existem também aglomerados neuronais cerebelares imersos em regiões de substância branca. Esses são os núcleos profundos cerebelares (DCN, do inglês, *deep cerebellar nuclei*) e também recebem aferências olivares além de receberem conexões

das células de Purkinje. Axônios dos núcleos profundos juntamente com axônios das células de Purkinje constituem a principal via eferente cerebelar. (Groenewegen & Voogd, 1977; Voogd & Ruigrok, 2004; Sugihara & Shinoda, 2007).

Para que haja organização da citoarquitetura do cerebelo, assim como de todo o sistema nervoso central (SNC), a migração neuronal é um processo fundamental. Essa etapa do desenvolvimento é responsável pela distribuição precisa dos neurônios que partem das zonas germinativas para suas camadas específicas sendo, por isso, rigorosamente regulada durante a ontogênese do sistema nervoso (Rakic, 1988; 1990).

A perturbação na migração neuronal causa anomalias no tamanho encefálico, na formação dos giros cerebrais e folhas cerebelares, determinando mudanças corticais histopatológicas (Caviness & Rakic, 1978; Anton e cols., 1999; Dulabon e cols., 2000; Graus-Porta e cols., 2001).

1.1.3. A ontogênese cerebelar:

As classes de células cerebelares são originadas em diferentes períodos e localidades e eventualmente ocupam um território comum. Essas diferenças permitem estudar a ontogênese de cada tipo celular separadamente (Rakic, 1971).

O desenvolvimento cerebelar se inicia no período embrionário a partir do neuroepitélio do 4º ventrículo, na fração dorsal do rombômero 1 (r1), de onde se originam várias classes de precursores neuronais. Entre elas já foram identificados precursores de células de Purkinje, de células de Golgi, células em cesto, estreladas e de uma subpopulação de neurônios dos DCN. Todos esses grupos celulares partem da zona ventricular em ondas migratórias radiais que, por vezes, se sobrepõem, iniciando entre os dias embrionários 10,5 e 11,5 (E10,5 e E11,5) em ratos e camundongos, animais nos quais baseamos as idades do desenvolvimento aqui descritas (Altman & Bayer, 1978).

O lábio rômbo é uma outra zona germinativa que se localiza no neuroectoderma mais dorsal do r1 e compreende o espaço entre a placa do assoalho e o 4º ventrículo. Os progenitores neuronais são gerados nessa zona em torno de E13 e dão origem aos grandes neurônios do DCN, às células em escova e às células granulares cerebelares. Estas populações se locomovem utilizando como eixo migratório neurônios vizinhos (migração neuronofílica) em um tipo de migração caracterizada como superficial e tangencial à pia.

Este subtipo de migração neuronal (tangencial) se caracteriza por precursores neurais migrando paralelamente à superfície pial, individualmente, em associação com outros neurônios, ou aderidos a axônios em desenvolvimento (de Carlos e cols., 1996; Tamamaki e cols., 1997; de Diego e cols., 2002; Hatten, 1999).

No cerebelo de ratos e camundongos, o processo de maturação das células que partem do lábio rômbo ocorre em ondas migratórias e períodos cronológicos distintos para os diferentes tipos celulares. Em E22, a diferenciação dos neurônios do DCN já é avançada, porém os neurônios corticais gerados no período embrionário não se diferenciam até o período pós-natal.

Essa diferenciação só acontece após o início da maturação dos precursores granulares. Estes, após migrarem tangencialmente, adjacentes a pia, forrando toda a superfície cerebelar em torno de E15, formam uma nova zona germinativa ou zona germinativa secundária, que permanece mitoticamente ativa até, aproximadamente, duas semanas após o nascimento, nomeada camada granular externa (EGL, “*external granular layer*”) (Altman & Bayer, 1978; Corrales e cols., 2004; Wingate, 2005; Chizhikov, 2005; Englund e cols., 2006; Fink e cols., 2006).

O padrão de migração estudado nesse trabalho é baseado nas células da EGL que, após passarem por divisões subsequentes no local onde se encontram, dão origem a precursores granulares pós-mitóticos. Estes se adaptam citologicamente e se locomovem radialmente

guiadas por fibras gliais para o interior do córtex cerebelar, organizando-se internamente à camada de células de Purkinje, originando a IGL (**Figura 3**) (Altman, 1966; Rakic, 1971; Corrales e cols., 2004).

A célula glial que serve de suporte para a migração neuronal é chamada glia radial (Rakic, 1971; 1972; Hatten et al, 1984; Campbell, 2003).

A locomoção neuronal guiada por glia, é um mecanismo complexo do desenvolvimento que envolve uma série de passos, tais como, o reconhecimento célula-célula; adesão celular entre o neurônio e a glia mediada pela matriz extracelular (MEC) que os cerca; a mobilidade celular ao longo de fibras da glia e, finalmente, a separação dos neurônios das fibras gliais uma vez alcançado seu destino (**Figura 4 e 5**) (Rakic, 1971, 1972).

1.1.4. Aspectos citológicos na migração radial durante a formação da IGL:

O processo de formação da IGL a partir da migração radial de células pós-mitóticas da EGL, ocorre nas primeiras três semanas pós-natais em camundongos. Este fato juntamente a pouca variedade celular e a grande quantidade de neurônios granulares faz do cerebelo um ótimo modelo para estudo de migração radial (Altman, 1966; Rakic, 1971).

Dentro do período de formação da IGL, que varia entre as espécies, podemos encontrar células de um único indivíduo em diferentes estágios de diferenciação.

A EGL, por exemplo, pode ser subdividida em porções superficial e profunda e essa distinção é claramente observada através da forma, orientação e volume citoplasmático celular (Rakic, 1971; Komuro e cols., 2001).

Desse modo, na porção mais superficial da EGL as células se encontram mitoticamente ativas. Possuem forma arredondada e, apenas ocasionalmente, apresentam uma protuberância citoplasmática. Essas células possuem o núcleo eletrondenso com vários aglomerados de cromatina e uma pequena espessura citoplasmática, escassa em organelas (**Figura 5A**).

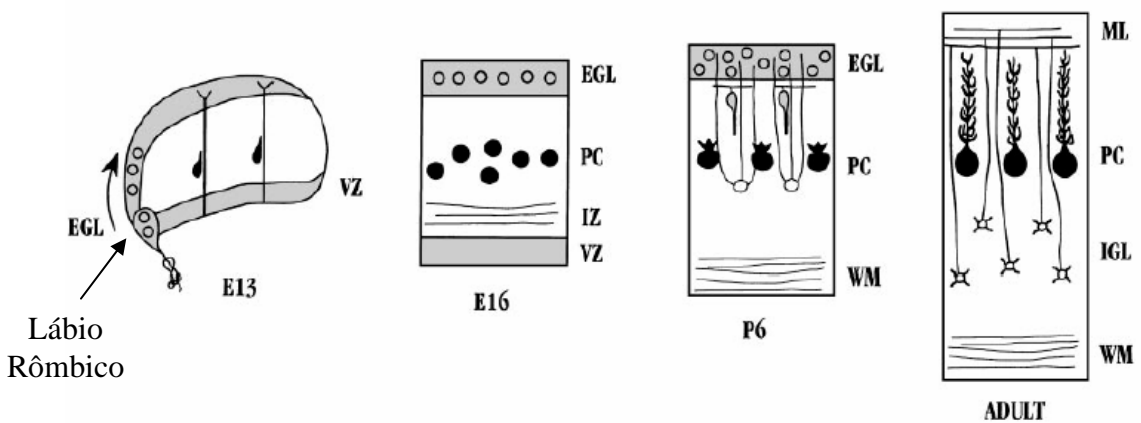


Figura 3. Esquema representativo do desenvolvimento do córtex cerebelar. As células de Purkinje tornam-se pós-mitóticas e migram radialmente em direção a pia. Enquanto isso, precursores de células granulares migram tangencialmente a partir do lábio rômico formando a camada granular externa. Na época do nascimento as células granulares tornam-se pós-mitóticas e migram radialmente em direção a substância branca formando a camada granular interna. *VZ*, zona ventricular; *EGL*, camada granular externa; *PC*, células de Purkinje; *IZ*, zona intermediária; *WM*, substância branca; *IGL*, camada granular interna (adaptado de Hatten, 1999).

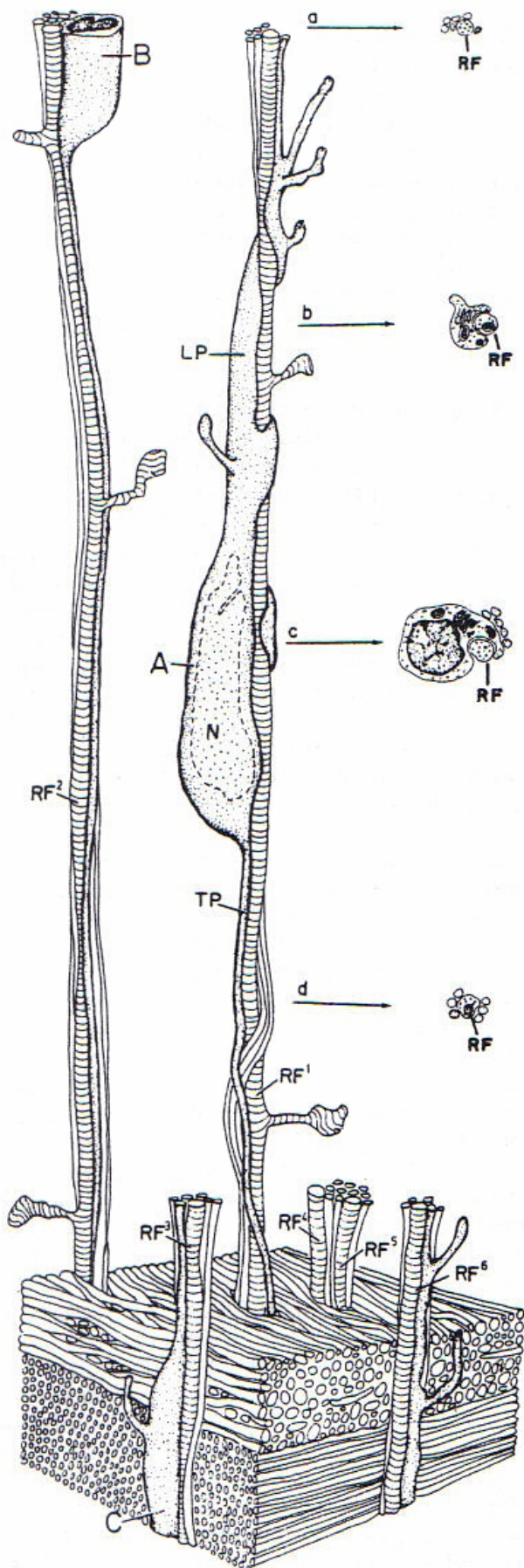


Figura 4. Diagrama tridimensional ilustrando a íntima interação entre as células migratórias (A, B e C) e as fibras de glia radial (RF) na zona intermediária do córtex cerebral. N, núcleo da célula A; a-d, secções transversais da célula A ilustrando o contato íntimo entre a célula migratória e fibra glial em diferentes planos; LP, prolongamento líder; TP, prolongamento seguidor (adaptado de Rakic, 1972).

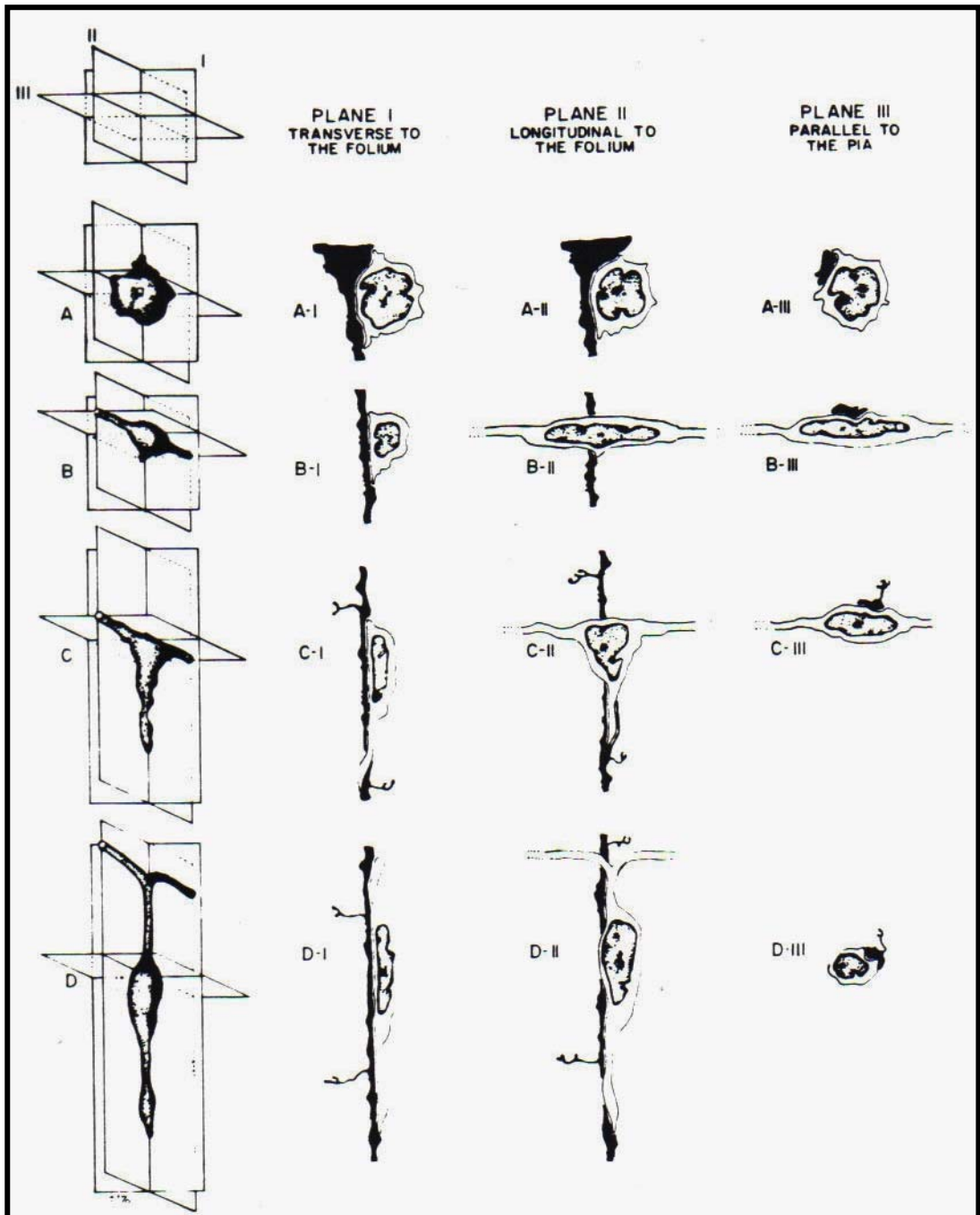


Figura 5. Diagrama de células granulares pós-mitóticas em três planos cardinais e em diferentes profundidades (A, B, C e D) da EGL e ML estabelecido através de uma reconstrução tridimensional do formato celular. No nível (A) a célula representada se localiza na zona superficial da EGL; No nível (B), a célula se localiza na zona profunda da EGL; No nível (C), na fração da ML mais próxima a EGL e no nível (D) a célula representada se localiza no meio da ML. Nas outras colunas observa-se o perfil celular no plano transverso à folha cerebelar (I); longitudinal à folha (II) e paralelo a superfície pial (III). As fibras de Bergmann estão representadas em preto (Adaptado de Rakic, 1971).

Na fração profunda da EGL há uma diminuição do tamanho celular, resultante do alongamento da célula em forma de fuso. Começam a aparecer os prolongamentos bipolares horizontais, que se posicionam contígua e paralelamente às fibras de outras células granulares.

Enquanto mais próximo da ML, mais volumoso se torna o citoplasma da célula. Sua porção mais próxima ao núcleo se torna rica em organelas, particularmente ribossomos e aparato de Golgi, enquanto em suas extremidades, numerosos microtúbulos se desenvolvem nos dois prolongamentos horizontais (**Figura 5B**) (Rakic, 1971).

Posteriormente foi observado que, nessa porção da EGL, as células pós-mitóticas ainda são capazes de migrar tangencialmente na direção de seu maior prolongamento horizontal e que a velocidade dessa migração decresce progressivamente com a proximidade da célula à ML. Foi sugerido que esse mecanismo possa ser utilizado pelo neuroblasto objetivando uma melhor disposição para continuidade do processo de desenvolvimento (Komuro e cols., 2001).

Em seguida os precursores granulares se organizam em colunas verticais ao longo de seguimentos de fibras gliais radiais que cruzam a camada EGL e o contato íntimo entre os dois tipos celulares persistirá durante todo o processo de migração até a IGL.

Durante o contato com a fibra de glia radial, o precursor granular, ainda orientado horizontalmente, envia um fino prolongamento descendente, similar a um pseudópodo ao longo da fibra de glia radial. Esse prolongamento vertical, ou prolongamento líder (PL), sofre um alongamento e se torna rico em organelas, incluindo um aparato de Golgi bem desenvolvido, mitocôndrias, numerosas rosetas ribossomais e ribossomos livres. O núcleo do precursor granular penetra no PL, e o soma se torna, temporariamente, triangular no plano longitudinal a folha (Rakic, 1971).

Já na ML, o núcleo repousa inteiramente no PL, e o soma se transforma em um fuso verticalmente orientado, porém seus prolongamentos horizontais permanecem e originarão as

fibras paralelas da célula. A mudança de 90° na orientação celular é efetuada em uma região muito restrita, no limiar entre a EGL e ML (Rakic, 1971).

Entre o neuroblasto e o prolongamento glial há um espaço de 10 nm de espessura, que ocasionalmente é preenchido com material intersticial fibrilar. Quando exhibe este conteúdo, o espaço intersticial atinge a espessura de 20nm. Algumas fibras do material atravessam o espaço intersticial e, certas vezes, é possível observar o que pode ser a continuidade da fibra no espaço intracelular, ou outra fibra organizada contiguamente à intersticial. Esse fenômeno foi identificado como um tipo de conexão diferente de todas as outras junções de adesão clássicas, já caracterizadas. Para se referir às regiões intersticiais que contém esse material fibrilar, Gregory e colaboradores (1998) adotaram o termo “densidade intersticial”.

Enquanto o núcleo se move pelo prolongamento citoplasmático vertical as organelas se redistribuem. O citoplasma próximo ao núcleo contém ribossomos livres, rosetas de 5-6 ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, aparato de Golgi circundado por vesículas. O PL do precursor granular que se encontra na ML, contém rosetas de ribossomos e numerosas mitocôndrias, além de microtúbulos orientados longitudinalmente. Pode apresentar um alargamento em sua extremidade ou terminar abruptamente. No PL também são encontradas vesículas que ocasionalmente encontram-se fusionadas à porção membranosa em contato com o espaço intersticial, indicando atividade de endo/exocitose, possivelmente relacionada ao mecanismo de “turn over” da célula (Rakic, 1971; Gregory e cols, 1988).

Quando o soma do precursor granular chega à camada de células de Purkinje, são perdidas a forma bipolar e a orientação vertical. Ele se destaca da fibra de glia radial, se torna arredondado. O prolongamento líder da célula diminui e desaparece a maioria de seus microtúbulos, porém o neuroblasto continua a migrar lentamente.

Após a transposição pela camada de células de Purkinje, o precursor granular restabelece o perfil bipolar e, novamente, estende o PL, retomando sua velocidade migratória, porém, independente de fibras gliais.

Os neuroblastos migram radialmente na IGL por mais de 100 μm , até encontrar sua localização final, onde se tornam novamente arredondados e estabelecem seus contatos sinápticos com terminais de fibras musgosas (Komuro & Rakic, 1998).

Ao final do processo são observados vários axônios de células granulares diferenciadas alinhados às fibras radiais assim como o aumento progressivo desses axônios alinhados a cada fibra nas regiões mais profundas da ML, sugerindo que uma mesma fibra, serve de suporte para inúmeros neuroblastos (Rakic, 1971).

1.1.5. Mecanismos moleculares da migração de células granules do cerebelo:

Como descrito acima, as células granulares do cerebelo exibem diferentes aspectos morfológicos correlacionados tempo-espacialmente com a fase de maturação em que ela se encontra. Além disso, células com diferentes perfis apresentam diferentes complexos moleculares em sua superfície.

Em 2002, foi descrito que o mesmo tipo celular em cultura obedece a mudanças morfológicas temporalmente semelhantes às células observadas *in vivo*, sugerindo que essas alterações fazem parte de um mecanismo de controle intrínseco da célula, essencial para migração das células granulares no cerebelo em desenvolvimento. Porém, fatores extrínsecos podem interferir na expressão de genes envolvidos nesse mecanismo de autocontrole celular, de maneira que alterações na regulação dessas unidades genéticas acarretam em anomalias severas no fenômeno de migração celular (Yacubova & Komuro, 2002).

A proteína mPar6 α , expressa no centróssomo celular, é um exemplo de molécula envolvida no mecanismo de controle intrínseco da célula. O centróssomo é responsável pela

organização dos microtúbulos e o movimento nuclear é gerado pela proteína dineína e precede o movimento do soma celular, caracterizando o padrão saltatório da migração. Quando a expressão da mPar6 α é alterada (por superexpressão ou nocaute), há uma modificação da atividade da dineína, resultando na paralisação do centróssomo, desorganizando a rede de microtúbulos que envolve o núcleo e interrompendo a migração *in vitro* (Solecki e cols., 2004; 2006).

Outro exemplo é o gene *LIS1*, que codifica uma proteína multifuncional citoplasmática. Entre outras funções, essa proteína compõe o sistema motor dineína-microtúbulo e é de grande importância para o desenvolvimento encefálico. A alteração da funcionalidade do gene *LIS1*, determina anomalias severas na organização das camadas de neurônios do neocórtex, bulbo olfatório, hipocampo e cerebelo, caracterizando a lisencefalia. Essas anormalidades são atribuídas à irregularidades na migração das células que compõem essas regiões (Hirotsune e cols, 1998; Gambello e cols, 2003).

O gene responsável pela codificação da DCX (doublecortina), uma proteína associada a microtúbulos, também possui grande importância na migração. A doublecortina é uma proteína expressa por toda a população de neurônios pós-mitóticos que migram radial e tangencialmente. A DCX co-localiza com aglomerados de microtúbulos e sua função está envolvida com a regulação e estabilidade dos mesmos. Pacientes com alteração do gene responsável pela produção pela DCX exibem atrofia cerebelar difusa com diminuição da densidade de células granulares, de Purkinje, de neurônios do núcleo denteado e de neurônios da oliva inferior, reafirmando a importância do citoesqueleto no processo de migração celular do córtex cerebral e do cerebelo.

Quando os neurônios chegam ao seu destino, a expressão de DCX diminui drasticamente e acredita-se que essa diminuição pode ser induzida por algum sistema de

sinalização extracelular, o que reforça a idéia de que mecanismos externos também influenciam o mecanismo de controle intrínseco da célula (Gleeson e cols., 1999).

Assim como os neuroblastos, as células gliais também se modificam, assumindo formas e funções que servem de suporte para os neuroblastos durante a migração. Ao término do período migratório a glia deixa de ser radial, substituindo seu repertório molecular e, em algumas estruturas, alterando também sua morfologia transformando-se em astrócitos do tecido neural (Hatten & Liem 1981; Voigt, 1989; Culican e cols., 1990; Hunter & Hatten, 1995).

A maioria das estruturas do SNC apresenta uma carência de GFAP (“*glial fibrillary acidic protein*”, marcador de astrócito adulto) em sua glia radial (Voigt T, 1989; Hunter & Hatten, 1995), porém estas células apresentam outros marcadores específicos como o BLBP (“*brain lipid binding protein*”) (Feng e cols., 1994; Kurtz e cols, 1994; Feng & Heintz, 1995) e um subtipo de IFAP (“*intermediate filament associated protein*”) reconhecido pelo anticorpo RC2 (“*radial cell*” 2) (Misson e cols,1988; Chanas-Sacré e cols., 2000).

Já no cerebelo, o processo de maturação da glia radial é diferente do encontrado em outras estruturas em alguns aspectos. A migração radial das células granulares para a formação da IGL é guiada por uma forma especializada de glia radial denominada glia de Bergmann. Esta, ao contrário da glia radial de outras estruturas do SNC, se caracteriza por manter a expressão de GFAP, além de BLBP e RC2, durante o período migratório e por conservar sua morfologia radial, mesmo no estágio adulto (Rakic, 1971; Hatten & Liem 1981; Kurtz e cols, 1994).

A marcação do RC2 e de BLBP desaparece juntamente com o período de migração neuronal (Misson e cols, 1988; Kurtz e cols, 1994; Feng e cols., 1994; Chanas-Sacre e cols., 2000).

Também já foi demonstrado que, além da glia de Bergmann, células granulares migratórias expressam BLBP durante a transição pela camada de células de Purkinge (Kurtz e cols, 1994; Feng e cols., 1994; Feng & Heintz, 1995).

Precusores neurais também expressam nestina, um subtipo de IFP (Hockfield & McKay, 1985; Lendahl e cols., 1990). Também já foi sugerido que uma isoforma da nestina seja o antígeno responsável pelo reconhecimento de células gliais pelo anticorpo RC2 (Chanas-Sacré e cols., 2000).

Em alguns experimentos, foi observado que neuroblastos migratórios do cerebelo induzem o fenótipo de glia radial com o aumento ou retomada da expressão dos antígenos BLBP e Nestina (Sotelo e cols., 1994; Feng & Heintz, 1995). Posteriormente foi demonstrado que essa indução é realizada através de sinais difusíveis, entre eles a liberação da proteína RF60. Esta é uma molécula neuronal que é encontrada em abundância no meio do período gestacional, decresce em quantidade quando a migração diminui e é indetectável no adulto, quando o processo de migração já estabeleceu a laminação neuronal (Hunter & Hatten, 1995).

O GGF (do inglês “*glial growth factor*”), ou neuregulina, um membro da família EGF (do inglês “*epidermal growth factor*”), é conhecido como outro indutor do fenótipo de células da glia radial e importante marcador das primeiras fases de desenvolvimento de célula glial. No cerebelo, a expressão de neuregulina é limitada ao período de migração neuronal e seu RNAm é restrito às células granulares migratórias. A neuregulina se liga a membros de uma família de receptores para EGF conhecidos como erbB. Uma mutação no receptor erbB, interrompe a sinalização disparada por ela e a indução do fenótipo glial (Anton e cols, 1997; Rio e cols, 1997). A neuregulina também induz a expressão de BLBP em células gliais do córtex cerebral (Anton e cols., 1997).

Também já foi demonstrado com células granulares que a via de sinalização disparada pelo receptor de membrana Notch, presente na membrana da glia radial, é fundamental para o

fenótipo de glia radial. A ativação desse receptor é dada pelo contato neuro-glial e é essencial para que haja a transcrição gênica do BLBP no encéfalo (Patten e cols., 2003; Anthony e cols., 2005).

A migração neuronal também é influenciada por moléculas responsáveis pela quimiotaxia celular. O SDF1 (do inglês, *stromal cell-derived factor*) é uma quimiocina produzida pelas meninges que detém as células granulares na EGL e aumenta a proliferação induzida por Sonic Hedgehog nessas células. As células granulares possuem o receptor para o SDF1, o CXCR4, apenas enquanto estão na EGL (Klein e cols., 2001; Floridi e cols., 2003; Tissir e col., 2004; Corrales e cols., 2006).

O BDNF (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*) é um fator neurotrófico extracelular que também induz a quimiotaxia de precursores neurais determinando a direção da migração. A ativação de seu receptor, o TrkB, estimula a liberação de BDNF pelas células granulares em um *feedback* positivo e o gradiente de BDNF gera a endocitose de TrkB em regiões subcelulares à concentração máxima do fator. Essa endocitose é requerida para redistribuição de moléculas de sinalização e, juntos, estes mecanismos promovem a polarização e o direcionamento da migração (Zhou e cols., 2007). A proteína CAPS2, responsável pela secreção do BDNF pode ser um componente crítico dessa liberação autócrina. Um estudo recente mostra que camundongos com carência de CAPS2 exibem irregularidades na migração celular no cerebelo (Sadakata e cols., 2007). A migração neuronal *in vivo* é atípica em camundongos mutantes com carência ou superexpressão de BDNF em células granulares (Borghesani e cols., 2002).

Outro grupo de moléculas que também apresenta importância na migração radial cerebelar são os neurotransmissores. O bloqueio do NMDA, um subtipo de receptor para o glutamato, resulta em uma diminuição da migração e o acréscimo da atividade do mesmo receptor resulta em um aumento da taxa de migração de células granulares em fatias de

cerebelo em desenvolvimento. Além disso, o acréscimo da concentração de glutamato endógeno também acarreta em um aumento da taxa migratória (Komuro & Rakic, 1993).

Moléculas da matriz extracelular (MEC) também são muito importantes na modulação da migração. A relina, por exemplo, é uma proteína associada a MEC, expressa por células granulares da IGL e EGL interna, que se liga a um complexo de receptores inseridos na membrana disparando uma via de sinalização que interrompe a migração. Animais que exibem mutações em genes que participam da via de sinalização da relina, como, por exemplo, seus receptores (VLDLR – do inglês, *very low density lipoprotein receptor*; ApoER2 – do inglês, *apolipoprotein E receptor type 2*) ou a proteína citoplasmática mDab1, (do inglês, *mouse disabled-1*) que é fosforilada quando os receptores se ligam à relina, apresentam os mesmos distúrbios na migração, porém, estas moléculas não afetam diretamente a migração das células granulares e sim a migração de células de Purkinje e neurônios do córtex cerebral (Howell e cols., 1997; Dulabon e cols., 2000; Larouche e cols., 2008).

Outra molécula da MEC importante na migração neuronal é a laminina. Esta forma uma família de glicoproteínas que está presente tanto na MEC quanto na membrana da glia radial (Liesi, 1985) e é um substrato permissivo à migração neuronal *in vitro* e *in vivo* (Selak e cols., 1985; Fishman & Hatten, 1993; Liesi e cols., 1995; Rivas & Hatten, 1995).

Os receptores clássicos das proteínas da MEC são as integrinas. Estas moléculas presentes na superfície de membranas celulares são compostas por duas subunidades, α e β , e a suas especificidades de ligação e propriedades de sinalização estão diretamente relacionadas com as inúmeras combinações de suas subunidades (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Anton e cols., 1999). As integrinas se ligam à fibronectina, laminina, colágeno e vitronectina e são conhecidas por mediar inúmeras funções no processo de adesão celular, indispensável para a migração (Hemler, 1990; Ruoslahti, 1991; Hynes, 1992). A porção

citoplasmática das integrinas é geralmente pequena e desprovida de função enzimática. Por isso, integrinas exercem sua sinalização através da associação com cinases citoplasmáticas. Estas são proteínas adaptadoras que conectam a integrina ao citoesqueleto e a outras moléculas transmembrana como os receptores para fatores de crescimento, regulando assim processos como a sobrevivência, migração, morfologia, proliferação e diferenciação celular (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Pande, 2000).

A integrina β_1 também regula a distribuição de proteínas da ECM ao redor das células, recrutando complexos de laminina e Sonic Hedgehog na superfície de células precursoras granulares (Blaess e cols, 2004).

Em um trabalho do nosso grupo foi observado que o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal Jones (mAb Jones), co-localiza com a subunidade β_1 da proteína integrina em células com perfil migratório. Esse antígeno, o gangliosídeo 9-O-acetil GD3, é conhecido por ser expresso em regiões relacionadas a migração neuronal, reforçando ainda mais a importância das integrinas e desse gangliosídeo neste processo (Lima, 2006).

1.2. O gangliosídeo 9-O-acetil GD3:

O gangliosídeo 9-O-acetil GD3 foi identificado e caracterizado como estando presente na membrana de neurônios e células gliais de morfologia alongada. A expressão deste gangliosídeo foi espaço-temporalmente correlacionada com a migração celular na retina, colículo superior, cerebelo, telencéfalo e com o crescimento axonal no trato óptico, na substância branca cerebelar, nos gânglios da raiz dorsal, nervos periféricos, sistema trigeminal e nervo olfatório. Para esses estudos foi utilizado como ferramenta o anticorpo monoclonal (mAb) Jones (Constatine-Paton e cols., 1986; Blum & Barnstable, 1987; Mendez-Otero e cols., 1988; Mendez-Otero & Constatine-Patons, 1990; Mendez-Otero & Cavalcante, 1996; Santiago e cols., 2001).

Na tentativa de descobrir o antígeno reconhecido pelo mAb Jones, primeiramente foi observado que não há ligação do anticorpo em tecidos, de nenhuma região do sistema nervoso, tratados previamente com detergentes e solventes orgânicos, sugerindo que a molécula reconhecida seja um lipídio. Nenhuma ligação ao Jones foi observada em Western Blots. Também foi verificado que a molécula reconhecida pelo anticorpo está presente em extratos do tecido neural separados por clorofórmio e metanol. Através da corrida do extrato de retina em TLC foi observado que a banda reconhecida pelo Jones está presente entre o GM1 e o GM2 e que ela desaparece após o tratamento com neuroaminidase. Essas características levaram a crer que a molécula antigênica pudesse ser um gangliosídeo e que seu reconhecimento pelo anticorpo acontecesse pela fração apolar da molécula (Constatine-Paton e cols., 1986; Schlosshauer e cols., 1988).

Gangliosídeos formam um grande grupo de glicoesfingolipídeos sialilados (**Figura 6A**) e a neuroaminidase é capaz de retirar o ácido siálico destas moléculas impossibilitando o reconhecimento pelo anticorpo. Gangliosídeos são amplamente expressos em tecidos de mamíferos e particularmente abundantes no cérebro e tecidos nervosos. Mudanças na distribuição destes são observadas no cérebro em desenvolvimento sendo cada uma das regiões do cérebro adulto caracterizada por um conjunto de gangliosídeos específicos. De forma geral, gangliosídeos contribuem para o reconhecimento célula-célula e para a interação célula-MEC, tanto através de proteínas, como a lecitina, quanto pelas interações entre carboidratos que são importantes no desenvolvimento e na organização dos tecidos (Lloyd & Furukawa, 1998).

Em um outro trabalho foi observado que o tratamento do extrato tecidual com vapor de amônia (tratamento básico), que retira a acetilação molecular, induz a transformação da molécula antigênica em GD3, e que essa reação pode ser revertida por acetilação química com N-acetil-imidazol.

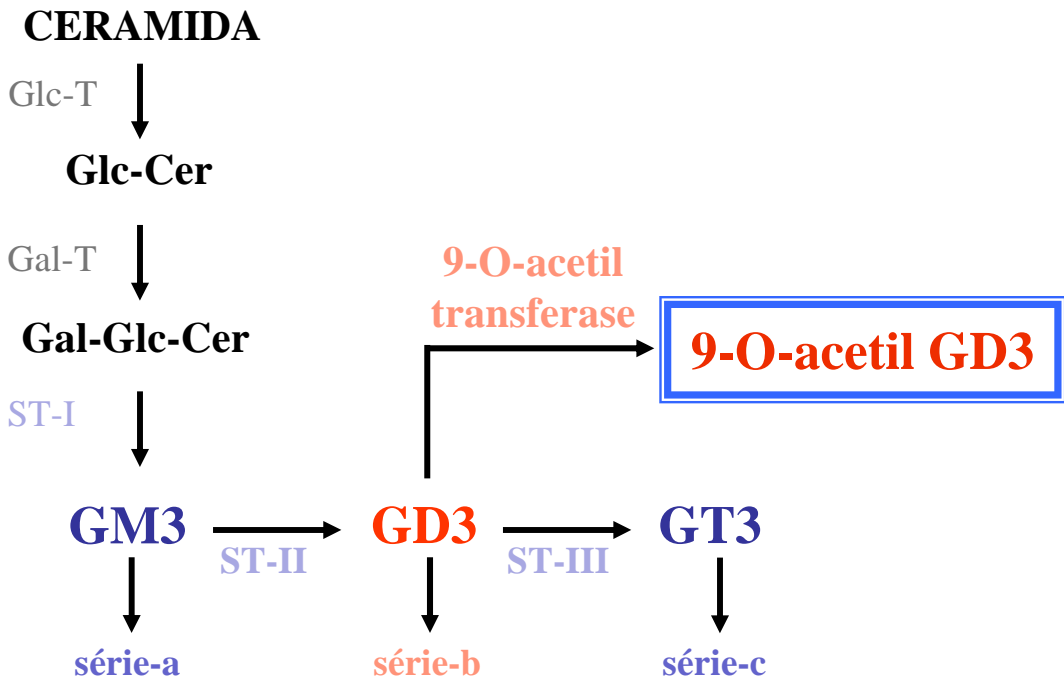
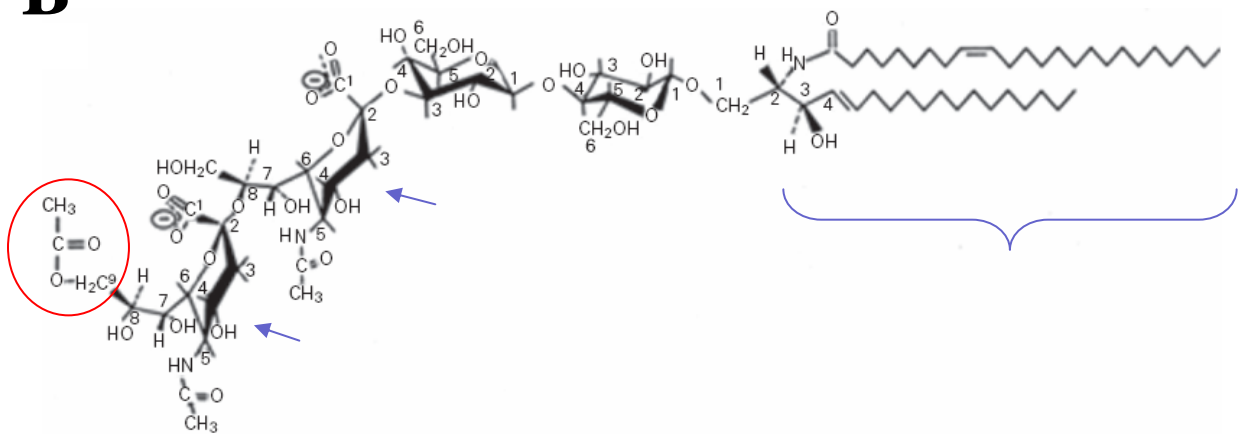
A**B**

Figura 6. Via de biosíntese de gangliosídeos e representação química do 9-O-acetil GD3. (A) Via de síntese sugerida para a formação dos gangliosídeos, glicosíngolípídeos (GSL) sialilados. GSL são formados a partir da adição de uma glicose (Glc) e uma galactose (Gal) a uma molécula de ceramida através das enzimas glicosil (Glc-T) e galatosil-transferase (Gal-T). Posteriormente as enzimas sialil transferase (ST) I, II e III adicionam resíduos de ácido siálico ao GSL formando gangliosídeos mono, di, ou trissialilados, respectivamente. O 9-O-acetil GD3 é formado pela adição de um grupamento acetil ao gangliosídeo GD3 pela enzima 9-O-acetil transferase. **(B)** Diagrama esquemático mostrando a estrutura do 9-O-acetil GD3. A chave indica a ceramida ligada ao primeiro sacarídeo da cadeia glicídica (glicose). Este se encontra conectado a uma galactose que por sua vez faz ligação com dois resíduos de ácido siálico, indicados por setas azuis. O grupamento acetil se liga ao carbono 9 do resíduo de ácido siálico terminal, indicado pelo círculo vermelho (adaptado de Mendez-Otero & Santiago, 2003).

Estes dados identificaram a molécula antigênica como uma variação do gangliosídeo GD3 (um dissialogangliosídeo) que sofreu uma acetilação no carbono de posição 9 em seu ácido siálico terminal, o que o faz ser reconhecido pelo Jones (**Figura 6B**) (Blum & Barnstable, 1987).

Posteriormente foi avaliada a presença da molécula antigênica reconhecida pelo Jones em diferentes regiões do encéfalo de diferentes idades. Foi observado por HPTLC que a partir de preparações de cerebelo, o anticorpo Jones revela três bandas, sensíveis à neuroaminidase e ao tratamento básico, que variam de intensidade de acordo com a idade do animal. Porém duas dessas bandas, migram mais lentamente, são muito próximas e possuem concentrações complementares (quando uma aumenta de intensidade a outra diminui e vice-versa).

Por sua velocidade migratória, acredita-se que essas bandas não correspondam a uma variação do gangliosídeo GD3. Além disso, por suas outras características, foi sugerido que essas duas bandas representem a mesma molécula com heterogeneidades em seus ácidos graxos. De qualquer maneira, a expressão dessas bandas é muito fraca no período pós-natal e uma delas aumenta de intensidade apenas na idade adulta. Assim, acredita-se que apenas a terceira banda corresponda ao 9-O-acetil GD3. Esses dados foram reforçados quando foi avaliada uma fração de soro de leite enriquecida em gangliosídeos. Nessa condição o Jones reconhece apenas uma banda. As características da corrida dessa banda são idênticas as da terceira banda do cerebelo em desenvolvimento (localização entre os gangliosídeo GM1 e GM2). Além disso a banda origina o GD3 após tratamento básico garantindo que esta corresponda ao 9-O-acetil GD3. Assim, hoje em dia sabe-se que, no cerebelo, a terceira banda reconhecida pelo Jones, mais evidente no período pós-natal, que se localiza entre os gangliosídeos GM1 e GM2, corresponde ao 9-O-acetil GD3 enquanto, as outras duas, mais evidentes após esse período, correspondem a algum outro lipídio sialilado e acetilado (Schlosshauer e cols., 1988; Bonafede e cols., 1989).

Para avaliar a função do 9-O-acetil GD3 foram realizados ensaios de imunobloqueio e foi observado que a migração radial neuronal no cerebelo é bloqueada pela adição do mAb Jones *in vitro* (66%) e *in vivo* (43%), através de injeções intraventriculares (Santiago e cols., 2001; Santiago e cols., 2004).

Além disso, ensaios de imunobloqueio também revelaram o colapso de cones de crescimento de neuritos de células do gânglio da raiz dorsal *in vitro* quando tratados com o mAb Jones (Mendez-Otero e Friedman, 1996; Araújo et. al., 1997).

Em outros trabalhos foi descrito através de microscopia confocal que o 9-O-acetil GD3 co-localiza com a proteína integrina $\beta 1$ nos pontos de contato de adesão dos cones de crescimento e em células granulares com perfil migratório reforçando o papel deste gangliosídeo na modulação da extensão neurítica e sua importância na migração neuronal (Negreiros e cols., 2003; Lima, 2006).

2. Objetivos:

2.1. Geral:

- Estudar os efeitos do imunobloqueio crônico do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 sobre o cerebelo em desenvolvimento.

2.2. Específicos:

- Analisar o padrão de distribuição do mAb Jones, no cerebelo, quando injetado nos ventrículos laterais.
- Avaliar por análise morfométrica parâmetros anatômicos do cerebelo após o imunobloqueio crônico com o mAb Jones.
- Avaliar se o imunobloqueio crônico interfere no número de células em proliferação na EGL.
- Avaliar se o imunobloqueio crônico interfere na morfologia e no número de fibras de glia radial.
- Observar se o imunobloqueio do 9-O-acetil GD3 interfere na adesão celular à laminina em um modelo *in vitro*.

3. Material e Métodos:

Neste trabalho foram utilizados ratos Lister-Hooded com 7 dias pós-natais (P7), fornecidos pelo Biotério do Programa de Terapia Celular e Bioengenharia. Todos os animais foram utilizados seguindo protocolo aprovado pelo Comitê de Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Anticorpos e reagentes utilizados com seus respectivos fabricantes estão relacionados ao final do item material e métodos (**Tabelas 1, 2 e 3**).

3.1. Imunobloqueio *in vivo*:

Os animais foram divididos em 3 grupos que, após serem anestesiados através da inalação de éter etílico, receberam injeções intracerebroventriculares transcutâneas de 20 µL de solução salina 0,9%; anticorpo A2B5, que reconhece um grupo de gangliosídeos da série-c; ou Jones durante 7 dias, a partir do 7º dia pós-natal (P7), com intervalo de 12 horas entre as injeções. As injeções foram administradas com seringa de insulina (BD Ultra-fine™; 1mL; agulha 12.7 mm x 0.33) no ventrículo direito do animal.

3.2. Perfusão:

Depois de aproximadamente 9 horas a partir da última injeção, os animais foram novamente anestesiados através da inalação de éter etílico e perfundidos com solução salina a 0.9% durante 5 minutos para a remoção de todo o conteúdo sanguíneo.

Subseqüentemente a solução salina foi substituída por soluções fixadoras, durante 20 minutos, objetivando a preservação tecidual. Inicialmente a solução foi de paraformaldeído a uma solução final de 4% diluído em água destilada e tampão fosfato 0.1M, pH 7.4 a uma proporção de 1:1. Para preparação do tampão fosfato foram feitas duas soluções independentes de 27.8g de NaH₂PO₄.H₂O e de 53.65g de Na₂HPO₄.7H₂O, ambos diluídos em

1L de água destilada separadamente. O pH 7,4 do tampão fosfato foi obtido misturando-se 190 mL da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com 810 mL da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, foi adicionado a essa solução 10% de sacarose objetivando a crioproteção tecidual.

Após esse procedimento, os encéfalos foram removidos e imersos em sacarose a 20% solubilizada em tampão fosfato 0.1M (solução crioprotetora). Depois de dois dias os encéfalos foram transferidos para uma solução mais concentrada de 30% de sacarose, onde foram mantidos por mais dois dias.

3.3. Processamento do tecido:

Após dois dias em solução de sacarose 30%, os encéfalos foram cortados sagitalmente, separando os hemisférios cerebrais e dividindo o vérmis cerebelar ao meio. As duas metades foram incluídas separadamente em OCT (do inglês, *optimum cutting temperature* - SAKURA), congeladas por imersão em nitrogênio líquido (White Martins) e mantidas dentro do criostato (Leica CM 1850) a -20°C durante cerca de 30 minutos para equilibrar a temperatura do bloco.

Os encéfalos foram fatiados parassagitalmente a 20 μm de espessura em criostato, de maneira que os primeiros cortes de cada bloco correspondiam seguramente ao vérmis cerebelar. Os cortes foram recolhidos intercaladamente em lâminas (Bioslide – 76.2 x 25.4 mm e 1 – 1.2 mm de espessura) previamente cobertas com gelatina (SIGMA), o que possibilitou que, no momento das quantificações, a mesma região, não fosse avaliada mais de uma vez.

Alguns encéfalos foram seccionados coronalmente na mesma espessura após serem incluídos inteiros em OCT e, igualmente, congelados com nitrogênio líquido e mantidos no criostato a -20°C até equilibrar a temperatura. Os cortes foram recolhidos da mesma forma.

As lâminas foram mantidas em caixas de plástico vedadas com plástico PVC e estocadas a temperatura de -20°C.

3.4. Coloração Cresil Violeta:

As lâminas selecionadas foram, primeiramente, mantidas na estufa (Fanem) à 38° C, durante 15 minutos, em câmara umedecida com paraformaldeído com a mesma diluição utilizada na perfusão, para que os cortes não soltassem das lâminas durante o processamento histológico.

Posteriormente, elas foram submersas em álcool etílico 75%, 95% e absoluto, consecutivamente, durante três minutos em cada solução para serem desidratadas.

Em seguida os cortes foram submetidos a uma solução desengordurante de álcool etílico e clorofórmio, a uma proporção de 1:1, durante 10 minutos.

Ao final desse procedimento as lâminas passaram por um processo de re-hidratação, sendo, novamente, submersas durante 3 minutos em soluções de álcool etílico, porém, agora em ordem invertida: absoluto, 95 e 75%.

Após esse período, as lâminas foram imersas em água destilada por 3 minutos antes de serem submetidas por 1 minuto à solução de cresil violeta, preparada com 0.5g de violeta de cresila e 10 gotas de ácido acético glacial diluídos em 200 ml de água destilada.

Os cortes foram mantidos por 3 minutos em água destilada e depois foram submetidos, também por 3 minutos, a uma solução de álcool etílico 75% com 10 gotas de ácido acético glacial.

As lâminas foram mergulhadas em uma solução de álcool etílico 95% com 10 gotas de ácido acético glacial antes de serem novamente imersas em álcool 95 e 100%, ambos durante 3 minutos.

Posteriormente, os cortes foram submersos durante 3 minutos em uma mistura de álcool etílico e álcool butílico normal (álcool etil-butil) a uma proporção de 1:1.

A coloração foi finalizada com imersão em xilol durante 5 minutos por duas vezes.

Para a montagem das lâminas foi utilizado o meio Entellan (Mikroskopie) e lamínulas de vidro (Glassyto) de 24 x 60 mm e 0.13-0.16 mm de espessura..

3.5. Cultura de células:

Para a cultura de células cerebelares, ratos (P7) foram levados ao fluxo horizontal (Pachane) e decapitados. Seus encéfalos foram removidos, o cerebelo foi dissecado e as meninges foram retiradas com auxílio de uma lupa (Zeiss). Tomamos o cuidado de separar as camadas mais superficiais do cerebelo, para que a maioria das células da cultura fossem neuroblastos não diferenciados.

O tecido foi levado ao fluxo vertical (Veco Bioprotector Plus-12) picotado em 3 mL de meio de cultura e as células foram dissociadas com auxílio de uma pipeta Pasteur e, posteriormente, com uma pipeta Pasteur rondilhada. O meio de cultura utilizado foi o neurobasal adicionado de B27 e glutamina, a uma concentração de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente.

A solução de células foi levada à centrífuga (Excelsa Baby I - Fanem) durante 5 minutos a 300 x G. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuscitado com 900 μL de meio. Para limpar o precipitado celular de pedaços de tecidos eventualmente não dissociados utilizamos um filtro estéril de 100 μm de diâmetro (BD Falcon).

O conteúdo filtrado foi dividido em 3 alíquotas. Uma foi incubada com o anticorpo anti-CD60b (anticorpo análogo ao Jones) e outra com o anticorpo A2B5, ambas a uma diluição de 1:50. A terceira foi incubada apenas com o meio, e todas permaneceram por 15 minutos em gelo.

Ao término desse período foi adicionado 3 mL de meio a cada condição e as soluções foram centrifugadas durante 5 minutos a 300 x G. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de meio. As condições foram novamente submetidas à centrifugação, o sobrenadante foi, novamente, retirado e o precipitado foi ressuspensionado com 1 mL de meio.

Foram retirados 10 µL de cada condição, misturados com azul de trypan a uma concentração de 1:1 e as células vivas, não marcadas, foram quantificadas com o auxílio da Câmara de Neubauer.

Foram diluídas 50.000 células de cada condição em 500 µL de meio para cada lâmina previamente tratada com poli-L-lisina (20 µg/mL, diluídos em PBS, do inglês, “*phosphate buffered saline*”, 10 mM com 10% de Tampão Borato) e laminina (40 µg/mL diluídos em PBS 10mM) ou apenas com poli-L-lisina.

O PBS 10 mM foi preparado com a diluição de 40g de NaCl; 1.0g de KCl; 1.0g de KH_2PO_4 e 14.23g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 5L de água destilada.

A cultura de células foi mantida por 1 hora em estufa (Forma Scientific), à 37° C e 5% de CO_2 , fixadas com vapor de paraformaldeído 4% e, posteriormente, por imersão em paraformaldeído 4%.

As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 10mM, e reservadas na geladeira.

3.6. Imunohistoquímica:

Os cortes recolhidos em lâminas ou as culturas celulares em lâminas a serem reagidas foram selecionadas e lavadas por 3 vezes, durante 5 minutos com PBS a 10mM. O PBS foi utilizado com 0.1% de Triton X-100, para imunohistoquímica, ou com 0.01%, para imunomarcção do 9-O-acetil GD3. A concentração do Triton depende da sensibilidade ao detergente do antígeno de interesse.

O material foi incubado por 30 minutos com NGS (do inglês, *normal goat serum*) à temperatura ambiente. O NGS impede ligações do anticorpo a antígenos inespecíficos.

Em seguida, as células, ou o tecido foram incubados em câmara úmida à 4°C com o anticorpo primário (**Tabela 3.1.**), previamente diluído em PBS 10mM, durante cerca de 20 horas.

Após este período, as lâminas, ou lamínulas foram novamente lavadas três vezes durante 5 minutos com PBS 10mM e os cortes foram incubados por mais 2 horas, à temperatura ambiente com anticorpos secundários. Estes também foram diluídos previamente em PBS 10mM (**Tabela 3.2.**).

Posteriormente o material foi lavado 3 vezes com PBS 10mM e incubado com bisbenzimidida 0.1% ($C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3HCl$ – contra-coloração de núcleos) diluída em PBS 10mM durante três minutos.

O material foi submetido a mais 3 lavagens com PBS 10mM e as lâminas foram montadas com PPD (do inglês, “*phenyl phosphorodiamidate*”; 2,5-difenil-1,3,4-oxadiazole) diluído em PBS 10mM e glicérol e vedadas com esmalte.

3.5.1. Imunomarcção com anti-Ki67

Na marcação da molécula Ki67, as lâminas precisam passar por um tratamento prévio, para que o anticorpo consiga alcançar o espaço intranuclear.

Primeiramente foi feita uma fixação de cortes em câmara umedecida com paraformaldeído a 4% na estufa durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram imersas em citrato de sódio, pH 6,0, e levadas ao microondas, onde permaneceram por até 10 segundos após a fervura. As lâminas foram mergulhadas em água a 4° C e, posteriormente, foi realizado o procedimento de imunohistoquímica como descrito acima.

3.7. Aquisição de imagens:

As lâminas foram observadas em microscópio invertido Zeiss Axiovert 135, software AxioVision 3.1 conectado a câmera digital AxioCam HRc; em microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com *slide* ApoTome, software Axiovision 4.7 conectado a câmera digital AxioCam MRm; ou em microscópio confocal Zeiss LSM510 META. As quantificações foram realizadas através de ferramentas disponíveis nos respectivos softwares.

3.8. Quantificação e análise estatística:

Todas as quantificações em tecido foram realizadas em lâminas que continham o vérnis com a finalidade de diminuir as chances de comparação entre regiões cerebelares diferentes. Mesmo assim, as lâminas foram numeradas e as quantificações foram comparadas meticulosamente entre cortes de mesma altura, ou seja, localizados a uma mesma distância da linha média.

Para isso, foi necessário que a quantificação fosse normalizada, ou seja, para cada quantificação foi feita uma razão entre valores encontrados em cada corte do animal experimental (que recebeu injeções do Jones ou A2B5) e os valores encontrados em cortes de mesma posição médio-lateral do animal que recebeu injeções de solução salina.

Em cada animal foram quantificados, no mínimo, 4 cortes e, no máximo, 15 cortes. Estes números variavam entre os parâmetros quantificação escolhidos, porém para cada parâmetro foi quantificado o mesmo número de cortes para todos os ratos.

Ao final, foi calculada uma média das razões para cada dupla de ratos (experimental/controle) de maneira que cada média equivalesse a um N.

Para a quantificação de células em cultura, foram fotografados quatro campos equidistantes das extremidades de cada lamínula com uma objetiva de aumento de 20X. Foi

calculada uma média a partir dos valores encontrados em cada campo fotografado de cada lamínula, de maneira que a média de cada lamínula correspondesse a um N.

Esses valores foram processados no programa de análise estatística GraphPad Prism 4. Para a quantificação em tecido foi utilizado o teste-t e para a quantificação de células em cultura foi utilizado o método ANOVA (teste Kruskal-Wallis; pós teste: Dunns) como testes de análise estatística.

Anticorpos Primários	Antígeno	Características Imunológicas	Diluição	Fornecedor
Jones	Gangliosídeo 9-O-Acetil GD3	Mouse - Monoclonal – IgM	1:100	Sigma
Anti- Calbindina	Calbindina	Mouse - Monoclonal – IgG	1:100	Santa Cruz
Anti-CD60b	Gangliosídeo 9-O-Acetil GD3	Mouse - Monoclonal – IgM	1:50	Santa Cruz
Anti-GFAP	GFAP	Rabbit - Policlonal	1:400	Dako Cytomatization
Anti – Ki67	Ki67	Rabbit – Monoclonal – IgG	1:100	Abcam
2Q178	Nestina	Mouse – Monoclonal – IgG	1:200	Abcam

Tabela 1. Anticorpos primários e suas características de especificidade imunológica, diluição utilizada e fabricante.

Anticorpos Secundários	Antígeno	Diluição	Fornecedor
Cy3	Mouse - IgM	1:1000	Jackson Immuno Research
Cy3	Rabbit - IgG	1:1000	Jackson Immuno Research
Alexa 488	Mouse - IgG	1:200	Invitrogen – Molecular Probes
Alexa 488	Mouse - IgM	1:200	Invitrogen – Molecular Probes
Alexa 488	Rabbit - IgG	1:200	Invitrogen – Molecular Probes

Tabela 2. Anticorpos secundários e suas características de especificidade imunológica, diluição utilizada e fabricante.

Reagentes	Fornecedores	Reagentes	Fornecedores
Ácido Acético Glacial	Reagen	NaCl	Vetec
Álcool Butílico Normal	Vetec	Neurobasal TM	GIBCO
Álcool Etilico	Pring	NGS	Sigma
Azul de Tripán	Sigma	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Vetec
BisBenzimida	Sigma	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Vetec
B27	GIBCO	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Vetec
Clorofórmio	Vetec	Paraformaldeído	Vetec
Entellan	Mikroskopie	Poli-L-lisina	Invitrogen
Éter Etilico	Vetec	PPD	Sigma
Glicerol	Vetec	Sacarose	Vetec
Glutamina	GIBCO	TO-PRO3	Invitrogen
KH ₂ PO ₄	Vetec	Triton	Sigma
KCl	Vetec	Violeta de Cresila	Sigma
Laminina	Invitrogen	Xilol	Vetec

Tabela 3. Relação de reagentes utilizados e seus respectivos fornecedores.

4. Resultados:

4.1. O Jones injetado via intracerebroventricular alcança o cerebelo e marca diferentes tipos celulares.

Foi realizada uma imunohistoquímica *in vivo* (apenas com anticorpo secundário) em ratos que receberam injeções intraventriculares do anticorpo Jones para rastrear e verificar se o anticorpo primário (Jones) se ligou ao seu antígeno após as injeções. A imunohistoquímica *in situ* em ratos P7 (idade em que se iniciam as injeções) revela uma intensa marcação do Jones em células migratórias da EGL e ML (**Figura 7**) além das células de Purkinje (**Figura 8**). Através da imunohistoquímica *in vivo* foi possível observar que o anticorpo injetado se ligou aos locais já descritos: células migratórias da EGL (**Figura 9**), células migratórias da ML (**Figura 10**) e células de Purkinje (**Figura 11**).

4.2. O imunobloqueio com mAb Jones não interfere na espessura da EGL, mas sim na densidade celular dessa camada.

Para verificar se houve retenção de células na EGL, medimos a espessura dessa camada e não verificamos diferença significativa quando comparamos os ratos que receberam injeções intraventriculares de Jones e ratos que receberam injeções de solução salina (número de cortes quantificados por animal=16; n=4) (**Figura 12**). Para uma análise mais precisa resolvemos quantificar o número de células por área em cada folha cerebelar. Para isso, realizamos cortes ópticos de 1µm de espessura no microscópio Apo Tome em fatias cerebelares marcadas com bisbenzimidida. Foi observado um acréscimo na densidade celular da EGL de ratos que receberam Jones em comparação aqueles que receberam solução salina.

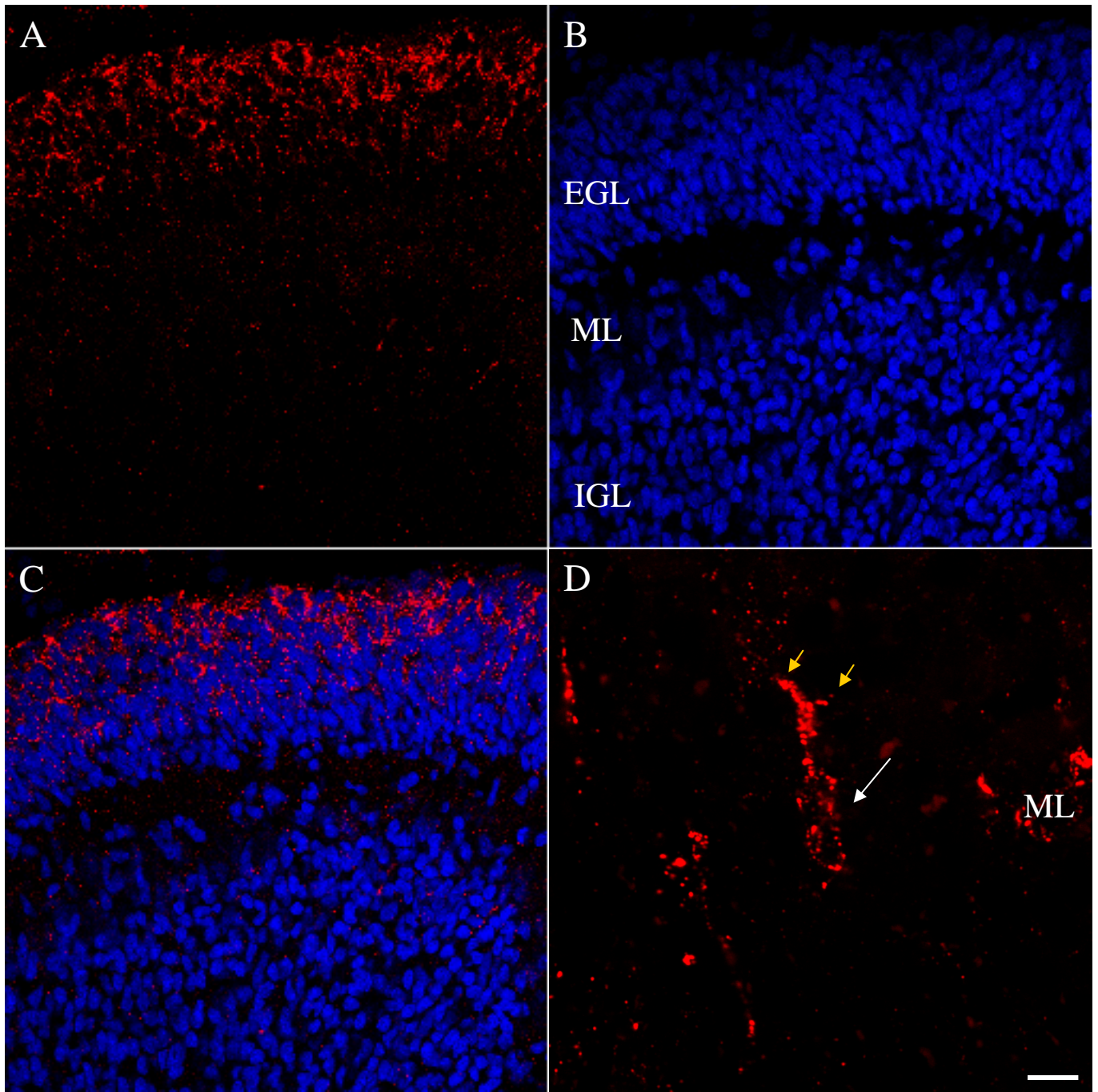


Figura 7. Imagens obtidas por microscopia confocal de cortes parassagitais de cerebelos de ratos P7. (A) Intensa marcação pontual do 9-O-acetil GD3 (vermelho) na EGL. **(B)** Núcleos contra-corados com TO-PRO3 (azul). **(C)** Sobreposição das imagens **(A)** e **(B)**. **(D)** Célula com perfil migratório na ML (seta branca), expressando 9-O-acetil GD3 (vermelho), exibindo o que aparenta ser o ponto de bifurcação de suas fibras paralelas (setas amarelas). Barra de calibração A, B, e C 20 μ m; D 10 μ m.

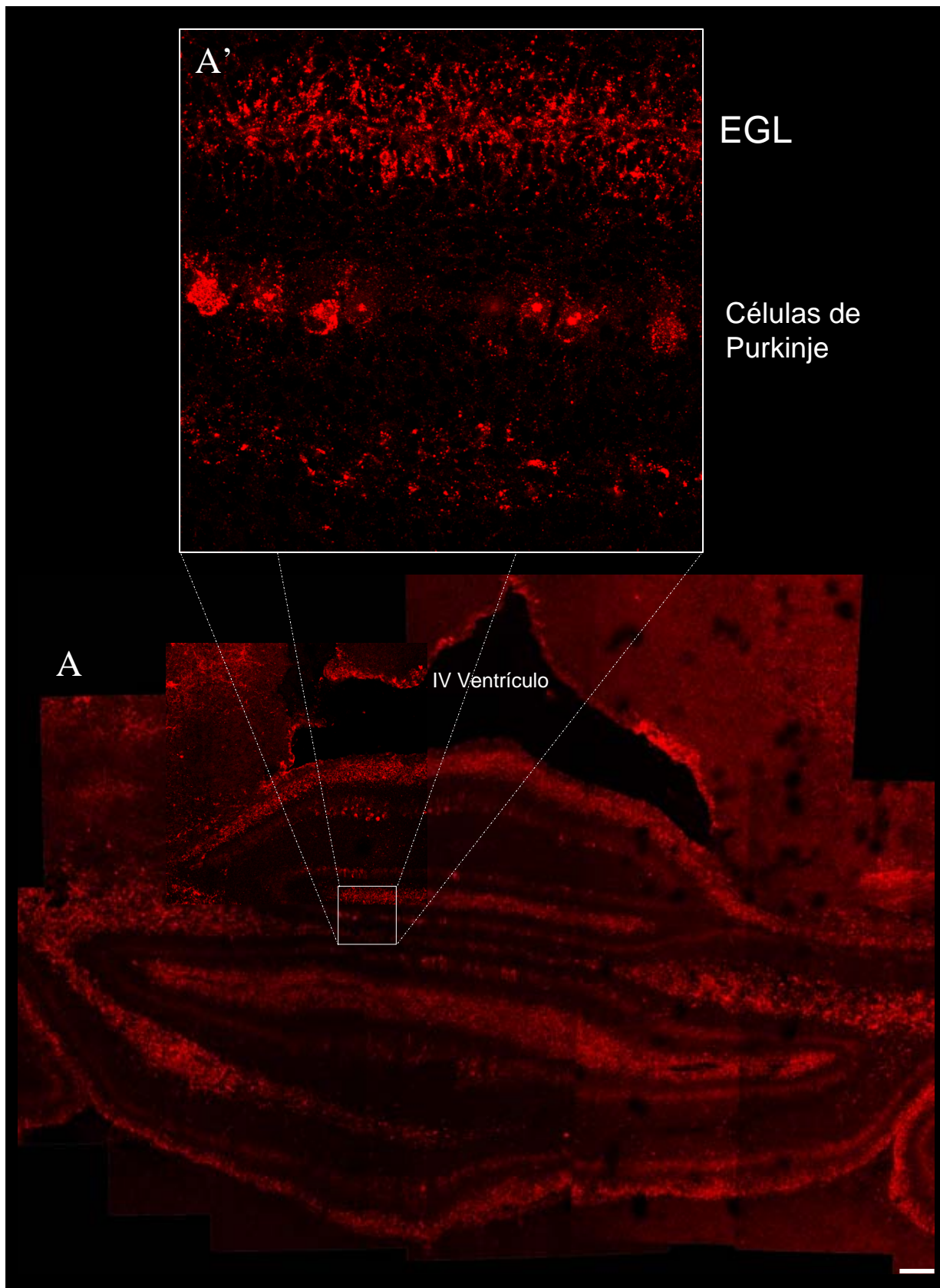


Figura 8. Fotomontagem de imagens obtidas em microscópio confocal revelando a expressão de 9-O-acetil GD3 no vérmis cerebelar. (A)Reconstrução de imagens de cortes coronais de rato P7 imunomarcado com Jones (vermelho). A área delimitada no quadrado branco em (A) é representada em maior aumento em (A'). Note em (A') o padrão de expressão alternado em bandas positivas e negativas evidenciando a compartimentalização da expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células de Purkinje. Observa-se também a intensa expressão do gângliosídeo em toda a extensão da EGL (A e A') Barra de calibração 20 μ m (cima) e 160 μ m (baixo).

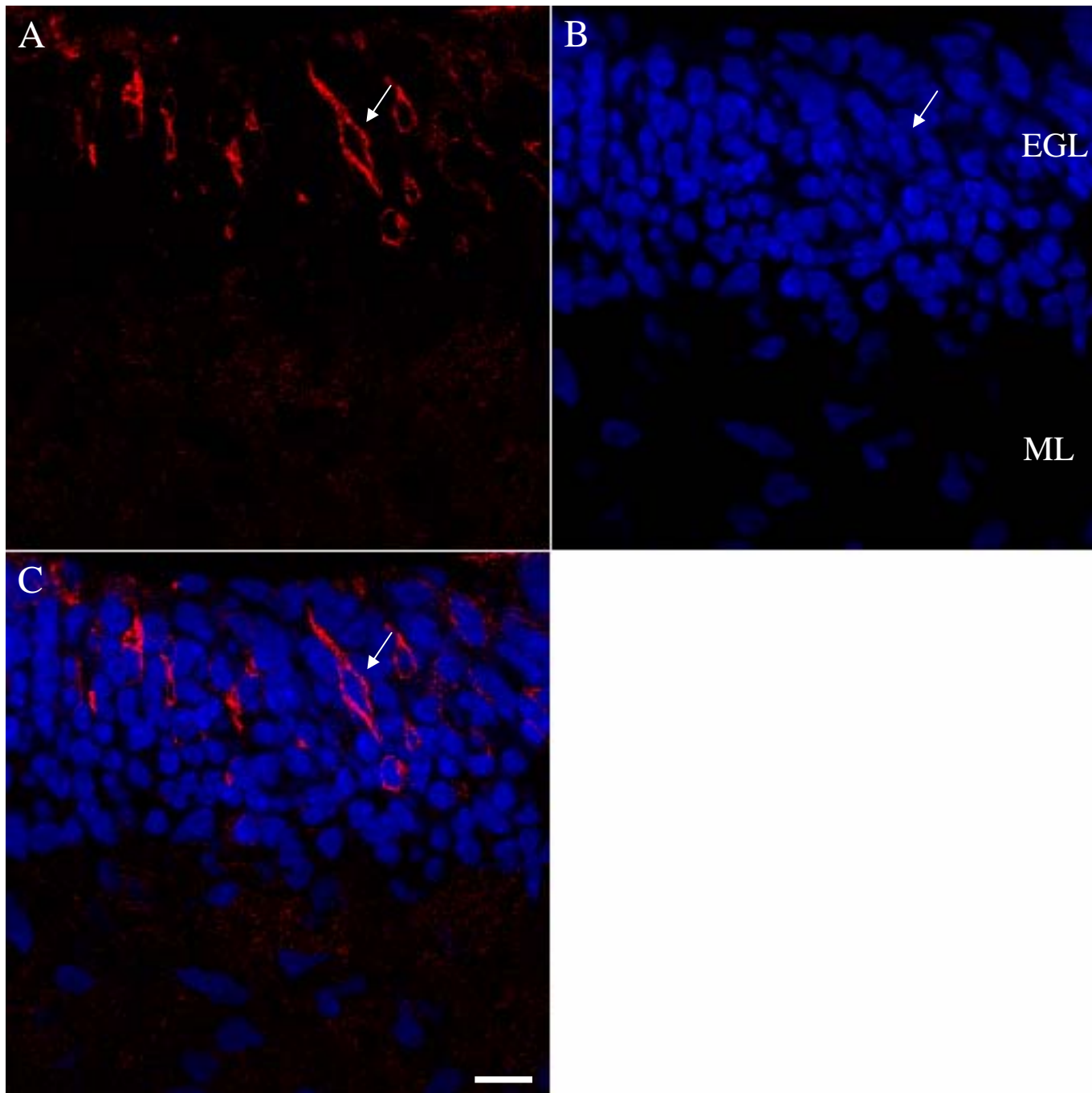


Figura 9. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo de rato P14 que recebeu injeções intraventriculares de mAb Jones por 7 dias. (A) Imunomarcação *in vivo* com mAb Jones (vermelho). (B) Núcleos contra-corados com TO-PRO3 (azul) (C) Sobreposição das imagens (A) e (B). A seta branca indica uma célula com perfil migratório na EGL expressando o 9-O-acetil GD3. Barra de calibração 10 μ m.

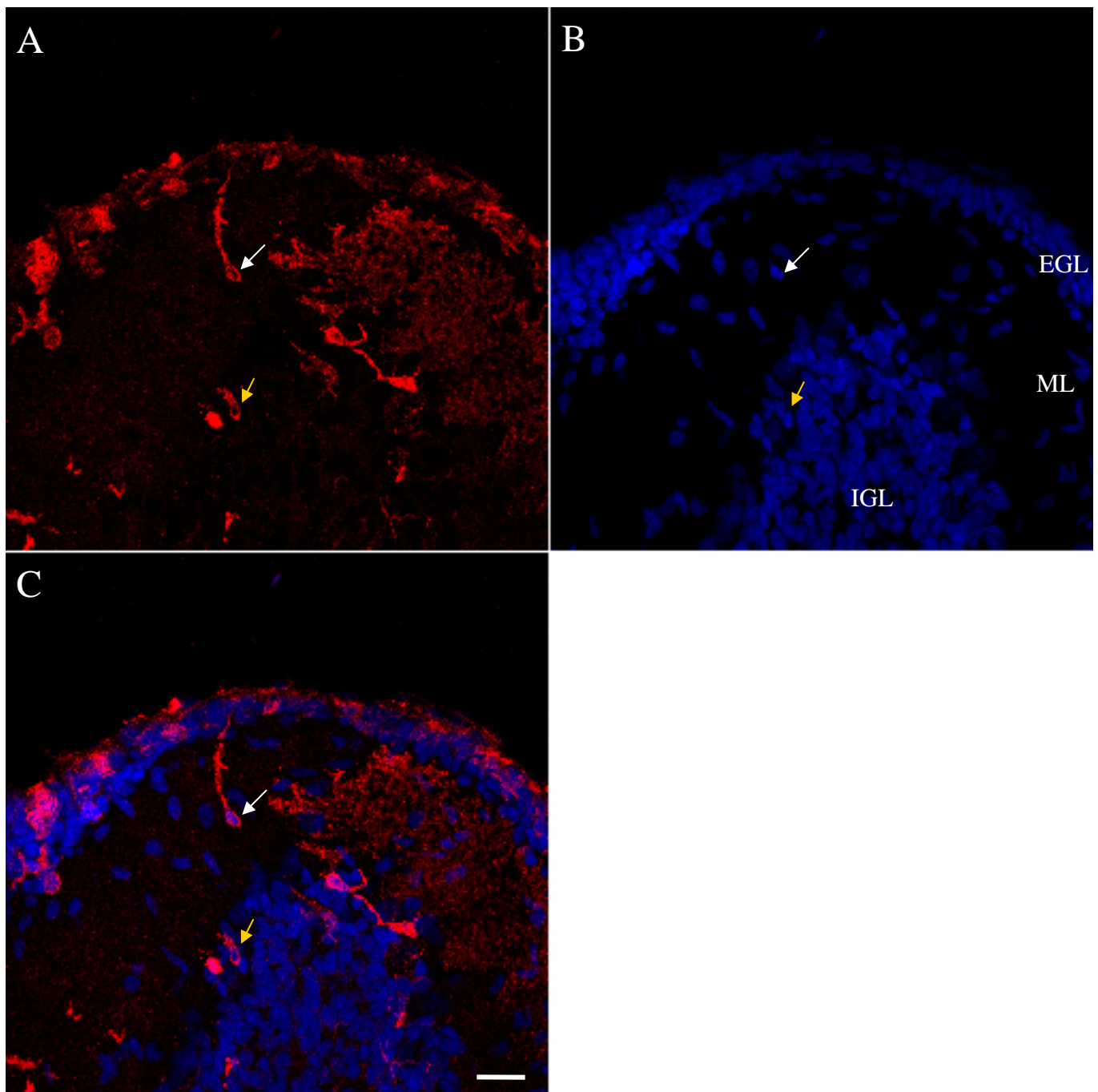


Figura 10. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo rato P14 imunobloqueado cronicamente com mAb. (A) Imunomarcacão *in vivo* com Jones (vermelho). (B) Contra-coloraco de núcleos, TO-PRO3 (azul). (C) Sobreposico das imagens (A) e (B). A seta branca indica uma célula com perfil migratório na ML e a seta amarela indica uma célula com perfil migratório chegando à IGL. Barra de calibrao 20µm.

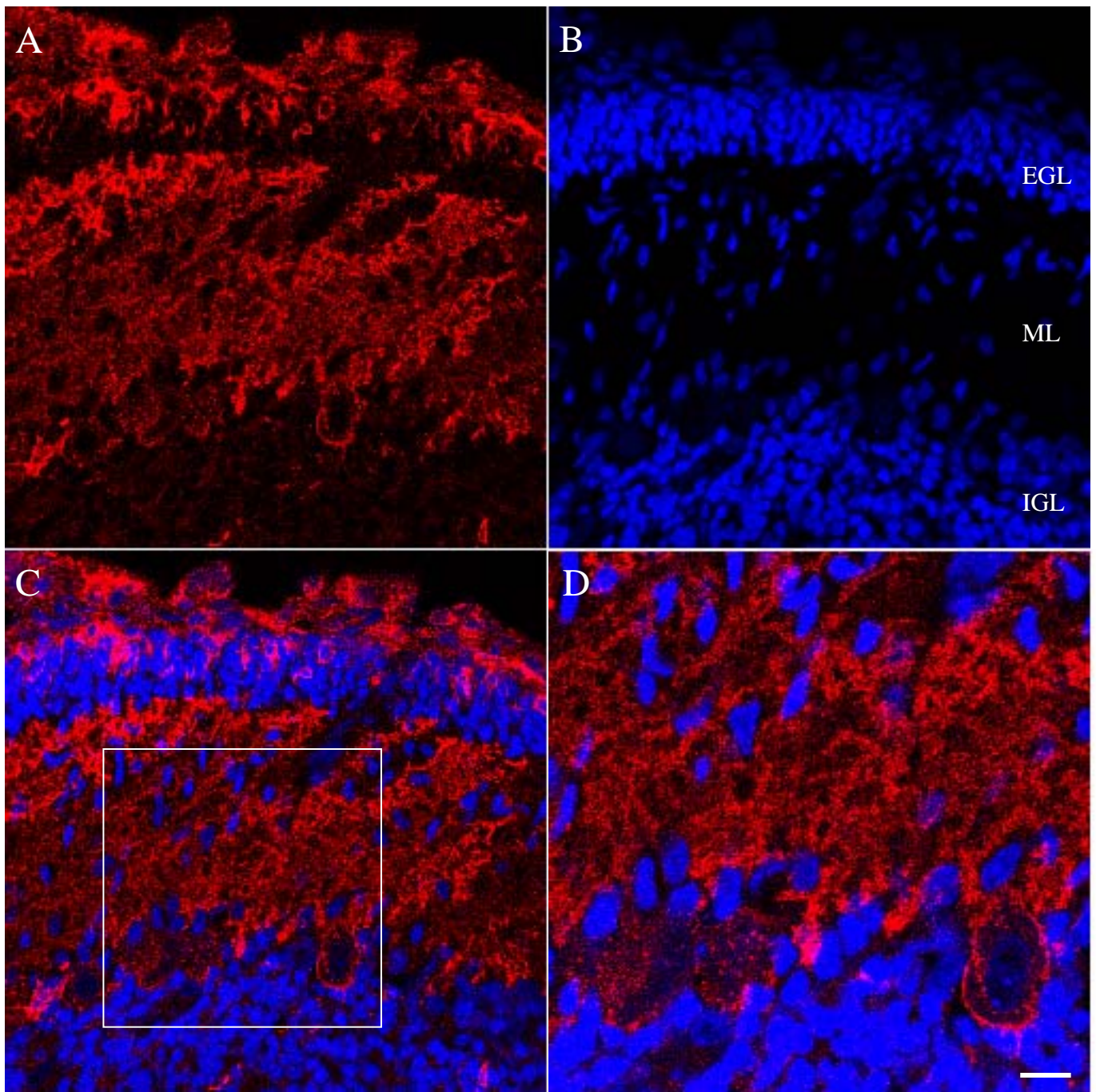


Figura 11. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo de rato P14 imunobloqueado cronicamente com mAb Jones. (A) Imunomarcacão *in vivo* com Jones (vermelho) exibindo forte expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células de Purkinje. **(B)** Contra-coloraco de núcleos, TO-PRO3 (azul). **(C)** Sobreposio das imagens (A) e (B). A imagem **(D)** representa o quadrado branco em (C) em maior aumento. Barra de calibrao A, B e C 20µm; D 10µm.

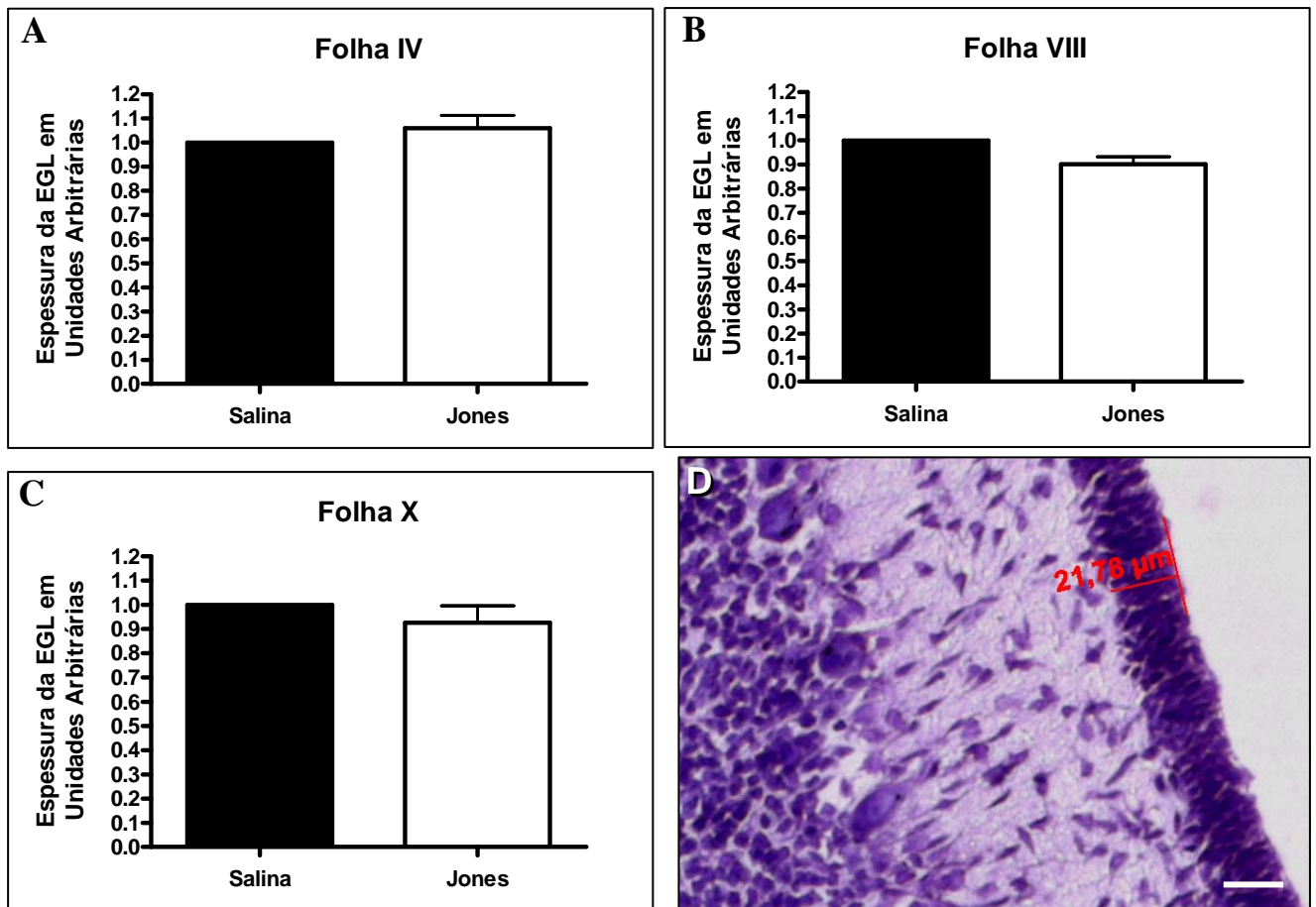


Figura 12. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na espessura da camada granular externa. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=4). (D) Imagem obtida por microscopia de campo claro de um corte parassagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios morfométricos utilizados para determinar a espessura da EGL. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 20 μm .

Essa análise foi realizada em 3 folhas distintas: na folha IV o acréscimo foi de 22,07% ($p=0,0242$); na folha VIII de 23,58% ($p=0,0046$) e na folha X de 31,87% ($p=0,0044$) (número de cortes quantificados por animal = 8; $n=3$) (**Figura 13**). Esse acréscimo também é observado quando comparamos ratos que receberam injeções de Jones com ratos que receberam injeções do anticorpo A2B5: 52,20% ($p=0,0087$) na folha IV; 26,04% ($p=0,0400$) na folha 8 e 32,12% ($p=0,0093$) na folha X (número de cortes quantificados por animal = 8; $n=3$). Não há diferença significativa na densidade celular da EGL entre ratos que receberam injeção de solução salina e os que receberam A2B5 (número de cortes quantificados por animal = 8; $n=3$) (**Figura 13**).

4.3. Não há alteração na proliferação celular da EGL de ratos que sofreram imunobloqueio crônico com mAb Jones:

Apesar da grande maioria das células na EGL marcarem com o mAb Jones, em um corte de cerebelo de rato injetado com o anticorpo Jones, foi flagrada uma célula, aparentemente em telófase, que não expressa o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 (**Figura 14**).

Para averiguar se o imunobloqueio crônico com mAb Jones interfere com número de células proliferativas na EGL marcamos com Ki67 cortes de parassagitais de cerebelo de animais cronicamente imunobloqueados. Foi verificado que não há diferença significativa no número de células proliferativas na EGL de ratos que receberam solução salina e ratos que receberam o mAb Jones (número de cortes quantificados por animal = 4; $n=3$) (**Figura 15 e 16**).

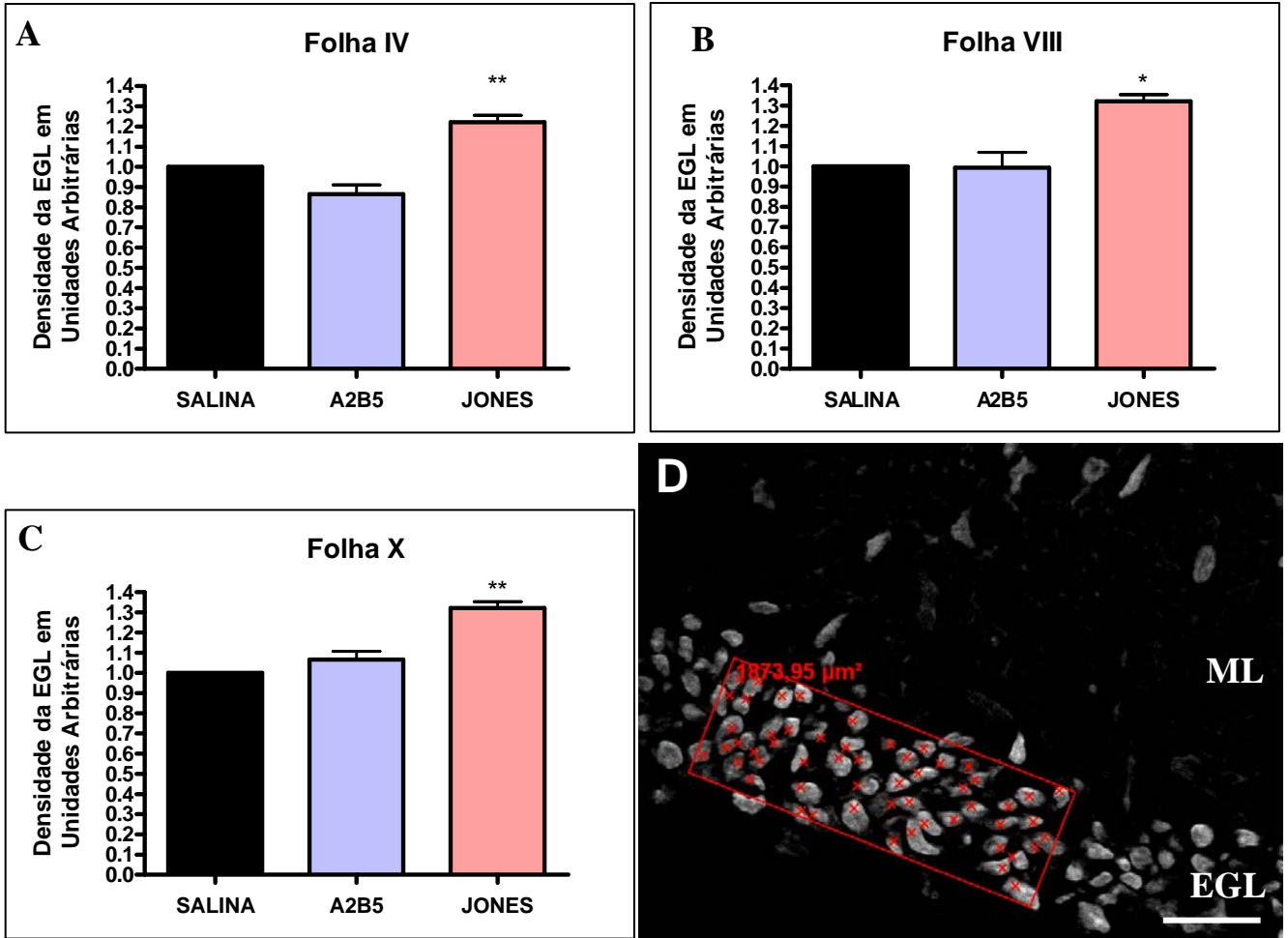


Figura 13. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na densidade de células na camada granular externa. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=3). (D) Corte óptico de 1 μm de espessura obtido em microscópio de fluorescência equipado com o sistema ApoTome. Essa imagem foi obtida a partir um corte sagital cerebelar contra-corado com bisbenzimida. Observe na imagem os critérios morfométricos utilizados para determinar a densidade de células na EGL. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. * $p < 0.05$. Barra de calibração: 20 μm .

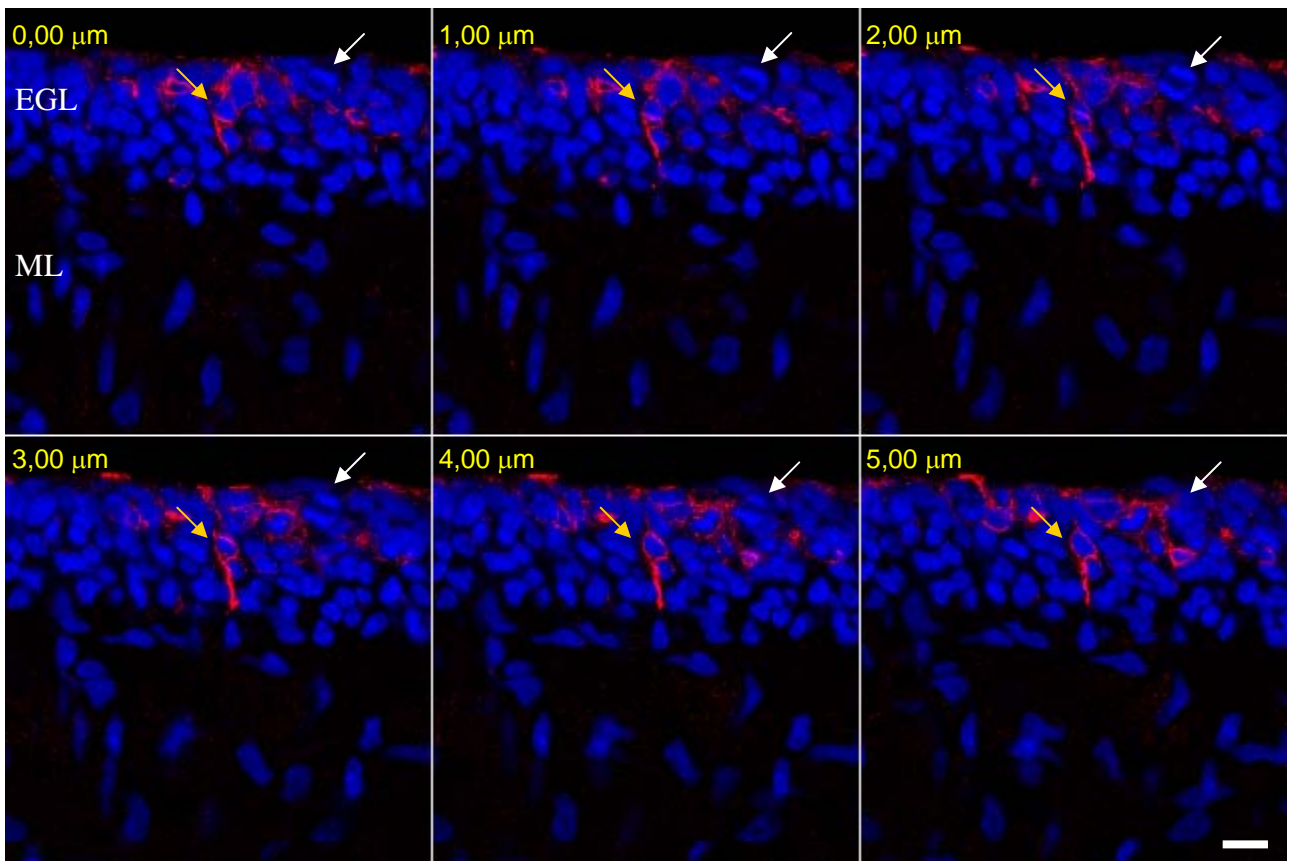


Figura 14. Cortes tomográficos obtidos através de microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo rato P14 imunobloqueado cronicamente. As setas brancas exibem imagens de uma célula em mitose e as setas amarelas indicam imagens de uma célula migratória, ambas, em diferentes planos focais. O corte foi imunomarcado *in vivo* com Jones (vermelho) e contra corado com TO-PRO3 (azul). Observe que a célula em mitose não expressa o 9-O-acetil GD3 mas a célula migratória sim. Barra de calibração 10μm.

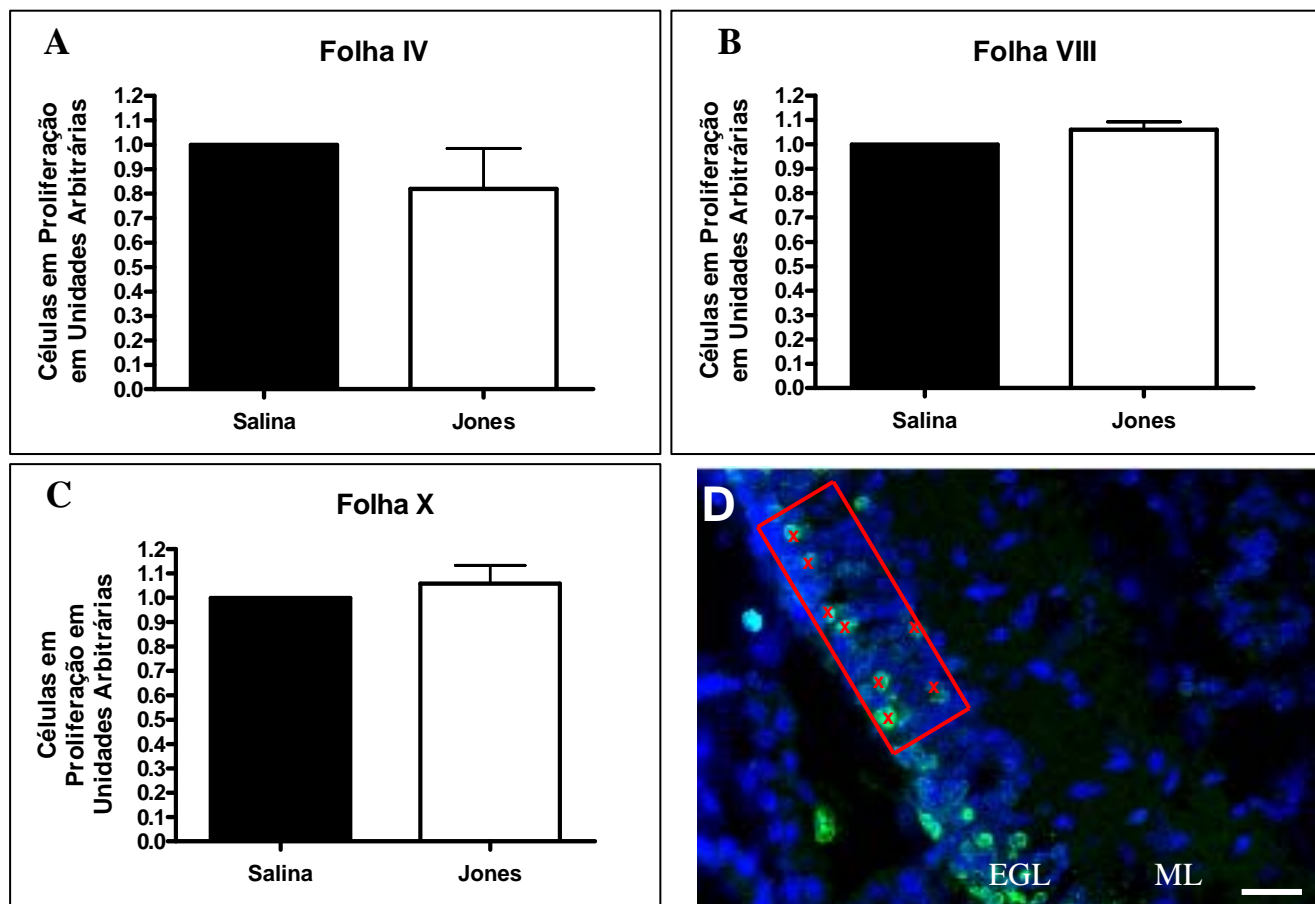


Figura 15. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones sobre a proliferação celular na camada granular externa. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=3). (D) Imagem obtida por microscopia de fluorescência de um corte sagital cerebelar contra-corado com bisbenzímida (azul) e imunomarcado com Ki67 (verde) demonstrando os critérios utilizados para determinar o número de células marcadas com o antígeno associado a proliferação (Ki67). Para análise estatística foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 20µm.

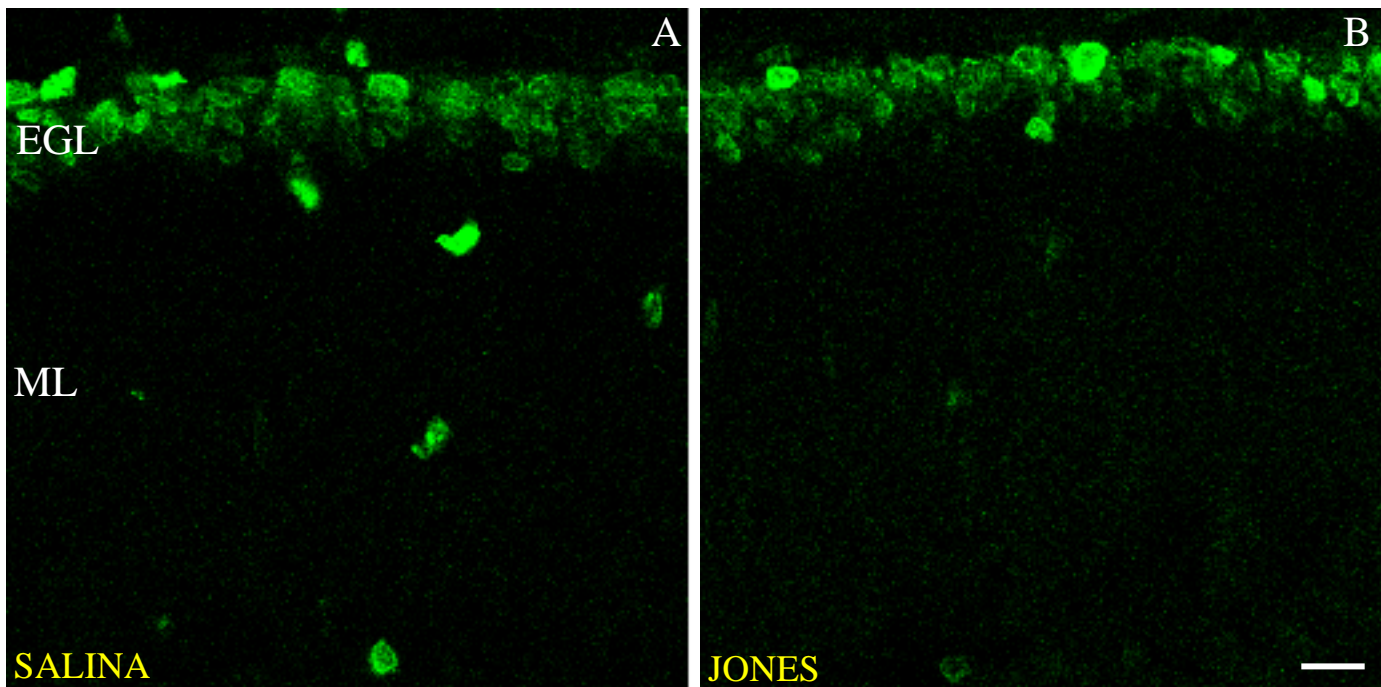


Figura 16. Imagens obtidas por microscopia confocal de cortes parassagitais de cerebelo de ratos P14 imunomarcados com ki67. (A) Corte parassagital de rato que recebeu injeções intracerebroventriculares de solução salina durante 7 dias. (B) Corte parassagital de rato que recebeu injeções intracerebroventriculares de Jones durante 7 dias. Note que aparentemente não há diferenças entre as condições estudadas com relação ao número de células ki67-positivas. Barra de calibração 10 μ m.

4.4. Não há diferença significativa na espessura da camada molecular entre ratos que receberam mAb Jones e ratos que receberam solução salina:

Foi quantificada a espessura da ML em ratos que sofreram imunobloqueio crônico com Jones e em ratos que receberam injeção de solução salina e não obtivemos diferença significativa entre os respectivos grupos (número de cortes quantificados por animal = 16; n=4) (**Figura 17**).

4.5. Ratos imunobloqueados cronicamente possuem maior proporção de células com perfil estacionário e menor proporção de células com perfil migratório na camada molecular:

Para avaliar a influência do imunobloqueio crônico com mAb Jones, foi quantificado o número de células na camada molecular em três folhas diferentes, IV, VII e X.

Foi verificado que não há diferença no número de células totais na ML entre as condições estudadas (número de cortes quantificados por animal = 16; n=4) (**Figura 18**). Para refinarmos a análise, segregamos as contagens na porcentagem de células com perfil estacionário (**Figura 19**) e migratório (**Figura 20**) pelo total de células em uma área pré determinada.

Foi observado em ratos imunobloqueados com mAb Jones um acréscimo significativo na porcentagem de células estacionárias em comparação aos animais que receberam solução salina. Esse acréscimo foi de 21,47% ($p=0,0274$) na folha IV; de 16,28% ($p=0,0200$) na folha VIII e de 29,00% ($p=0,0243$) na folha X (número de cortes quantificados por animal = 16; n=4) (**Figura 19**).

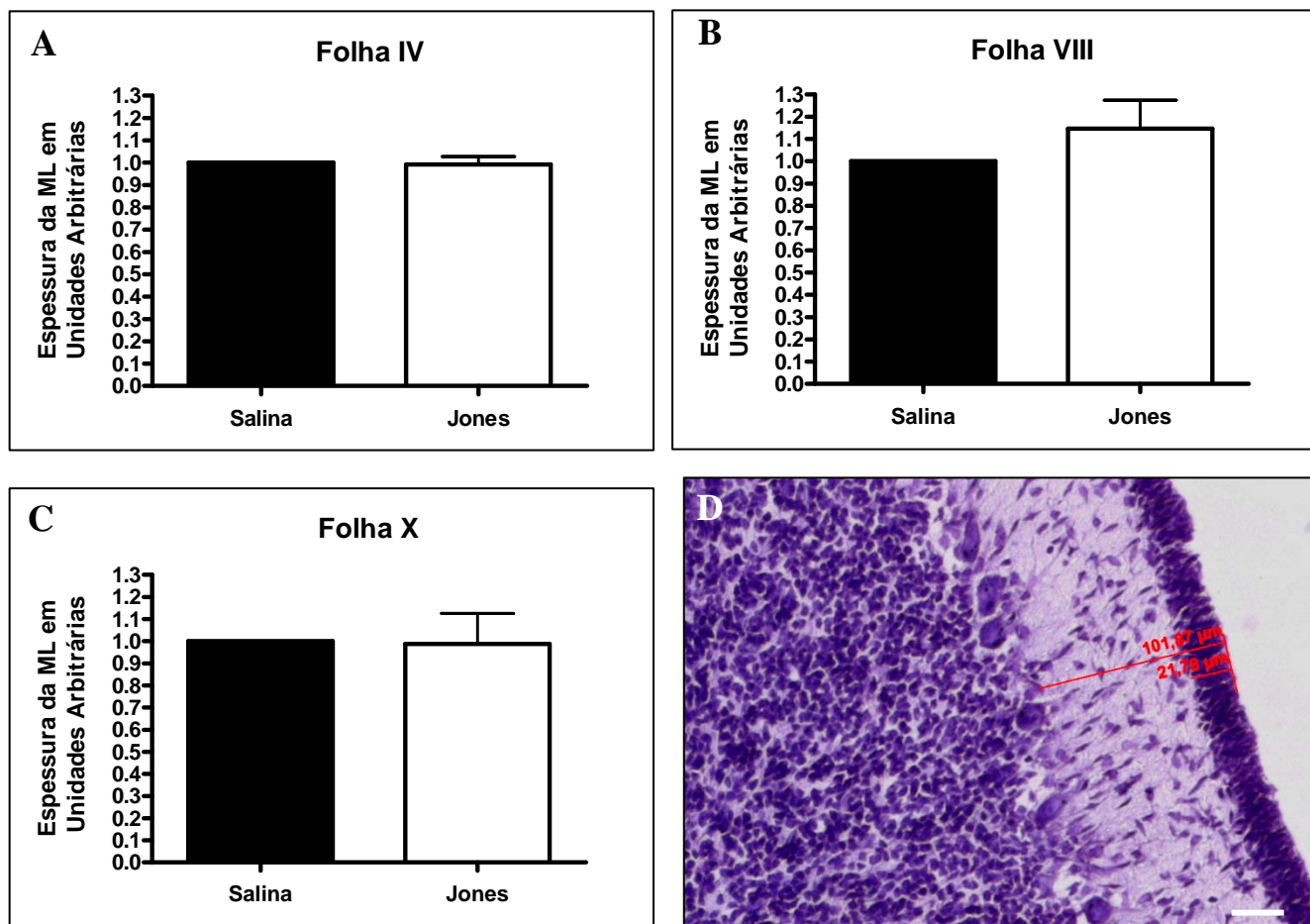


Figura 17. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na espessura da camada molecular. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=3). (D) Imagem adquirida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios morfométricos utilizados para aferência da espessura. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 20µm.

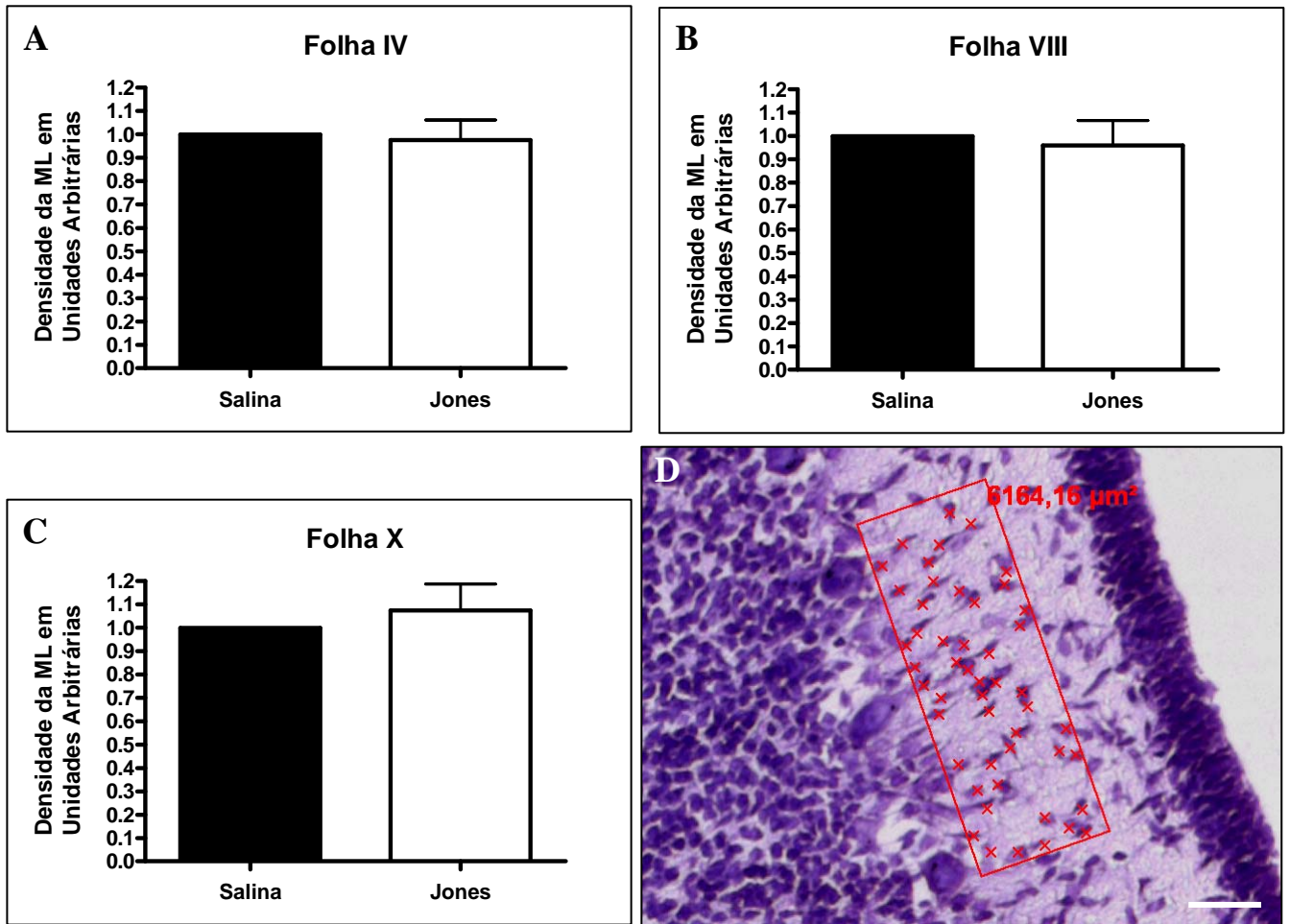


Figura 18. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na densidade de células da camada molecular. A quantificação foi realizada nas folhas IV(A), VIII(B) e X(C) (n=4). (D) Imagem adquirida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios utilizados para a quantificação. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 20 μm .

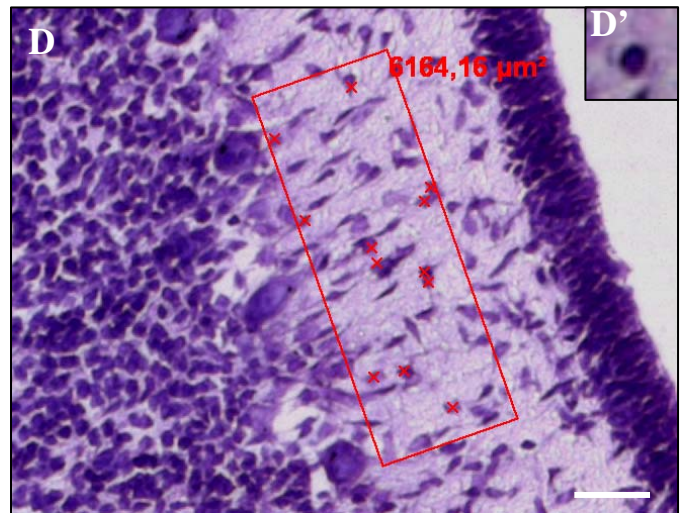
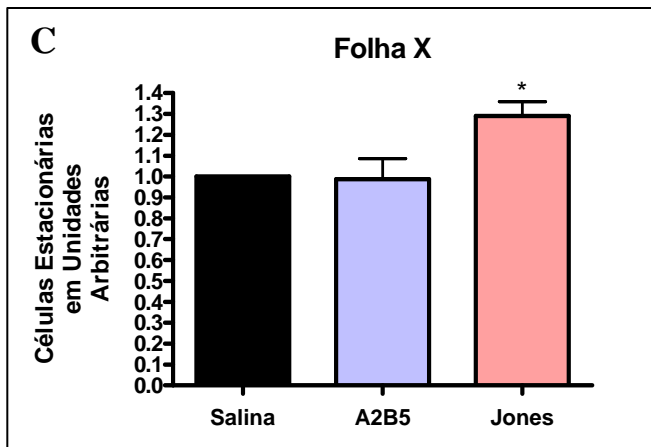
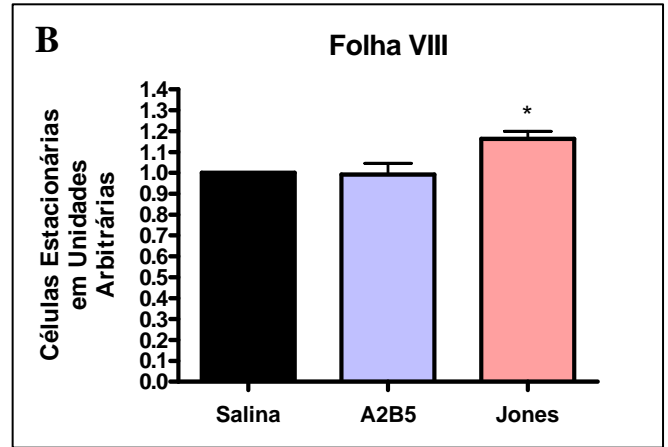
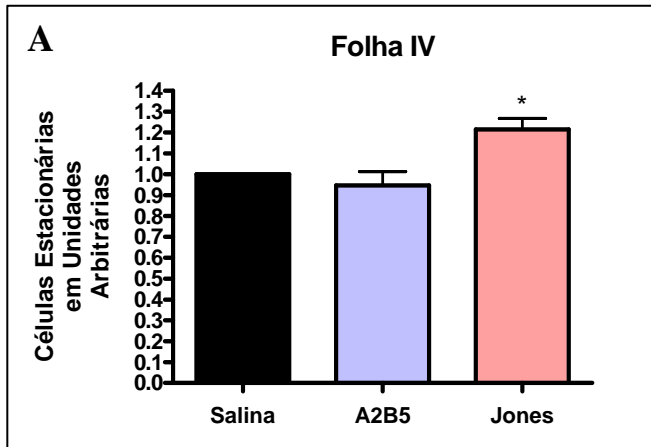


Figura 19. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones no número de células estacionárias sobre o total de células na camada molecular. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=4). (D) Imagem obtida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios utilizados para as quantificações das células estacionárias. (D') Imagem em maior aumento mostrando a morfologia típica de células estacionárias. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. * $p < 0.05$. Barra de calibração: 20 μ m.

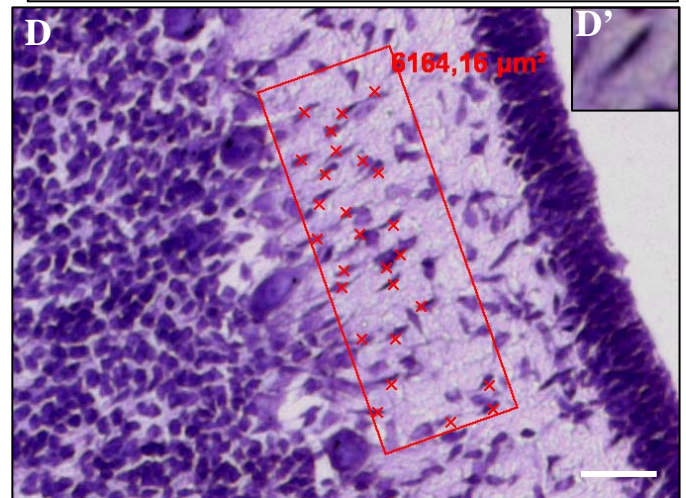
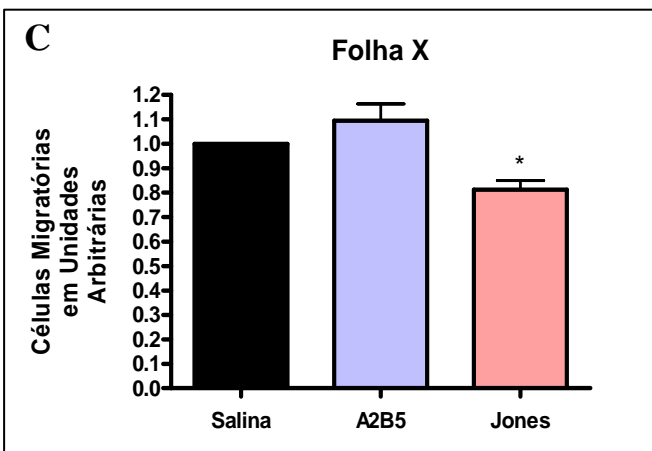
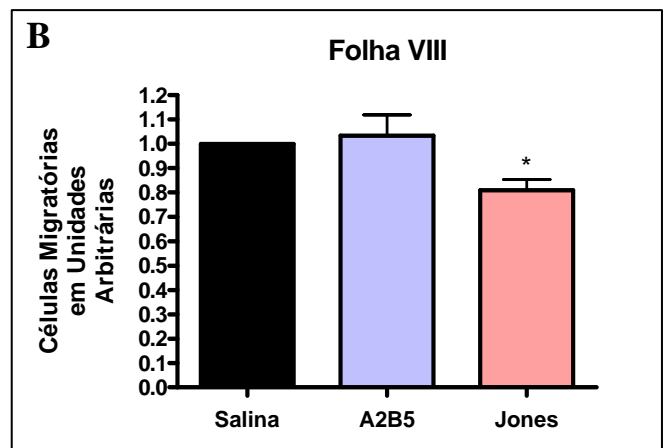
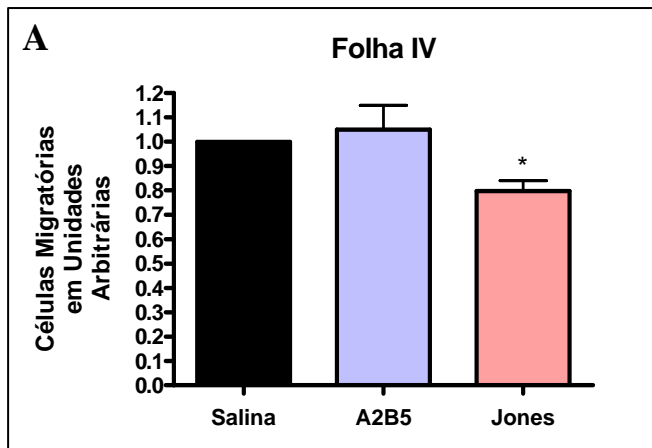


Figura 20. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones no número de células migratórias na camada molecular. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=4). **D.** Imagem adquirida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios utilizados para a quantificação das células migratórias. (**D'**) Imagem em maior aumento mostrando a morfologia típica de células migratórias. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. * p< 0.05. Barra de calibração: 20μm.

Também foi verificada uma diferença similar quando comparamos os ratos imunobloqueados com mAb Jones e ratos que receberam o anticorpo A2B5. Ratos imunobloqueados com Jones apresentaram um acréscimo na proporção de células estacionárias de 29,30% ($p=0,0127$) na folha IV; 23,82% ($p=0,0120$) na folha VIII e 29,80% ($p=0,0143$) na folha X em comparação com ratos que receberam o A2B5 (número de cortes quantificados por animal = 16; $n=4$).

Além disso foi observado que não há diferença significativa quando comparamos ratos que receberam solução salina e ratos que receberam o A2B5 (número de cortes quantificados por animal = 16; $n=4$) (**Figura 19**).

Quando avaliamos o número de células com perfil migratório entre ratos que receberam solução salina e os que receberam mAb Jones, observamos um decréscimo significativo na porcentagem desse perfil celular em ratos imunobloqueados com mAb Jones de 20,25% ($p=0,0178$), 19,06% ($p=0,0230$) e 18,76% ($p=0,0151$) nas folhas IV, VIII e X, respectivamente (número de cortes quantificados por animal = 16; $n=4$) (**Figura 20**). O mesmo foi observado quando comparamos ratos que receberam os anticorpos A2B5 e Jones.

Estes obtiveram um decréscimo de 19,73% ($p=0,0108$); 22,27% ($p=0,0163$) e 24,96% ($p=0,0082$) nas folhas IV, VIII e X, respectivamente, em relação àqueles (n interno = 16; $n=4$). Quando comparamos ratos que receberam solução salina e ratos que receberam o anticorpo A2B5 não encontramos diferença significativa (número de cortes quantificados por animal = 16; $n=4$) (**Figura 20**).

4.6. Não há diferença significativa na espessura, área e densidade da camada granular interna entre ratos que receberam mAb Jones e ratos que receberam solução salina:

A imunohistoquímica *in vivo* também revelou células com perfil migratório chegando à IGL (**Figura 21**).

Foi avaliada a possibilidade dos ratos imunobloqueados com mAb Jones possuírem uma IGL mais estreita, ou com uma menor área, porém, através do mesmo teste de análise estatística usado anteriormente, não foi observada diferença significativa entre os dois grupos estudados (número de cortes quantificados por animal = 16; n=4) (**Figura 22 e 23**).

Então avaliamos a possibilidade da IGL de ratos imunobloqueados possuírem uma menor densidade celular, como o observado na EGL. Esse valor foi quantificado em tecido corado com bisbenzimidazina através de cortes ópticos de 1µm de espessura, realizados no microscópio ApoTome, e não observamos diferença significativa entre os grupos estudados (número de cortes quantificados por animal = 8; n=3). (**Figura 24**).

4.7. Não há diferença significativa na área ocupada pela substância branca entre ratos imunobloqueados cronicamente com mAb Jones e ratos que receberam solução salina:

Também foi observamos células migratórias expressando o 9-O-acetil GD3 na substância branca do cerebelo em desenvolvimento (**Figura 21**).

Foi avaliada a possibilidade de haver alguma alteração na área ocupada pela substância branca cerebelar. Comparando o grupo experimental (mAb Jones) com os grupos controle (A2B5 e Salina) não observamos diferenças significativas (número de cortes quantificados por animal = 16; n=4) (**Figura 25**).

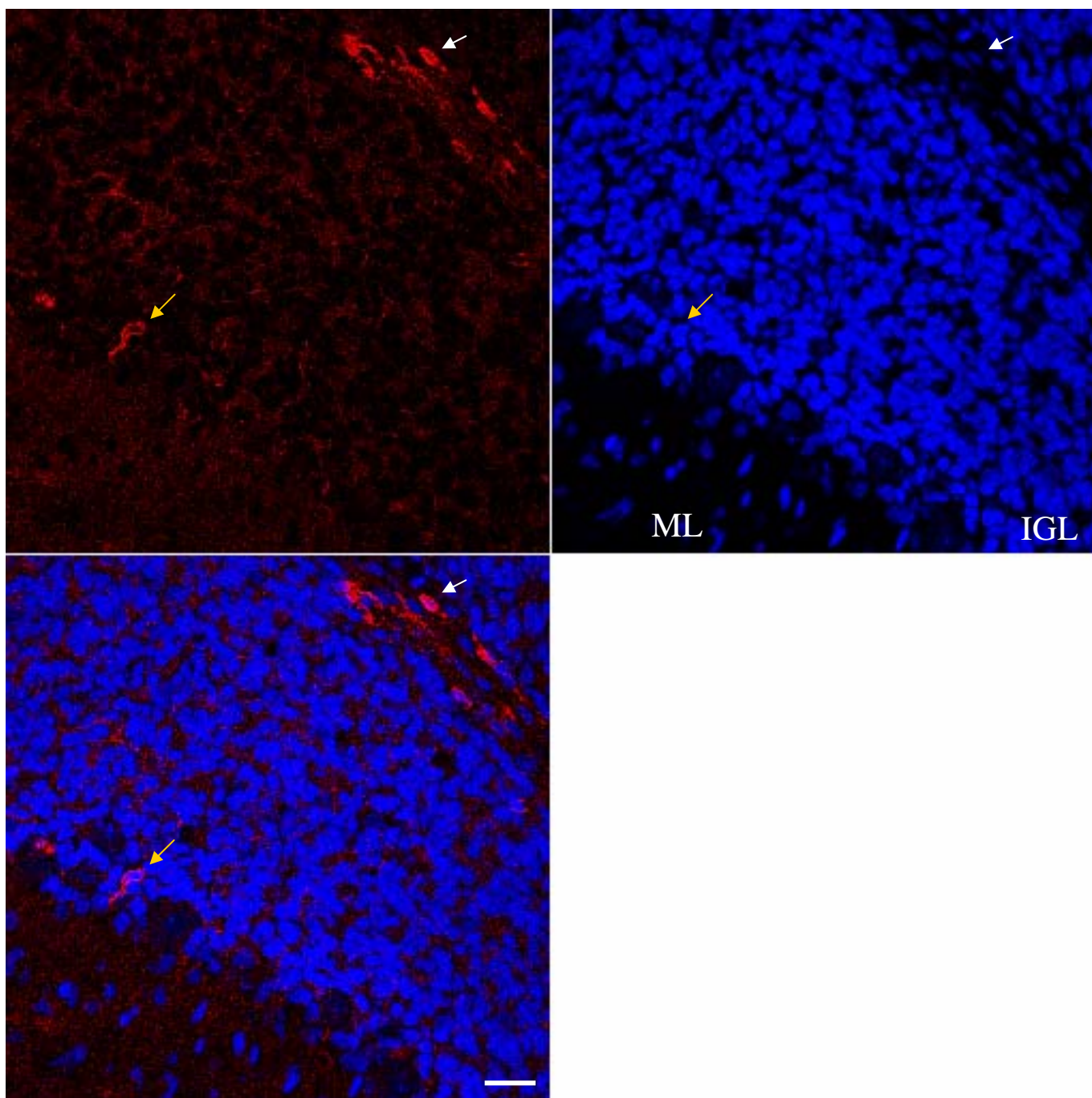


Figura 21. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo de rato P14 que sofreu o imunobloqueio crônico. (A) Imunomarcção *in vivo* com Jones (vermelho). (B) Contra-coloração de núcleo, TO-PRO3 (azul) (C) Sobreposição das imagens (A) e (B). A seta branca indica célula com perfil migratório na substância branca e a seta amarela indica célula com perfil migratório chegando à IGL. Barra de calibração 20 μ m.

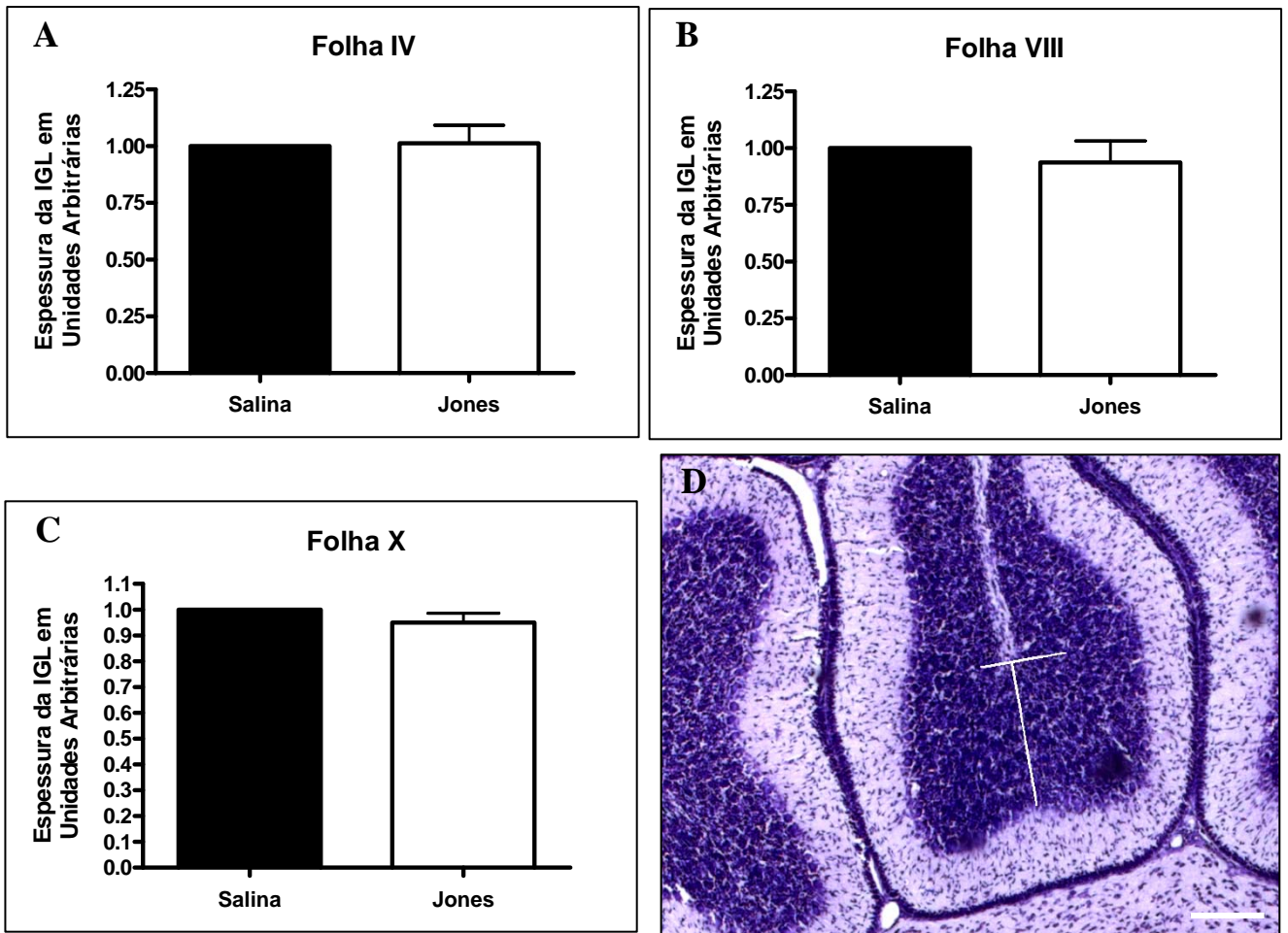


Figura 22. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na espessura da camada granular interna. A quantificação foi realizada nas folhas IV(A), VIII(B) e X(C) (n=4). (D) Imagem adquirida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios utilizados para aferir a espessura da IGL. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 40µm.

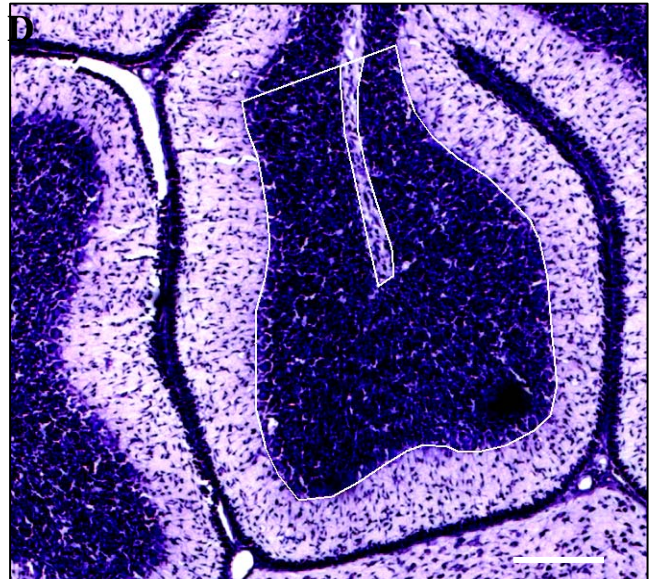
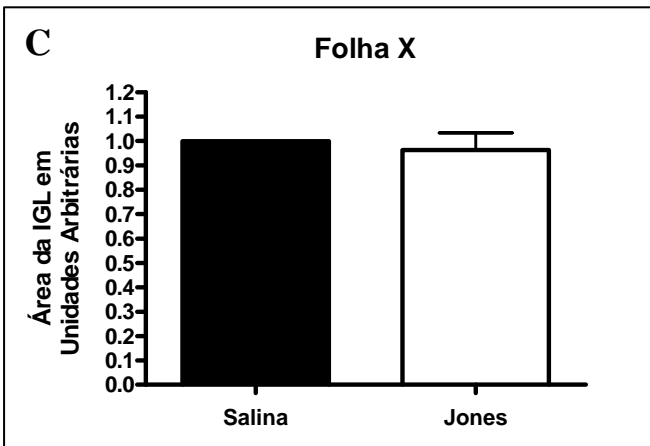
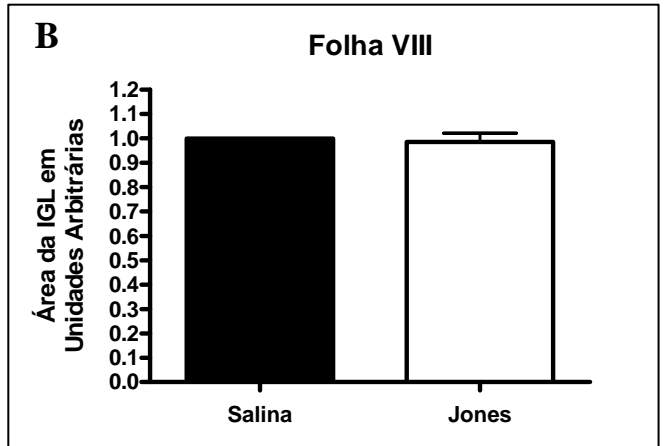
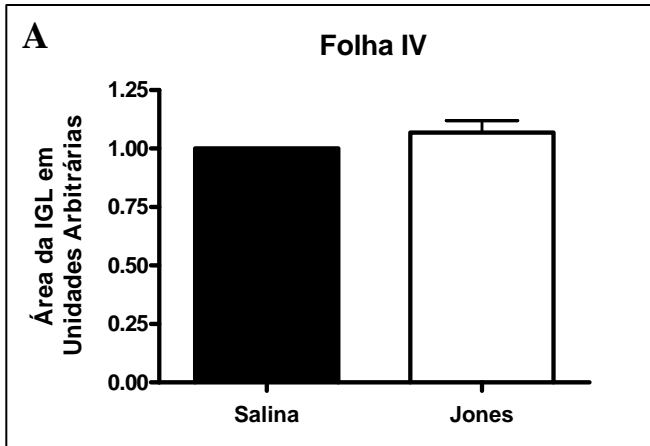


Figura 23. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na área da camada granular interna. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=4). (D) Imagem adquirida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios utilizados para a quantificação. Para essa análise foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 40 μ m.

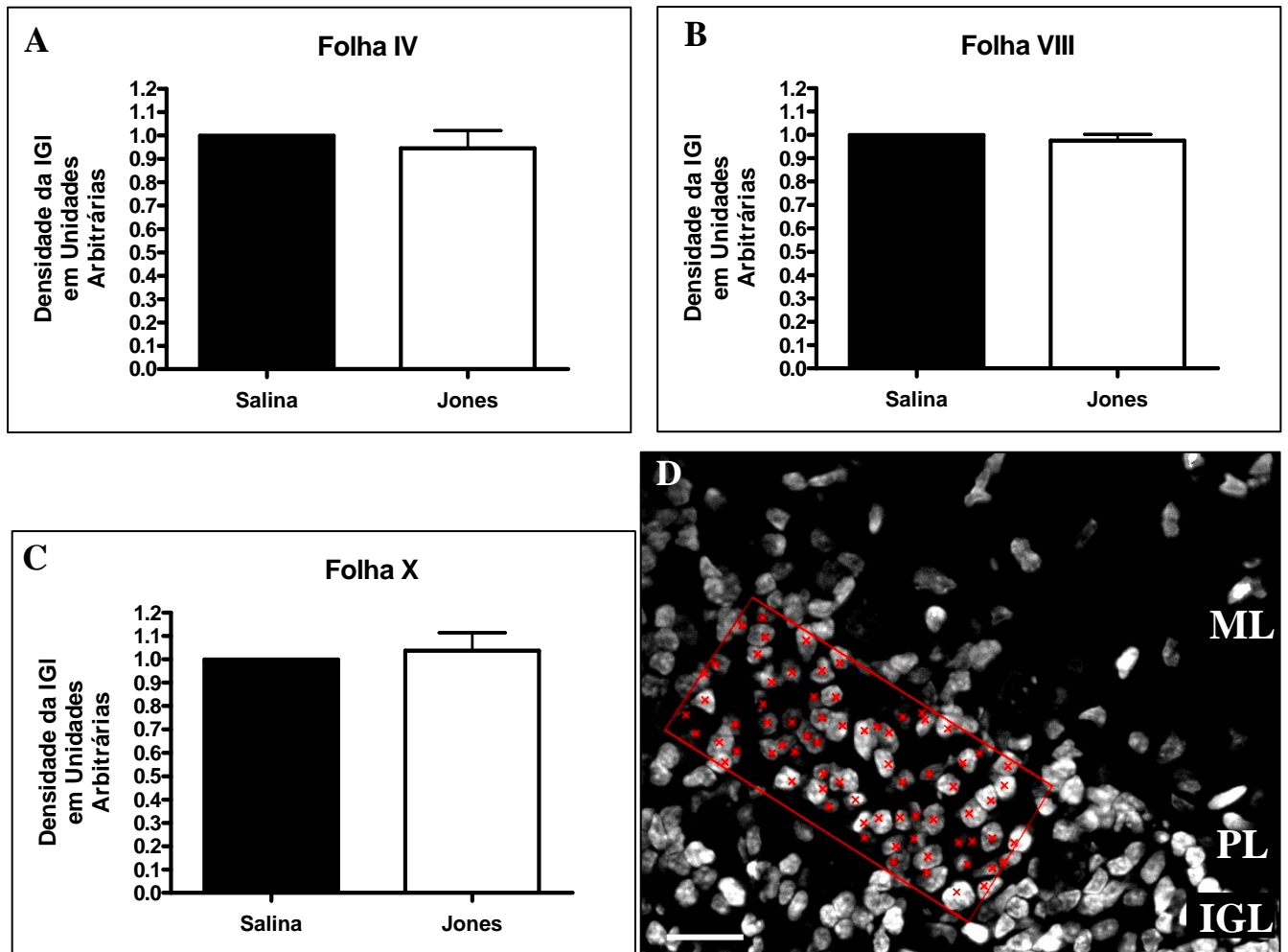


Figura 24. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na densidade de células na camada granular interna. A quantificação foi realizada nas folhas IV (A), VIII (B) e X (C) (n=3). (D) Corte óptico de 1µm de espessura obtido em microscópio de fluorescência equipado com o sistema ApoTome. Essa imagem foi obtida a partir um corte sagital cerebelar contra-corado com bisbenzimidida. Observe na imagem os critérios morfométricos utilizados para determinar a densidade de células na IGL. Para análise estatística foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 10µm.

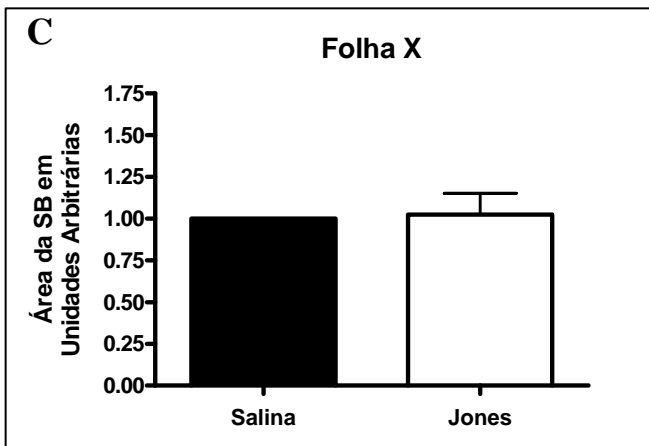
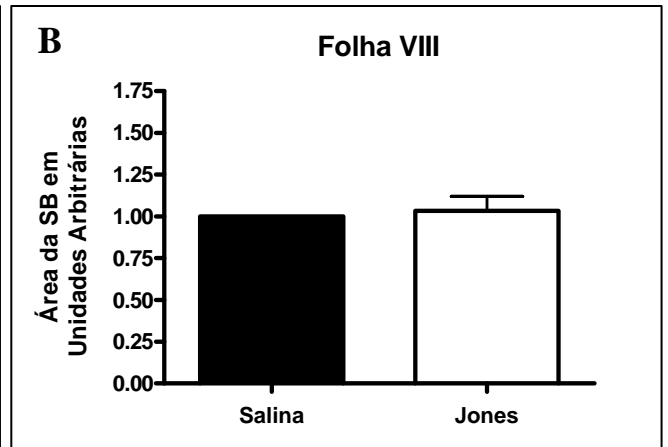
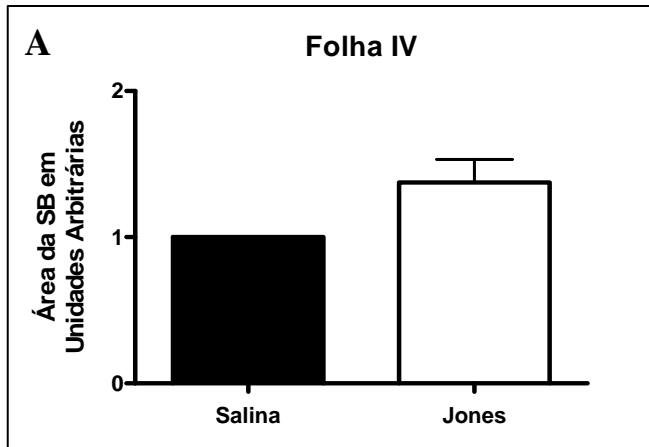


Figura 25. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones na área da substância branca. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=3). (D) Imagem adquirida por microscopia de campo claro de um corte sagital cerebelar corado com Cresil Violeta demonstrando os critérios utilizados para a aferir a área. Para essa análise foi utilizado o teste-t. Barra de calibração: 20 μ m.

4.8. Não há alteração no número de fibras gliais entre ratos que receberam mAb

Jones e ratos que receberam solução salina:

Foi também verificado que é possível observar a marcação do Jones em fibras gliais através de imunohistoquímica *in situ* (**Figura 26**). Porém, não é possível observar o mesmo padrão de marcação através da imunohistoquímica *in vivo* em ratos que sofreram imunobloqueio crônico. Nesses ratos, só é possível observar a expressão do 9-O-acetil GD3 em fibras gliais através de imunohistoquímica *in situ* (**Figura 27**).

Foi avaliado se o imunobloqueio crônico com mAb Jones interfere no número ou na morfologia de fibras gliais que servem de apoio para a migração das células granulares.

Foi verificado que não há alteração na morfologia dessas células, como também não há diferença significativa no número de fibras gliais entre o grupo controle e o grupo que recebeu injeções do mAb Jones (número de cortes quantificados por animal; n=3) (**Figura 28 e 29**).

4.9. A expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células de Purkinje

Foi observada forte expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células Purkinje em ratos P7 e P14. Foi verificado que a marcação com anti-CD60b revela a presença do glicosídeo 9-O-acetil GD3 tanto na arborização dendrítica, no corpo celular e, provavelmente, em seus axônios (**Figura 30**).

Em dupla marcação com anti-CD60b e anti-calbindina é fácil observar uma forte co-localização do 9-O-acetil GD3 com a calbindina em rato P14 (**Figura 31**), porém existem células positivas apenas para CD60b ou apenas positivas para calbindina (**Figura 32**).

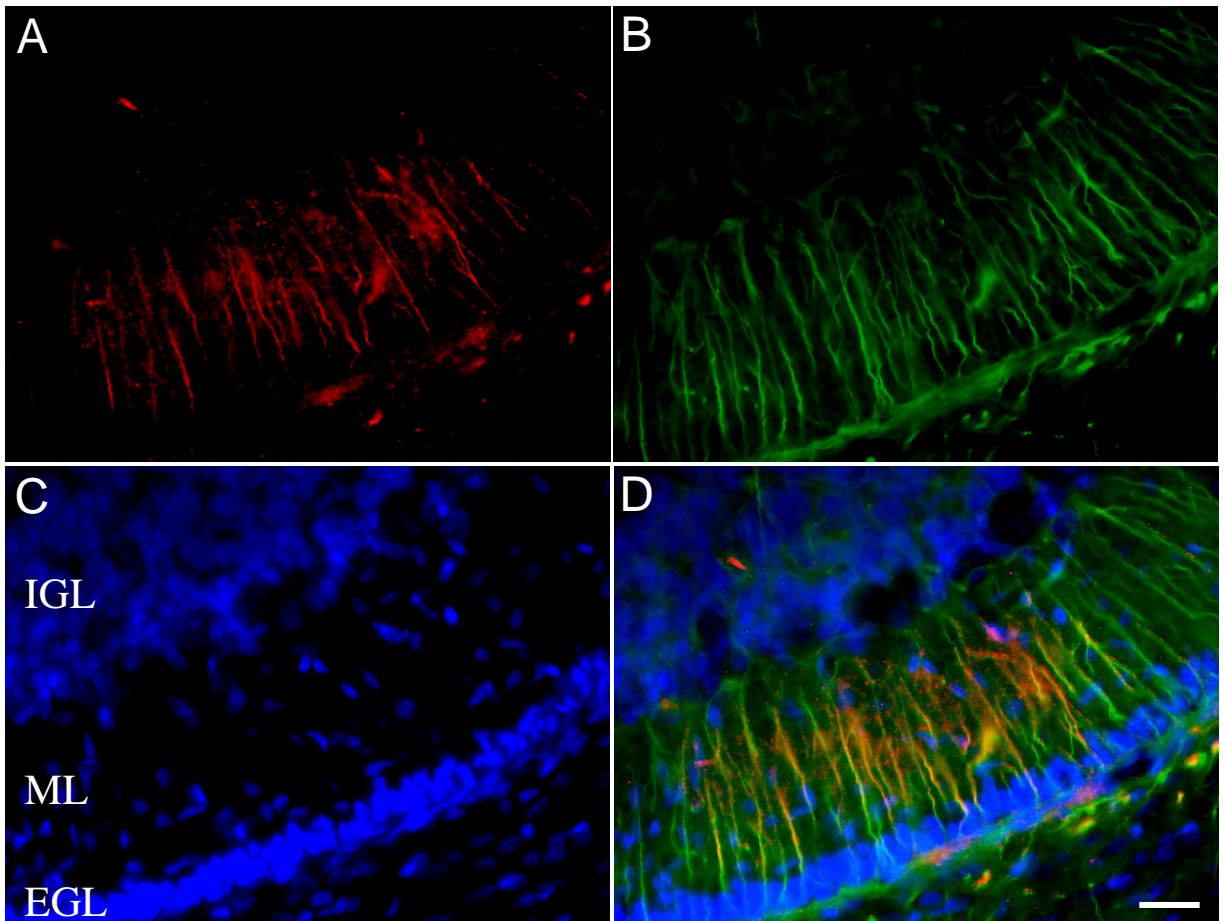


Figura 26. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de corte parasagital cerebelar de rato P14. (A) Imunomarcção com Jones (vermelho). **(B)** Imunomarcção com anti-nestina (verde). **(C)** Contra-coloração de núcleo, bisbenzimidá (azul) **(D)** Sobreposição das imagens (A), (B) e (C). Note em **(D)** a co-localização dos dois marcadores sugerindo a expressão do 9-O-acetil GD3 na glia radial. Barra de calibração 20 μ m.

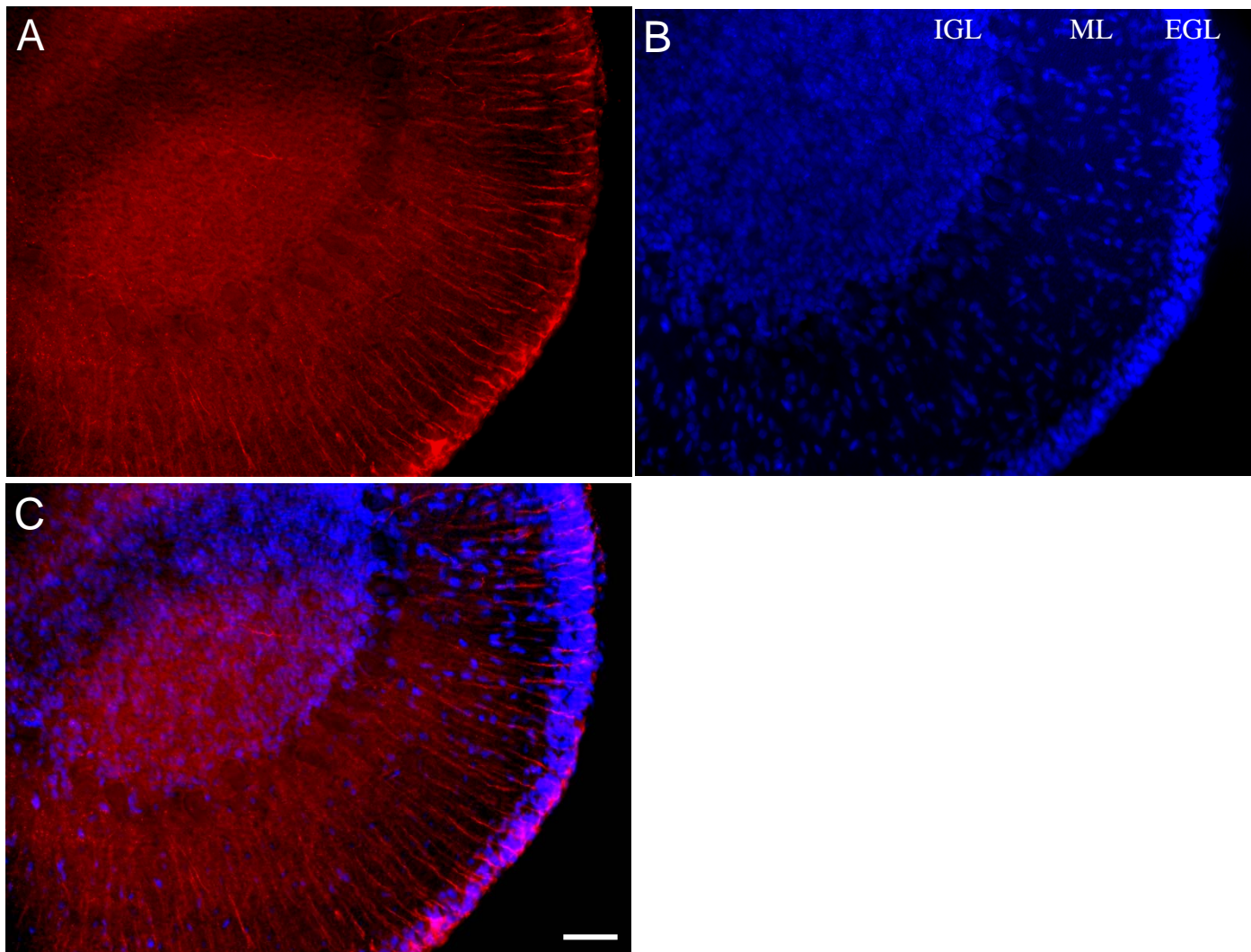


Figura 27. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de corte parassagital cerebelar de rato P14 imunobloqueado cronicamente. (A) Imunomarcção com Jones (vermelho). (B) Contra-coloração de núcleo, bisbenzimidida (azul) (C) Sobreposição das imagens (A) e (B). Barra de calibração 40µm.

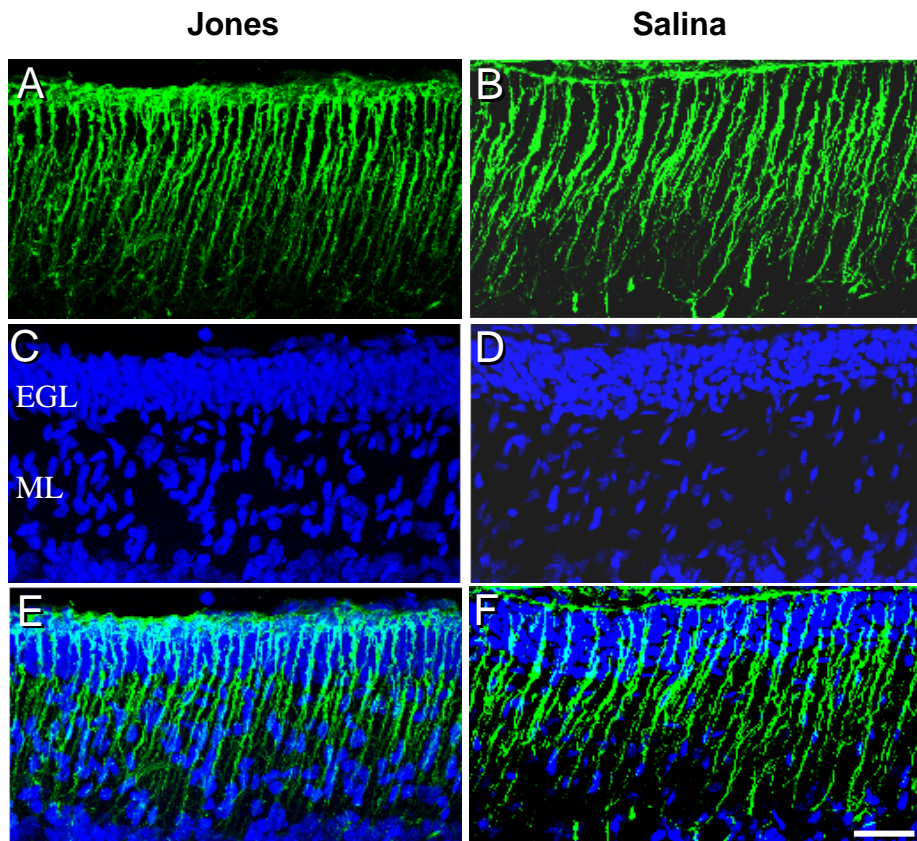


Figura 28. Imagens obtidas por microscopia confocal de cortes parassagitais de ratos P14. (A, C e E) Corte parassagital de rato P14 imunobloqueado cronicamente com mAb Jones, imunomarcado com anti-nestina (verde - A) e contra corado com TO-PRO3 (azul - C). (B, D e F) Corte parassagital de rato P14 que recebeu injeções de solução salina imunomarcado com anti-nestina (verde - B) e contra corado com TO-PRO3 (azul - D). (E e F) Representam a sobreposições das imagens (A e C) e (B e D) respectivamente. Barra de calibração: 20 μ m.

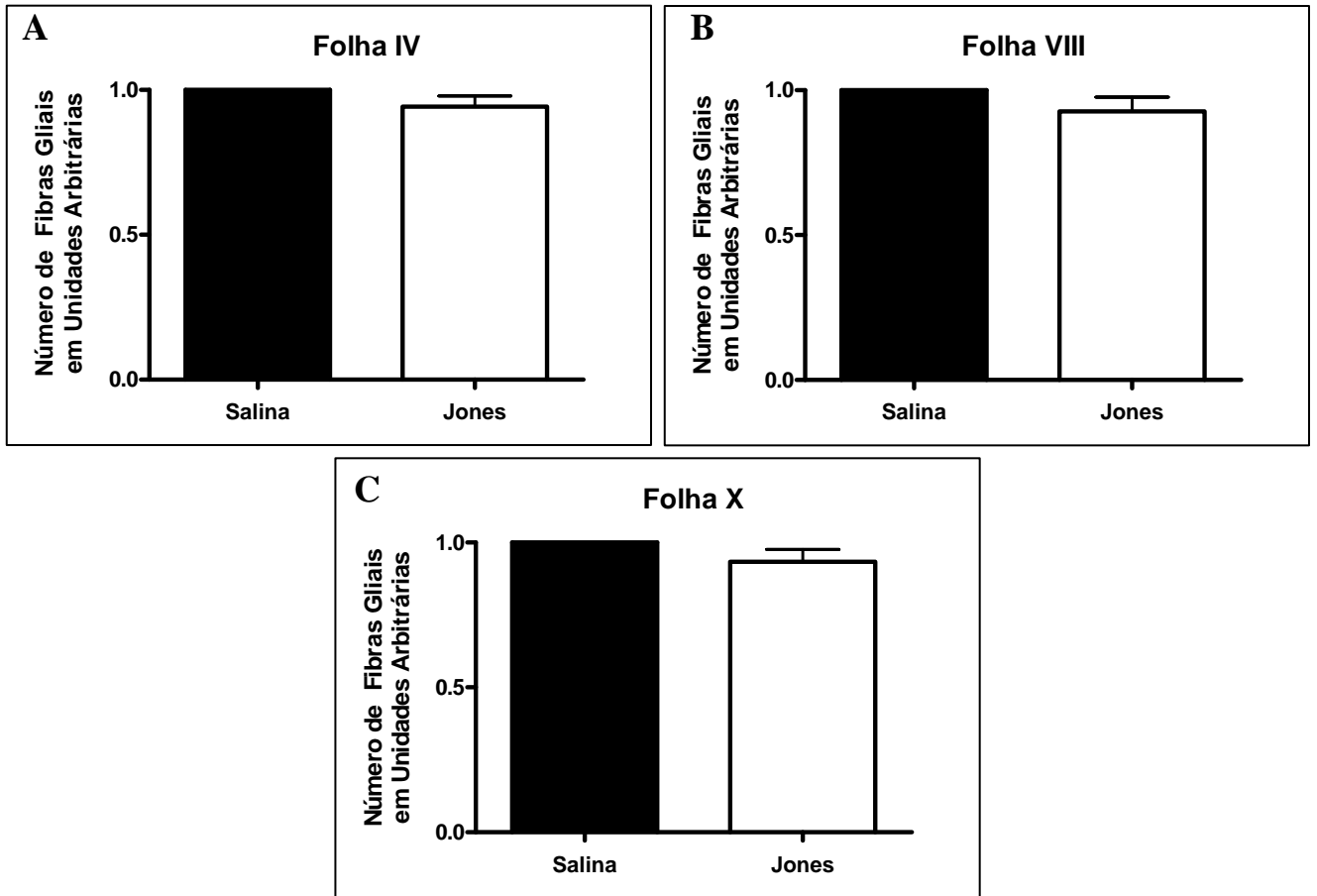


Figura 29. Efeito do imunobloqueio crônico com mAb Jones no número de fibras gliais. Os gráficos (A, B e C) são referentes às folhas IV, VIII e X, respectivamente (n=3). Para análise estatística foi utilizado o teste-t.

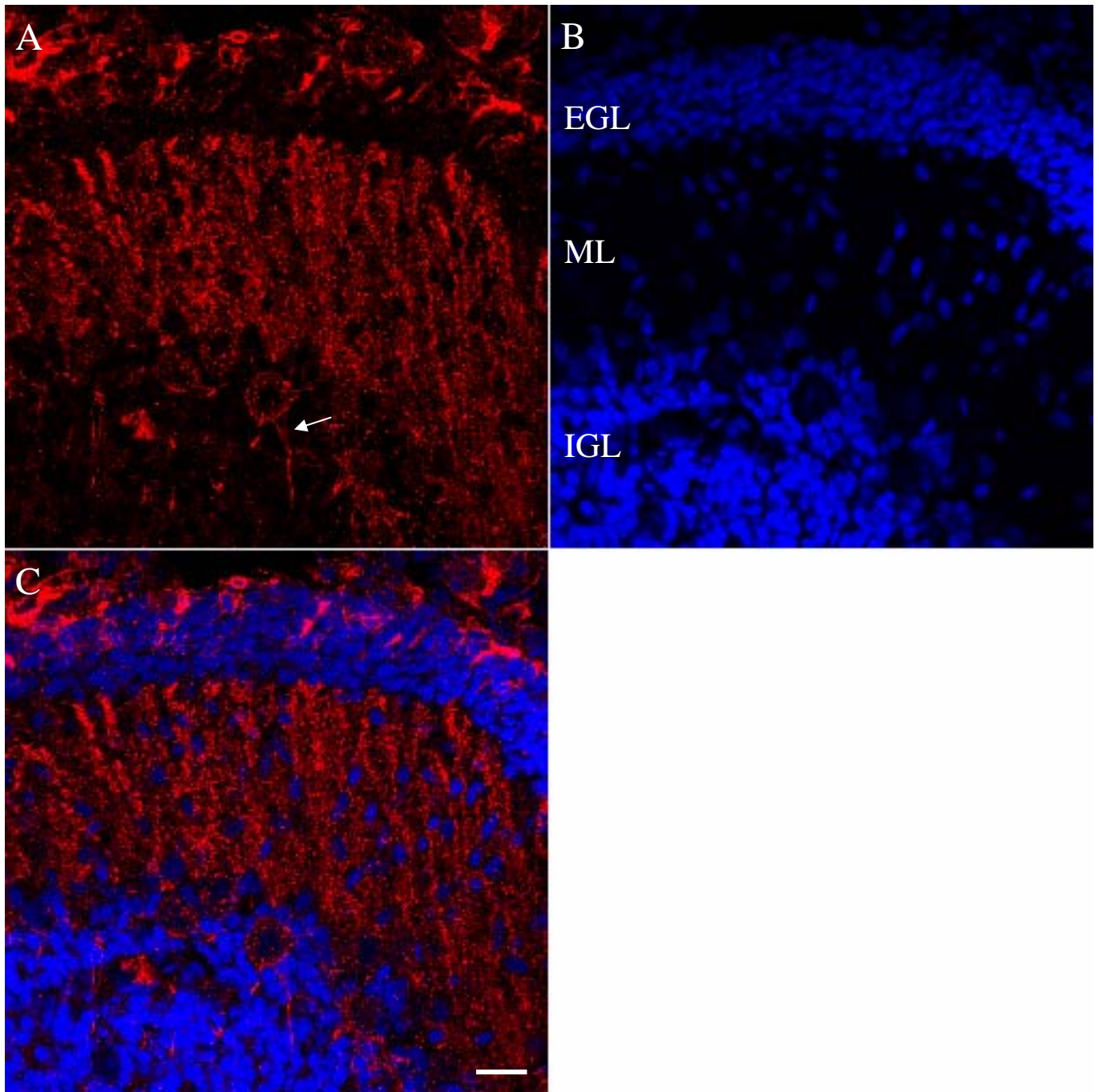


Figura 30. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo de rato P14 que sofreu o imunobloqueio crônico. (A) Imunomarcção com Jones (vermelho). (B) Contra-coloração de núcleo, TO-PRO3 (azul). (C) Sobreposição das imagens (A) e (B). A seta branca indica o que aparenta ser um axônio de célula de Purkinje. Barra de calibração 20 μ m.

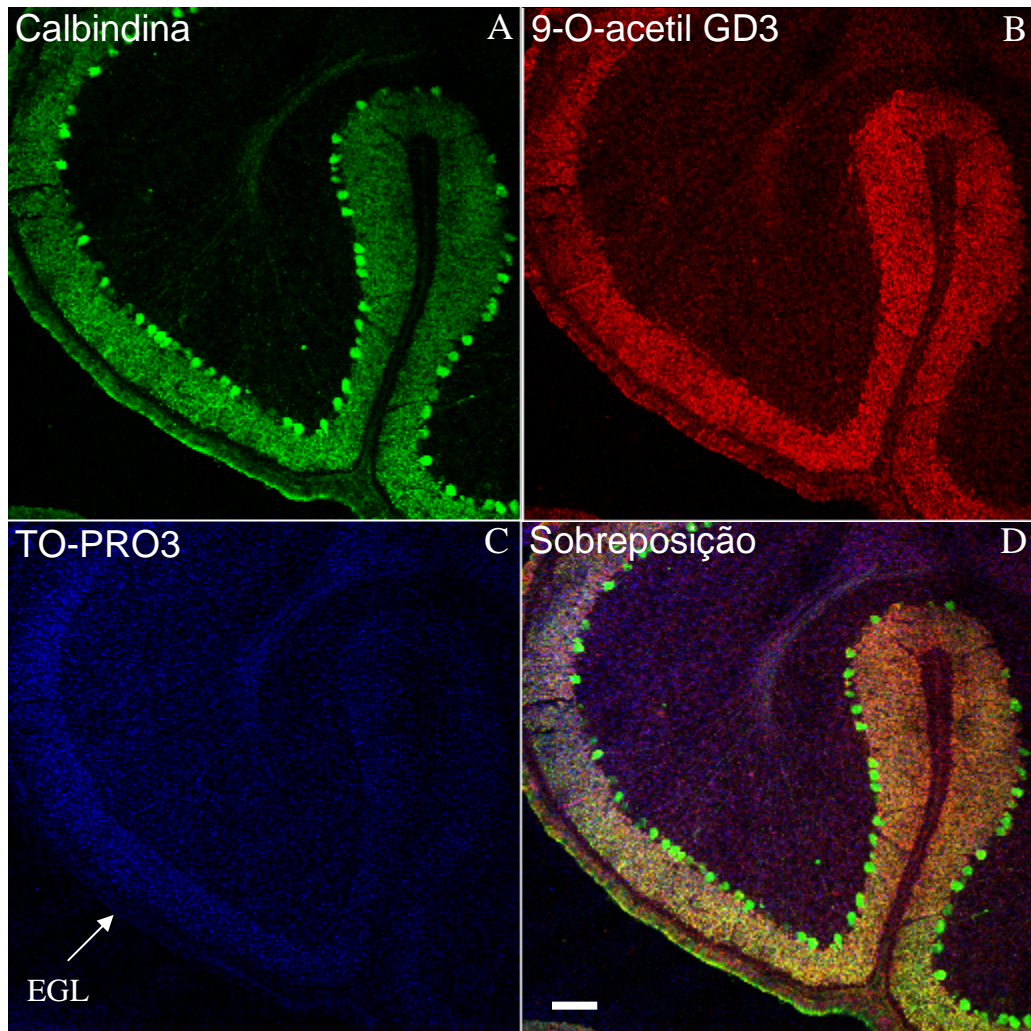


Figura 31. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo de rato P14. (A) Imunomarcção com anti-calbindina (verde). (B) Imunomarcção com anti-CD60b (vermelho). (C) Contra-coloração de núcleo, TO-PRO3 (azul) (D) Sobreposição das imagens (A), (B) e (C). Barra de calibração 100 μ m.

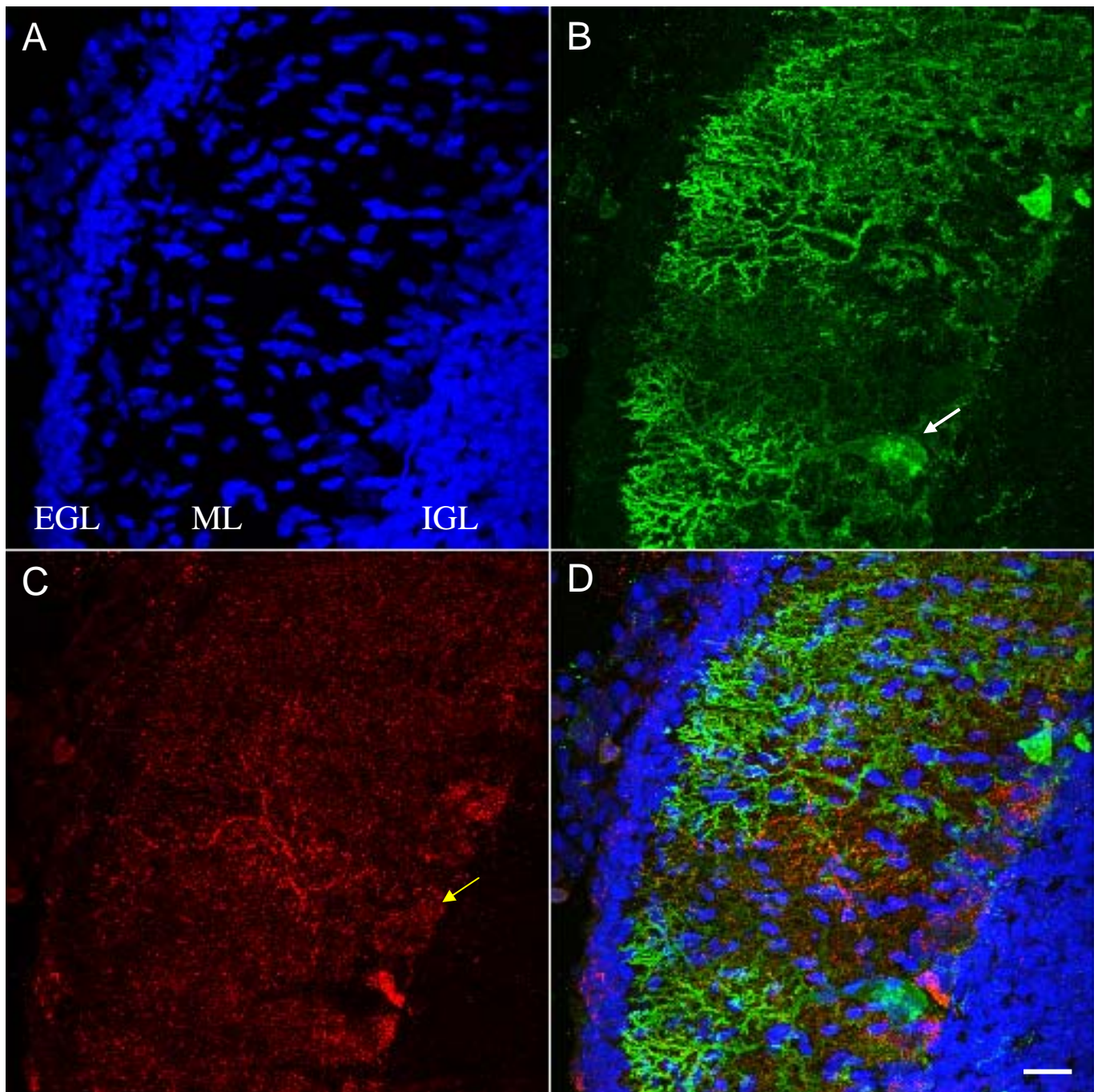


Figura 32. Imagens obtidas por microscopia confocal de corte parassagital de cerebelo de rato P14. (A) Contra coloração de núcleo, TO-PRO3 (azul). (B) Imunomarcação com anti-calbindina. (C) Imunomarcação com anti CD60b (vermelho). (D) Sobreposição das imagens (A), (B) e (C). A seta branca indica uma célula positiva apenas para calbindina e a seta amarela indica uma célula positiva apenas para CD60b. Barra de calibração 20 μ m.

4.10. O anticorpo anti-CD60b interfere na adesão de neurônios granulares à laminina *in vitro*

Com a intenção de avaliar se a ligação ao mAb Jones às células granulares poderia interferir na adesão dessas à proteína de matriz extracelular, laminina, desenvolvemos um sistema *in vitro* para avaliar essa possibilidade.

Quando comparamos o número de células aderidas, sem influência de anticorpos, no plástico da placa de cultura (n=4), em lamínulas revestidas com poli-L-lisina (n=11) e em lamínulas revestidas com laminina (n=11), observamos uma preferência na adesão de células à laminina (48,73%) em relação ao plástico (p=0,0076), porém não observamos diferença significativa entre a adesão de células em laminina ou em poli-L-lisina (**Figura 33**).

Foi analisada a quantidade de células granulares de cerebelo de ratos P7 aderidas, em laminina, nas condições controle, previamente incubadas com anti-CD60b ou com A2B5. Foi observado um decréscimo significativo de 60,17% na adesão de células previamente incubadas com anti-CD60b (n=11; p=0,0001). O mesmo decréscimo não foi observado na situação em que as células foram previamente incubadas com o anticorpo A2B5 (**Figura 34**).

Foi realizado o mesmo teste para avaliar a adesão das células granulares em lamínulas revestidas com poli-L-lisina, somente (**Figura 35**) (n=9), ou apenas ao plástico da placa de cultura (n=4) (**Figura 36**) e não foi observada diferença significativa no número de células aderidas nas condições em que as células foram previamente incubadas com anti-CD60b, A2B5 ou controle.

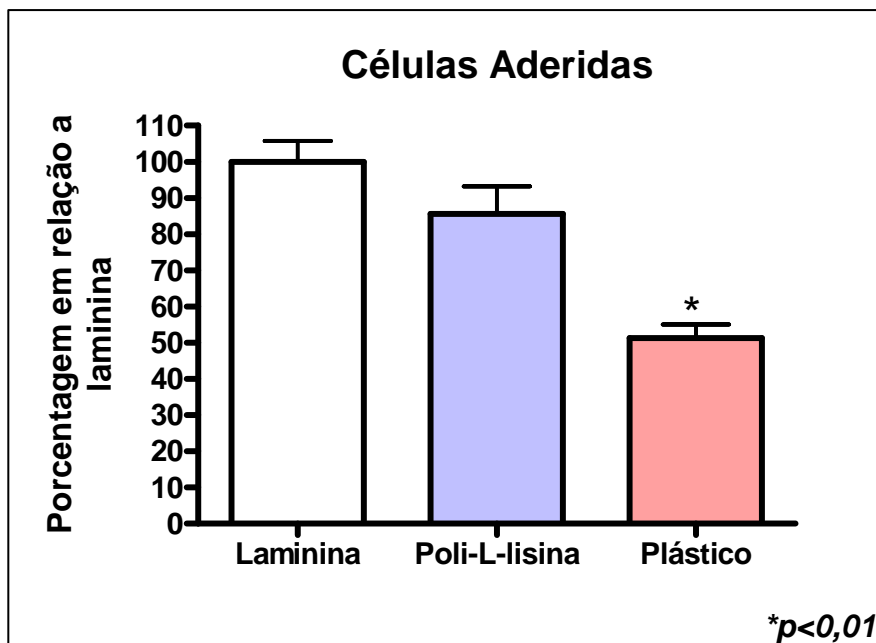


Figura 33. Gráfico representativo da comparação do número de células contra-coradas com bisbenzimidazolona e aderidas à Laminina, à poli-L-lisina e ao plástico. Essa quantificação foi realizada com células previamente incubadas com meio controle. Para análise estatística foi utilizado ANOVA.

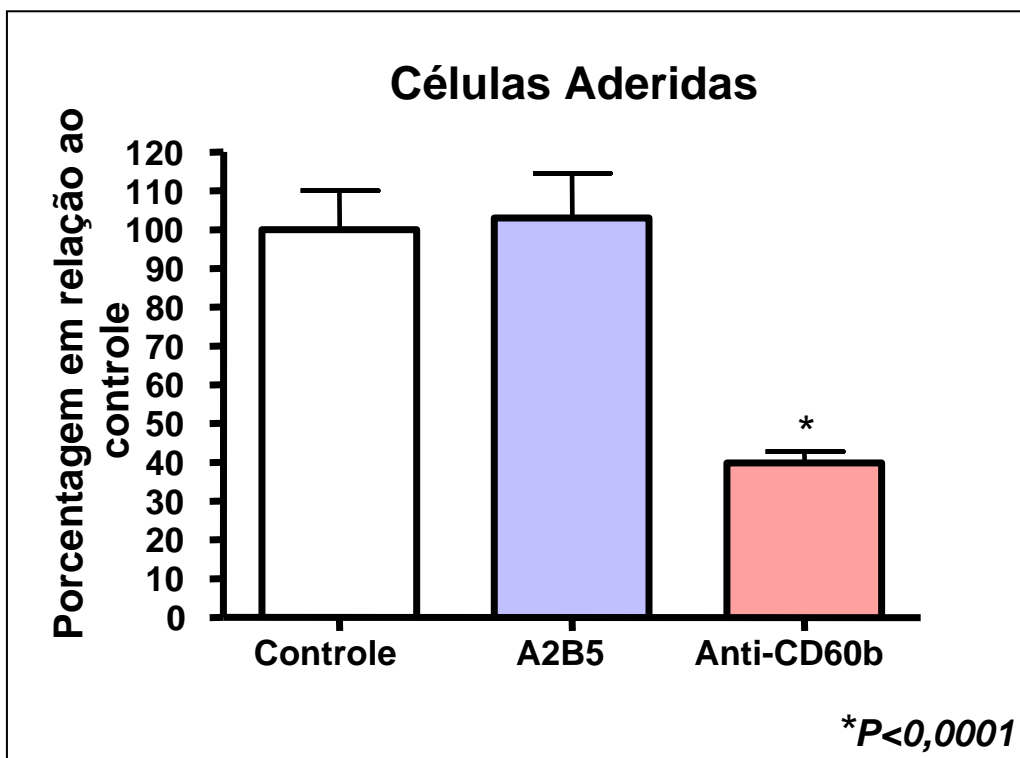


Figura 34. Gráfico representativo da comparação do número de células contra-coradas com bisbenzimidida e aderidas à laminina. Essa quantificação foi realizada com células previamente incubadas com meio controle, bloqueadas com o anticorpo Jones ou com o anticorpo A2B5. Para análise estatística foi utilizado ANOVA.

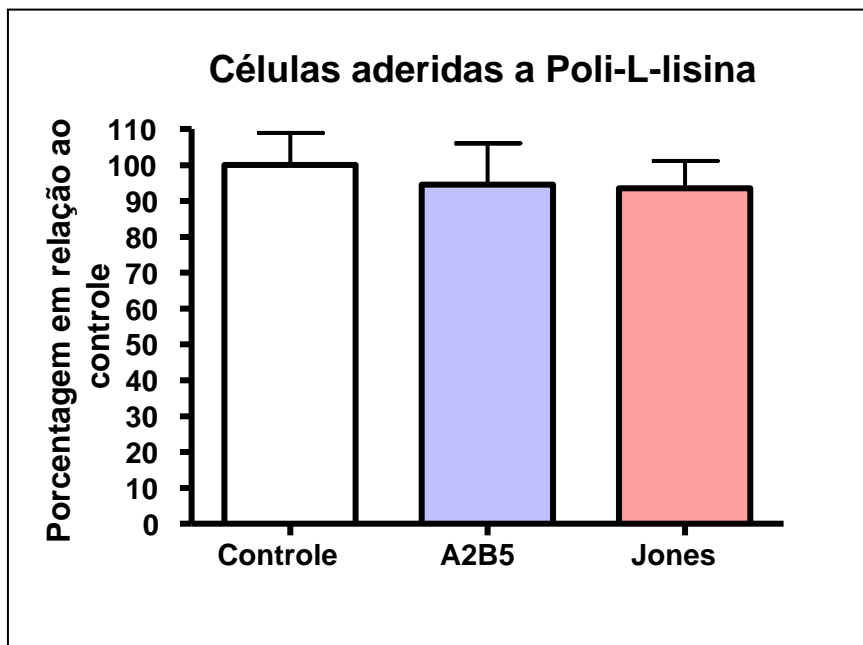


Figura 35. Gráfico representativo da comparação do número de células, contra coradas com bisbenzimidida, aderidas à poli-L-lisina. Essa quantificação foi realizada com células previamente incubadas com meio controle, bloqueadas com o anticorpo Jones ou com o anticorpo A2B5. Para análise estatística foi utilizado ANOVA.

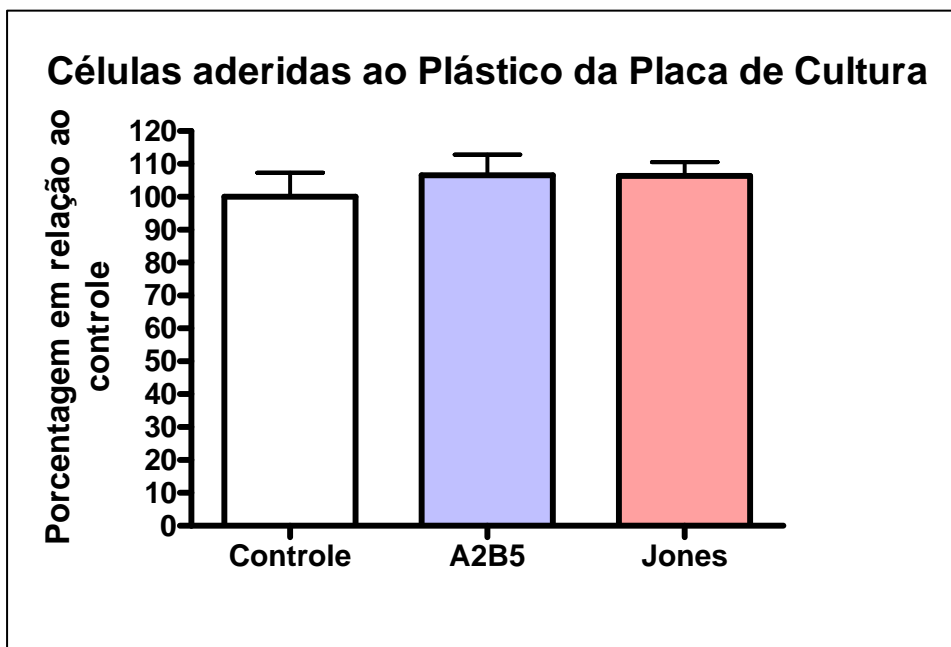


Figura 36. Gráfico representativo da comparação do número de células contra coradas com bisbenzimidida e aderidas ao plástico da placa de cultura. Essa quantificação foi realizada com células previamente incubadas com meio controle, bloqueadas com o anticorpo Jones ou com o anticorpo A2B5. Para análise estatística foi utilizado ANOVA.

4. Discussão:

4.1. Análise morfométrica:

Em 2004 foi publicado pelo nosso grupo um trabalho relatando que o imunobloqueio agudo *in vivo* com mAb Jones impede a migração das células granulares em direção a IGL (Santiago e cols, 2004). A migração das células granulares para a formação da IGL se completa em ratos e camundongos em 21 dias (três semanas) (Altman, 1966). Por isso o bloqueio de um terço dessa migração (7 dias) foi considerado um imunobloqueio crônico. Neste trabalho nós realizamos um imunobloqueio crônico com Jones para observar se a diminuição da migração persiste por um período de tempo prolongado além de estender as análises morfológicas no cerebelo dos ratos imunobloqueados cronicamente *in vivo*. Para complementar a análise dos possíveis efeitos do anticorpo, desenvolvemos um modelo *in vitro* que facilitou o entendimento dos possíveis papéis funcionais da molécula reconhecida por esse anticorpo: o gangliosídeo 9-O-acetil GD3.

Inicialmente, realizamos uma série de análises imunohistoquímicas para verificar se o anticorpo injetado chegava ao cerebelo e se ligava aos antígenos e células já descritos anteriormente (Para revisão, Mendez-Otero & Santiago, 2001). Para isso, utilizamos a técnica de imunohistoquímica *in vivo*, ou seja, após a preparação das lâminas com cortes de ratos que receberam injeções de Jones, foi utilizado apenas o anticorpo secundário para revelar o local em que o anticorpo primário havia se ligado enquanto o animal ainda estava vivo (Santiago e cols, 2004).

A marcação *in situ* do Jones nas células de Purkinje em cortes de cerebelo de rato P7, idade em que iniciamos as injeções, é disposta em um padrão de bandas já verificado anteriormente, porém as células migratórias são marcadas de maneira ininterrupta, em todo o território cerebelar. A marcação nas células migratórias é mais explícita na EGL porque esta é

uma camada muito densa que também contém células que migram tangencialmente nesta idade (Komuro e cols., 2001).

Foi observado através da técnica de imunohistoquímica *in vivo* que o anticorpo injetado via intracerebroventricular chegou ao cerebelo e se ligou a células migratórias na EGL, na ML e às células de Purkinje indicando o sucesso do experimento.

O cerebelo é uma fração do encéfalo altamente compartimentalizada ao passo que a expressão de moléculas, inclusive os lipídeos 9-O acetilados, obedecem a um padrão de bandas que varia médio-lateralmente (Leclerc e cols., 1992; Edwards e cols., 1994) (**Figura 37**). Quando foram feitas as quantificações, foi observado que os valores encontrados também variam muito médio-lateralmente. Como quantificamos os mesmos cortes para cada par de ratos (injetados com Jones e controle), mas não quantificamos os mesmos cortes entre os pares de ratos, resolvemos avaliar, na análise estatística, a diferença entre o rato injetado com Jones e com salina dentro de cada par e observar se ela permanece em todos os pares. Para isso, as quantificações realizadas foram normalizadas corte por corte.

Além disso, como o cerebelo se desenvolve heterogeneamente, a expressão do 9-O-acetil GD3 também é irregular ântero-posteriormente (Santiago e cols., 2001) (**Figura 37**). Por isso, foram escolhidas três folhas, cada uma pertencente a um lobo cerebelar, separados pelas fissuras *prima* e *secunda*, para serem realizadas as quantificações.

O primeiro passo foi avaliar se havia retenção de células na EGL de ratos imunobloqueados em comparação aos ratos que receberam injeção de solução salina. Para isso, a espessura da EGL foi aferida e foi observado que não houve diferença significativa entre as condições estudadas. Porém, a EGL é organizada em camadas (Rakic, 1971) e as células granulares migram também dentro da EGL (Komuro e cols., 2001). Então avaliamos a possibilidade do bloqueio da migração se iniciar dentro da EGL.

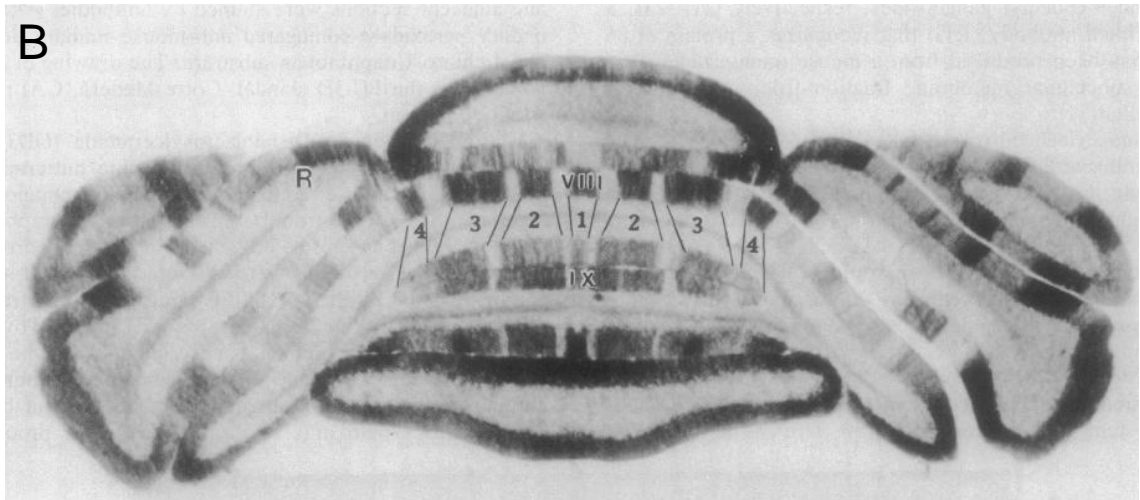
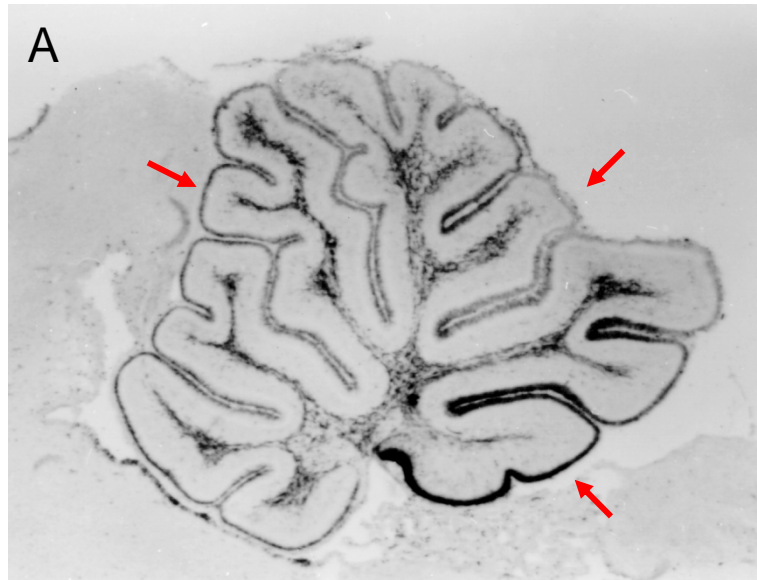


Figura 37. Cortes sagital e coronal do cerebelo revelando a expressão heterogênea de algumas moléculas no cerebelo em desenvolvimento e adulto. (A) Imagem de corte sagital cerebelar de rato P7 imunomarcado com Jones, exibindo diferença ântero-posterior na intensidade da expressão do 9-O-acetil GD3. As setas vermelhas indicam as folhas nas quais foram feitas as análises morfométricas. (Adaptado de Santiago e cols., 2001). (B) Imagem de corte coronal cerebelar imunomarcado com *p-path* mostrando a compartimentalização da expressão de lipídeos 9-O-acetilados no cerebelo adulto (Adaptado de Leclerc e cols., 1992).

As células da EGL de ratos imunobloqueados podem ser mais compactadas dentro dessa camada enquanto as células da EGL de ratos que receberam solução salina podem ser mais espaçadas entre si. Para isso, foi aferido o número de células por área na EGL e foi verificado que esse número é cerca de 20% maior em ratos que receberam injeções do anticorpo Jones nas folhas IV e VIII e que essa diferença é ainda maior na folha X (em torno de 30%).

Coincidentemente a folha X é a que mais expressa o 9-O-acetil GD3 na figura 37A.

Também foi feita, como uma segunda situação controle, a comparação da quantificação realizada no rato imunobloqueado com a quantificação realizada em ratos que receberam o anticorpo A2B5.

Este anticorpo, é uma IgM, como o mAb Jones, porém que reconhece gangliosídeos da série-c, grupo este que não inclui o 9-O-acetil GD3. Não observamos diferença significativa entre ratos que receberam solução salina e ratos que receberam o A2B5 eliminando a possibilidade do efeito gerado pelo Jones ser promovido por qualquer IgM, ou qualquer gangliosídeo.

Avaliamos também a hipótese do anticorpo Jones cronicamente injetado interferir no processo de proliferação celular. Em uma das imagens de imunohistoquímica *in vivo*, flagramos uma célula em divisão celular. Pela sua morfologia, caracterizamos a célula como as etapas anáfase e telófase da mitose pelo aparente material genético sendo dividido em 2. Observamos que a célula não expressa o 9-O-acetil GD3 sugerindo que esta molécula não seja necessária no processo de divisão celular, ao menos nessa fase. Em 2001, Santiago e colaboradores publicaram um artigo no qual entre outros parâmetros foi avaliado se o Jones poderia interferir no número de células que incorporavam BrdU. Porém esses dados foram avaliados em cultura organotípicas e as células foram submetidas ao anticorpo Jones por apenas 15 minutos (Santiago e cols., 2001).

Portanto refizemos as análises da possível influência do anticorpo na proliferação de precursores granulares, dessa vez, *in vivo* utilizando o marcador de proliferação celular Ki67 (marca todas as fases do ciclo celular) em lâminas contendo cortes de ratos que receberam injeções do Jones durante 7 dias. Não foi observada diferença significativa entre as condições estudadas, mais uma vez, reafirmando que o mAb Jones não interfere no processo de proliferação celular.

Esses dados sugerem uma maior retenção de células na EGL de ratos imunobloqueados, já que não há modificação na taxa de proliferação dessas células.

Foi também observado que não há diferença significativa na quantidade total de células da ML de ratos imunobloqueados e ratos que receberam apenas solução salina (controle). No trabalho de Santiago e colaboradores (2004) foi demonstrado que o Jones não bloqueia 100% das células. Além disso, em outro trabalho, foi demonstrado que células cultivadas com GD3 exógeno incorporam esta molécula e a convertem em 9-O-acetil GD3 em um período de 6h após sua adição (Chen e cols, 2006). Esse dado nos faz presumir que o 9-O-acetil GD3 possa ser automaticamente repostado na membrana das células enquanto existe GD3 no meio extra ou intra-celular. Adicionalmente o complexo antígeno-anticorpo é internalizado em um espaço de tempo desconhecido após o bloqueio. Estas informações nos sugerem que uma vez bloqueada, a célula pode voltar a expressar o 9-O-acetil GD3.

Em contrapartida, quando foi estipulada a duração do intervalo entre as injeções foi verificado que durante esse período ainda existe quantidade suficiente de Jones para bloquear novamente as células que voltaram a expressar o gangliosídeo (Santiago e cols, 2004).

Assim é provável que nos intervalos entre a internalização do complexo antígeno anticorpo, a reposição do 9-O-acetil GD3 na membrana e o sucessivo bloqueio pelo anticorpo Jones presente no meio, as células podem migrar e tornar a estacionar na camada molecular em ratos imunobloqueados. Assim, se em ratos imunobloqueados saem e chegam menos

células da EGL e IGL, respectivamente, ratos que receberam apenas solução salina e possuem grande demanda de células abandonando a EGL, mas também possuem uma grande quantidade de células chegando a IGL, isto justificaria a mesma quantidade de células na camada molecular.

Portanto de acordo com o perfil padrão de células migratórias (fusiformes) e estacionárias (arredondadas) já descritos anteriormente (Rakic, 1971; Edmonson & Hatten, 1987), foi quantificado a proporção de células estacionárias e migratórias em cada condição. Verificamos um decréscimo na porcentagem de células com perfil migratório e um acréscimo na porcentagem de células com perfil estacionário em ratos imunobloqueados em comparação aos ratos que receberam A2B5 e aos ratos que receberam solução salina. Este dado reforça a hipótese de que, em ratos que receberam injeções intraventriculares do mAb Jones, algumas células conseguem sair da EGL, porém essas, muitas vezes estacionam na ML, enquanto em ratos que receberam injeções de solução salina, as células saem normalmente da EGL e continuam migrando pela ML em direção a IGL. Também foi verificada uma maior influência do anticorpo na folha X. Esta apresentou maior diferença entre ratos injetados com mAb Jones e com solução salina do que as outras folhas.

Também avaliamos a possibilidade de haver alguma alteração na ML já que esta dobra em espessura durante a segunda semana pós-natal devido ao acréscimo de fibras paralelas das células granulares diferenciadas (Komuro & Rakic, 1995). Não verificamos diferença significativa na espessura da ML entre ratos que sofreram o imunobloqueio crônico e ratos que receberam solução salina.

Na imunohistoquímica *in vivo* também flagramos células migratórias abandonando a ML e chegando a IGL expressando o 9-O-acetil GD3. Já que detectamos um acúmulo de células na EGL, um aumento de células estacionárias na ML e uma diminuição de células migratórias na mesma camada, resolvemos verificar se houve alguma alteração na IGL.

Não encontramos diferença significativa na espessura, área e densidade da camada granular interna entre ratos das condições estudadas. A camada granular interna é a mais numerosa de todo o encéfalo e o número de células da EGL ou ML, percentualmente, é ínfimo perto da IGL (Altman, 1966; 1972^b; Rakic, 1971). Então uma modificação significativa para EGL, pode não ser significativa para a IGL, já que esse percentual será diluído pela grande quantidade de neurônios existentes nessa camada. Este dado nos sugere que o bloqueio de um terço do período de migração das células granulares do cerebelo (três semanas) não foi suficiente para causar uma alteração nessa camada.

Como comentado anteriormente, já foi observado que o 9-O-acetil GD3 é expresso por células da substância branca e que algumas delas correspondem a oligodendrócitos (Berredo-Pinho, 1997). Por esse motivo resolvemos observar se houve alguma interferência na área ocupada por essa camada e não observamos diferença significativa nas condições estudadas, sugerindo que o 9-O-acetil GD3 possa não exercer papel algum na mielinização

Também foi verificado se esse efeito de interferência na migração das células granulares poderia ser provocado pela influência do anticorpo sobre as fibras gliais que servem de suporte para a migração. Foi observado que há marcação com o mAb Jones em fibras gliais quando a imunohistoquímica é realizada *in situ* (Figuras 25 e 26). Porém não é observado o mesmo padrão de marcação na imunohistoquímica *in vivo*. Isso pode acontecer porque as células de glia radial podem internalizar o complexo antígeno-anticorpo em uma taxa mais rápida do que as outras células cerebelares.

Também foi quantificado o número de fibras gliais e foi verificado que não há diferença no número e na morfologia das fibras gliais descartando a hipótese do 9-O-acetil GD3 exercer alguma influência sobre a população de glia radial.

4.1. A expressão do 9-O-acetil GD3 pelas células de Purkinje:

A expressão do 9-O-acetil GD3 é muito intensa nas células de Purkinje. Para avaliar a expressão do 9-O-acetil GD3 nessas células, realizamos duplas marcações com o anti-CD60b e anti-calbindina. A calbindina é uma proteína ligadora de cálcio presente na célula de Purkinje diferenciada. Foi observada, em algumas regiões, uma marcação quase complementar em P14, sugerindo a presença do padrão de bandas na marcação do 9-O-acetil GD3 descrito anteriormente neste trabalho. Porém a calbindina não é expressa de forma compartimentalizada. Foi demonstrado que a proteína calbindina é essencial para sobrevivência das células de Purkinje e que ela é expressa por essas células desde E19 (Enderlin e cols., 1987; Nordquist e cols., 1988; Opperman e cols., 1990).

Uma possibilidade é o pico de expressão do 9-O-acetil GD3 ocorrer em um período do desenvolvimento diferente do pico da expressão da calbindina. Já foi demonstrado que o Jones reconhece um antígeno diferente na fase adulta (Schlosshauer e cols., 1988) e que o p-path (anticorpo que reconhece os mesmos antígenos do que o Jones) se liga às células de Purkinje de cerebelo adulto também em um padrão de bandas (Leclerc e cols., 1992), sugerindo a presença desse outro antígeno nessa célula. Uma hipótese plausível é que em uma fase inicial do desenvolvimento o 9-O-acetil GD3 seja super expresso pelas células de Purkinje. Posteriormente ele desapareceria sendo sucedido pelo aumento da expressão de calbindina, o que justificaria a alternância em alguns casos. Ainda assim, o 9-O-acetil GD3 começa a ser substituído pela expressão do outro glicolípido acetilado reconhecido pelo mAb Jones, o que explicaria a expressão das duas moléculas em algumas células.

4.2. Ensaio de adesão celular:

Outro parâmetro que avaliamos foi como o 9-O-acetil GD3 pode atuar nesse processo de migração.

Em outro trabalho do nosso grupo foi demonstrado através de microscopia confocal que o 9-O-acetil GD3 co-localiza com a proteína integrina $\beta 1$ em células granulares migratórias em culturas de explantes de cerebelo (Lima, 2006). Como comentado anteriormente, a principal propriedade da integrina é a ligação desta a proteínas da MEC, como a fibronectina, laminina, colágeno e vitronectina, formando os contatos focais. (Anton e cols, 1999; Giancotti & Ruoslahti, 1999; Mitra, e cols., 2005). A formação desses contatos pela proteína integrina é essencial para o processo de migração neuronal (Dulabon e cols., 2000; Schmid e cols., 2004). Então, avaliamos a adesão de células dissociadas, previamente bloqueadas com o anticorpo anti-CD60b, a lamínulas tratadas com poli-L-lisina e laminina. Foi observado um decréscimo de aproximadamente 60% no número de células aderidas na situação em que as células foram previamente tratadas com o anti-CD60b em relação à situação controle, em que as células não foram tratadas com nenhum anticorpo. Além disso, não foi verificada diferença significativa no número de células aderidas entre os grupos que foram previamente tratados com o anticorpo A2B5 e a situação controle. Este dado sugere que o anti-CD60b possa estar interferindo no processo migratório através da interferência na adesão celular às fibras gliais. Estas, expressam laminina em suas membranas citoplasmáticas e sua ligação com neuroblastos é fundamental para que ocorra o processo de migratório.

Já foi demonstrado que existem múltiplos sistemas receptores para adesão, que envolvem laminina, poli-L-lisina, colágeno e fibronectina (Fishman & Hatten, 1993). Então resolvemos avaliar se o 9-O-acetil GD3 estaria envolvido em outros tipos de adesão. Para isso, plaqueamos células bloqueadas com anti-CD60b em lamínulas revestidas de poli-L-lisina, apenas, ou no próprio plástico da placa de cultura. Não observamos diferença significativa entre o número de células aderidas que foram incubadas com anti-CD60b, A2B5 ou que não receberam nenhum tratamento prévio. Este dado nos sugere que o 9-O-

acetil GD3 não atua na adesão mediada por poli-L-lisina ou pelo plástico da placa de cultura, mas sim especificamente na adesão mediada por laminina. Como o 9-O-acetil GD3 se mostrou indispensável para o desenvolvimento regular do cerebelo, podemos sugerir que o mecanismo de adesão utilizado *in vivo* pelas células granulares na migração para a formação da IGL é mediado por integrina/laminina e modulado pelo 9-O-acetil GD3 **(Figura 38)**.

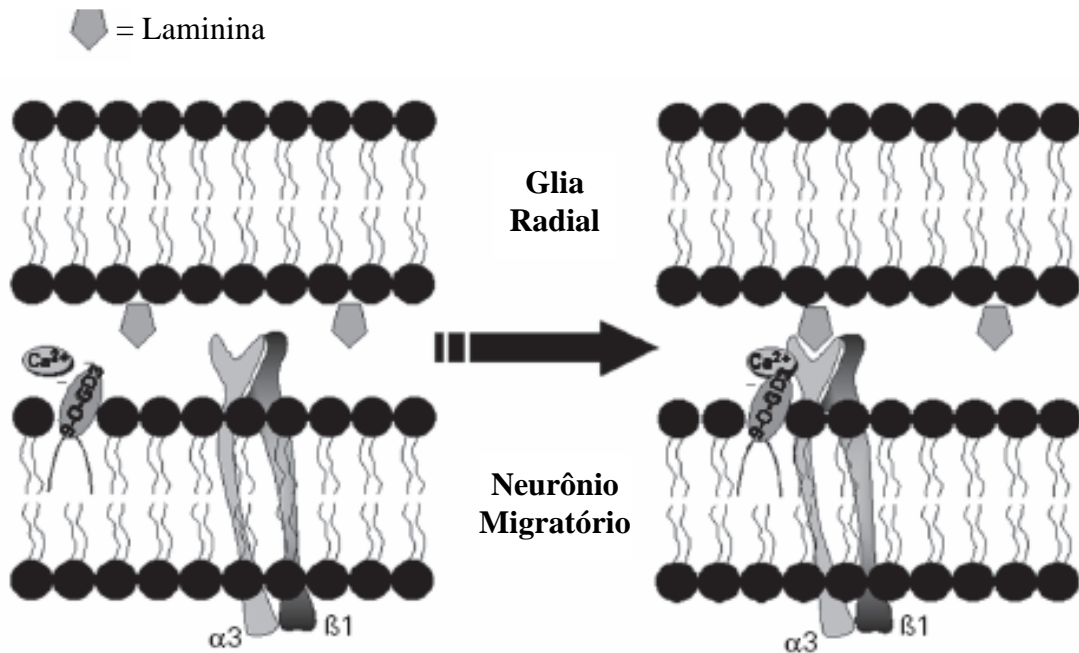


Figura 38. Diagrama esquemático ilustrando o possível mecanismo de ação do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 (9-O-GD3). A modulação do gangliosídeo na função da proteína integrina pode ser através de moléculas de Ca^{2+} , necessárias para ativação da proteína, e/ou através de interações diretas entre o 9-O-acetil GD3 e a integrina. No diagrama podemos observar um primeiro estágio onde a proteína integrina se encontra desativada e não há reconhecimento da laminina. No segundo estágio um agrupamento de gangliosídeos (representados no esquema por apenas um gangliosídeo) se aproximam da proteína integrina promovendo um espaço enriquecido de Ca^{2+} , necessários para a ativação e reconhecimento de moléculas da MEC pela integrina, conseqüentemente, havendo a adesão (adaptado de Mendez-Otero & Santiago, 2001).

6. Conclusões

- O mAb Jones injetado nos ventrículos laterais se difunde até o cerebelo e marca células granulares pós-mitóticas e migratórias, células de Purkinje, assim como suas arborizações dendríticas, e células com perfil migratório na substância branca.
- Ratos que sofreram o imunobloqueio crônico *in vivo* com mAb Jones exibem maior densidade celular na EGL, menor número de células com perfil migratório e maior número de células com perfil estacionário na ML.
- O imunobloqueio crônico com mAb Jones não interfere no número de células em proliferação na EGL.
- O imunobloqueio crônico não interfere no número e morfologia de fibras de glia radial no cerebelo em desenvolvimento.
- O imunobloqueio com o anti-CD60b promove o decréscimo de 63% no número de células aderidas ao substrato contendo laminina sugerindo um papel do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em mediar fenômenos de adesão envolvendo integrinas e laminina.

8. Referências

1. ALTMAN J. (1966). Autoradiographics and histological studies of postnatal neurogenesis II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neur.*, 128: 431-474
2. ALTMAN J. (1972^a). Postnatal developmental of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neur.*, 145(4): 399-464
3. ALTMAN J. (1972^b). Postnatal developmental of the cerebellar cortex in the rat. III Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neur.*, 145 (4): 465-513.
4. ALTMAN J.; BAYER S. A. (1978). Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 179: 23-48
5. ANTON E. S.; MARCHIONNI M. A.; LEE K-F & RAKIC P. (1997). Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*, 124:3501-10.
6. ANTON E. S.; KREIDBERD J. A.; RAKIC P. (1999). Distinct function of α_3 and α_V integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron*, 22:277-289.
7. ANTHONY T.E.; MASON H.A.; GRIDLEY T.; FISHELL G.; HEINTZ N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev.* 1;19(9):1028-33.
8. BEAR M. F.; CONNORS B. W.; PARADISO M. A. (2001). *Neurociências desvendando o sistema nervoso*. Editora ARTMED. 2^a edição. Coordenação e revisão técnica de tradução: Jorge Alberto Quillfeldt.
9. BLUM A.S.; BARNSTABLE C.J. (1987). O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(23):8716-20.
10. BONAFEDE D.M.; MACALA L.J.; CONSTANTINE-PATON M.; YU R.K. (1989). Isolation and characterization of ganglioside 9-O-acetyl-GD3 from bovine buttermilk. *Lipids.* 24(8):680-4.
11. BORGHESANI P.R.; PEYRIN J.M.; KLEIN R.; RUBIN J.; CARTER A.R.; SCHWARTZ P.M.; LUSTER A.; CORFAS G.; SEGAL R.A. (2002). BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development.* 129(6):1435-42.
12. BRADLEY O. C. (1899). On the cerebellum of the horse. *J. Anat. Physiol.* 33 (pt4): 587-95.

13. BRADLEY O. C. (1904). The mammalian cerebellum: Its lobes and fissures. *J. Anat. Physiol.* 38 (pt4): 448-75.
14. CAVINESS V.S. JR.; RAKIC P. (1978). Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Ann Rev. Neurosci.* 1:297-326.
15. CHIZHIKOV V.V.; MILLEN K.J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev Biol.* 15;277(2):287-95.
16. CHANAS-SACRÉ G.; THIRY M.; PIRARD S.; ROGISTER B.; MOONEN G.; MBEBI C.; VERDIÈRE-SAHUQUÉ M.; LEPRINCE P. (2000). A 295-kDa intermediate filament-associated protein in radial glia and developing muscle cells *in vivo* and *in vitro*. *Developmental dynamics*, 219:514-525.
17. CHEN H.Y.; CHALLA A.K.; VARKI A. (2006). 9-O Acetylation of exogenously added ganglioside GD3. The GD3 molecule induces its own o-acetylation machinery. *The Journal of Biological Chemistry* 281(12):7825-7833.
18. CONSTANTINE-PATON M.; BLUM A.S.; MENDEZ-OTERO R.; BARNSTABLE C.J. (1986). A cell surface molecule distributed in a dorsoventral gradient in the perinatal rat retina. *Nature*, 4-10;324(6096):459-62.
19. CORRALES J.D.; ROCCO G.L.; BLAESS S.; GUO Q.; JOYNER A.L. (2004). Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development* 131(22):5581-90.
20. CORRALES J.D.; BLAESS S.; MAHONEY E.M.; JOYNER A.L. (2006). The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 133(9):1811-21.
21. DE CARLOS J.A.; LÓPEZ-MASCARAQUE L.; VALVERDE F. (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *The Journal of Neuroscience* 16(19): 6146-6156.
22. DE DIEGO I.; KYRIAKOPOULOU K.; KARAGOGEOS D.; WASSEF M. (2002). Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development* 129, 297-306.
23. DULABON L.; OLSON E.C.; TAGLIANTI M.G.; EISENHUTH S.; McGRATH B.; WALSH C.A.; KREIDBERG J.A.; ANTON E.S. (2000). Reelin binds $\alpha\beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, vol. 27, 33-44.
24. EDMONSON J.C.; HATTEN M.E. (1987). Glial-guided granule neuron migration *in vitro*: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *The Journal of Neuroscience*, June, 7(6):1928-1934.
25. EDWARDS M.A.; LECLERC N.; CRANDALL J.E.; YAMAMOTO M. (1994). Purkinje cell compartments in the reeler mutant mouse as revealed by Zebrin II and 9-O-acetylated glycolipid antigen expression. *Anat Embryol.* 190: 417-428.
26. ENDERLIN S.; NORMAN A.W.; CELIO M.R. (1987). Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)*. 177(1):15-28

27. ENGLUND C.; KOWALCZYK T.; DAZA R.A.M.; DAGAM A.; LAU C.; ROSE M.F.; HEVNER R.F. (2006). Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *The Journal of Neuroscience* 26(36):9184-9195.
28. FENG L.; HATTEN M. E.; HEINTZ N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron*, Vol 12, 895-908.
29. FENG L.; HEINTZ N. (1995). Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development*, 121,1719-1730.
30. FINK A.J.; ENGLUND C.; DAZA R.A.M.; PHAM D.; LAU C.; NIVISON M.; KOWALCZYK T.; HEVNER R.F. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *The Journal of Neuroscience* 26(11):3066-3076.
31. FISHELL G.; HATTEN M.E. (1991). Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development* 113:755-765.
32. FISHMAN R.B.; HATTEN M.E. (1993). Multiple receptor systems promote CNS neural migration. *J. Neurosci.* 13(8):3485-95.
33. FLORIDI F.; TRETTEL F.; DI BARTOLOMEO S.; CIOTTI M.T.; LIMATOLA C. (2003). Signalling pathways involved in the chemotactic activity of CXCL12 in cultured rat cerebellar neurons and CHP100 neuroepithelioma cells. *J Neuroimmunol.* 135(1-2):38-46.
34. GAMBELLO M.J.; DARLING D.L.; YINGLING J.; TANAKA T.; GLEESON J.G.; WYNshaw-BORIS A. (2003). Multiple dose-dependent effects of Lis 1 on cerebral cortical development. *The Journal of Neuroscience* 23(5):1719-1729.
35. GIANCOTTI F. G.; RUOSLAHTI E. (1999). Integrin signalling. *Science*, vol 285.
36. GILBERT S. F. (2000). *Developmental biology*. Editor: Sinauer Associates, Sixth edition.
37. GILBERT S. F. (2001). Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Dev Biol.*, May 1;233(1): 1-12.
38. GLEESON J.G.; LIN P.T.; FLANAGAN L.A.; WALSH C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, Vol 23: 257-271.
39. GLICKSTEIN M.; VOOGT J. (1995). Lodewijk Bolk and the comparative anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 18(5): 206-10.
40. GRANIT R.; PHILLIPS C. G. (1956). Excitatory and inhibitory processes acting upon individual Purkinje cells of the cerebellum in cats. *J. Physiol.* 133: 520-547.
41. GRAUSS-PORTA D.; BLAESS S.; SENFTEN M.; LITTLEWOOD-EVANS A.; DAMSKY C.; HUANG Z.; ORBAN P.; KLEIN R.; SCHITTY J.C.; MÜLLER

- U. (2001). β_1 -Class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron*, 31:367-379.
42. GREGORY W.A.; EDMONSON J.C.; HATTEN M.E.; MASON C.A. (1988). Cytology and neuron-glial apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *The Journal of Neuroscience* 8(5):1728-1738.
43. GROENEWEGEN H.J.; VOOGD J. (1977). The parasagittal zonation within the olivocerebellar projection. I. Climbing fiber distribution in the vermis of cat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 1;174(3):417-88
44. GRUNZ H. (2003). Four decades of teaching developmental biology in German. *Int J Dev Biol.* 47(2-3): 193-201.
45. HATTEN M.E.; LIEM R. (1981). Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J. Cell. Biol.*, 90:622-30.
46. HATTEN M.E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu. Ver. Neurosci*, 22:511-39.
47. HEMLER M.E. (1990). VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Ver. Immunol.* 8:365-400.
48. HIROTSUNE S.; FLECK M.W.; GAMBELLO M.J.; BIX G.J.; CHEN A.; CLARK G.D.; LEDBETTER D.H.; MCBAIN C.J.; WYNshaw-BORIS A. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet.* 19(4):333-9.
49. HOCKFIELD S.; MCKAY R.D. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 5(12):3310-28.
50. HOWELL B.W.; HAWKES R.; SORIANO P.; COOPER J.A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature.* 389(6652):733-7.
51. HUNTER K.E.; HATTEN M.E. (1995). Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92:2061-65.
52. HYNES R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69(1):11-25.
53. JAEGER C.B.; KAPOOR R.; LLINÁS R. (1988). Cytology and organization of rat cerebellar organ cultures. *Neuroscience*, 26(2): 509-538.
54. KLEIN R.S.; RUBIN J.B.; GIBSON H.D.; DEHAAN E.N.; ALVAREZ-HERNANDEZ X.; SEGAL R.A.; LUSTER A.D. (2001). SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development.* 128(11):1971-81.
55. KOMURO H.; RAKIC P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 2;260(5104):95-7.

56. KOMURO H.; RAKIC P. (1995). Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci.* 1995 Feb;15(2):1110-20.
57. KOMURO H.; RAKIC P. (1998). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *The Journal of Neuroscience* 18(4): 1478-1490.
58. KOMURO H.; YACUBOVA E.; YACUBOVA E.; RAKIC P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *The Journal of Neuroscience* 21(2): 527-540.
59. KURTZ A.; ZIMMER A.; SCHNÜTGEN F.; BRÜNING G.; SPENER F.; MÜLLER T. (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with a neuronal and glia cell development. *Development*, 120, 2637-2649.
60. LAINÉ J. & AXELRAD H. (1994). The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 339:159-173.
61. LAINÉ J. & AXELRAD H. (1998). Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport.* 9(10):2399-2403.
62. LANGE W. (1975). Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res.*, 157: 115-24.
63. LAROUCHE M.; BEFFERT U.; HERZ J.; HAWKES R. (2008). The Reelin receptors Apoer2 and Vldlr coordinate the patterning of Purkinje cell topography in the developing mouse cerebellum. *PLoS ONE.* 3(2):e1653.
64. LARSELL O. (1935). The development of the cerebellum in the bat (*Corynorhynus sp.*) and certain other mammals. *J. Comp. Neurol.* 62:443-68.
65. LARSELL O. (1947). The development of the cerebellum in man in relation to its comparative anatomy. *J. Comp. Neurol.* 87:85-130.
66. LARSELL O. (1948). The development and subdivisions of the cerebellum of birds. *J. Comp. Neurol.* 89:123-90.
67. LARSELL O. (1952). The morphogenesis and adult pattern of the lobule and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. Comp. Neurol.* 97:281-356.
68. LAXSON L.C.; KING J.S. (1983). The formation and growth of the cortical layers in the cerebellum of the opossum. *Anat Embryol (Berl).* 167(3):391-409.
69. LECLERC N.; SCHWARTING G.; HERRUP K.; HAWKES R. (1992). Compartmentalization in mammalian cerebellum: Zebrin II and P-path antibodies define three classes of sagittally organized bands of Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5006-5010.
70. LIESI P. (1985). Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? *EMBO J.* 4(5):1163-70.

71. LIESI P.; HAGER G.; DODT H.U.; SEPPÄLÄ I.; ZIEGLGÄNSBERGER W. (1995). Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 1;40(2):199-206.
72. LIMA V.B.C.D. (2006). Interação do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 com a subunidade β 1 de integrina e proteína príon na migração neuronal em cerebelos de rato. (Mestrado em Biofísica). Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006
73. LLOYD K.O.; FURUKAWA K. (1998). Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconjugate Journal*, 15, 627-636.
74. LENDAHL U.; ZIMMERMAN L.B.; MCKAY R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 23;60(4):585-95.
75. MANENT J.B.; REPRESA A. (2007). Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist.* ;13(3):268-79.
76. MASON C. A. (1987) The development of cerebellar mossy fibers: embryonic and postnatal features. *New concepts in cerebellar neurobiology*, pages 57-88.
77. MASON C. A.; CHRISTAKOS S.; CATALANO S. M. (1990). Early climbing fiber interactions with Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *J. Comp. Neur.*, 297:77-90
78. MENDEZ-OTERO R.; SCHLOSSHAUER B.; BARNSTABLE C. J.; CONSTANTINE-PATON M. (1988). A developmentally regulated antigen associated with neural cell and process migration. *J. Neurosci*, 8(2): 564-579.
79. MENDEZ-OTERO R.; CONSTANTINE-PATON M. (1990). Granule cell induction of 9-O-acetyl gangliosides on cerebellar glia in microcultures. *Dev Biol*. 138(2):400-9.
80. MISSON J.P.; EDWARDS M.A.; YAMAMOTO M.; CAVINESS V.S. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res*, Nov 1;44(1):95-108.
81. MITRA S.K.; HANSON D.A.; SCHLAEPFER D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature*, Vol 6.
82. MUGNAINI E.; FLORIS A. (1994). The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 339:174-180.
83. NEGREIROS E. M. A.; LEÃO A. C. M.; SANTIAGO M. F.; MENDEZ-OTERO R. (2003). Localization of ganglioside 9-O-Acetyl GD3 in point contacts of neuronal growth cones. *J Neurobiol* 00: 000–000, 2003.
84. NORDQUIST D.T.; KOZAK C.A.; ORR H.T. (1988). cDNA cloning and characterization of three genes uniquely expressed in cerebellum by Purkinje neurons. *J Neurosci*. 8(12):4780-9.

85. OPPERMAN L.A.; PETTIFOR J.M.; ROSS F.P. (1990). Immunohistochemical localization of calbindins (28K and 9K) in the tissues of the baboon *Papio ursinus*. *Anat Rec.* 228(4):425-30.
86. PANDE G. (2000). The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 12:569-574.
87. PATTEN B.A.; PEYRIN J.M.; WEINMASTER G.; CORFAS G. (2003). Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation. *J. Neurosci.* 23(14):6132-40.
88. PINHO M.B. (1997). Papel dos gangliosídeos 9-O-acetilados na migração celular durante o desenvolvimento pós natal do cerebelo de ratos. Dissertação (Mestrado em Biofísica). Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.
89. RAKIC P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A golgi and electronmicroscopic study in macacus rhesus. *J. Comp. Neur.*, 141(3): 283-312.
90. RAKIC P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neur.*, 145: 61-84
91. RAKIC P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241(4862): 170-6.
92. RAKIC P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46(9): 882-91.
93. RIO C.; RIEFF H.I.; QI P.; CORFAS G. (1997). Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron*, 19: 39-50.
94. RUOSLAHTI E. (1991). Integrins. *J Clin Invest.* 87(1):1-5.
95. RIVAS R.J.; HATTEN M.E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15(2):981-9.
96. SADAKATA T.; KAKEGAWA W.; MIZOGUCHI A.; WASHIDA M.; KATOH-SEMBA R.; SHUTOH F.; OKAMOTO T.; NAKASHIMA H.; KIMURA K.; TANAKA M.; SEKINE Y.; ITOHARA S.; YUZAKI M.; NAGAO S.; FURUICHI T. (2007). Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci.* 7;27(10):2472-82.
97. SANTIAGO M. F.; BERREDO-PINHO M.; COSTA M. R.; GANDRAM.; CAVALCANTI L. A.; MENDEZ-OTERO R. (2001). Expression and function of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. *Mol Cell Neurosci.* Mar; 17(3):488-99.
98. SANTIAGO M. F.; COSTA M. R.; MENDEZ-OTERO R. (2004). Immunoblockage of 9-O-Acetyl GD3 ganglioside arrests the *in vivo* migration of cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24(2):474-478.
99. SCHMID R.S.; SHELTON S.; STANCO A.; YOKOTA Y.; KREIDBERG J.A.; ANTON E.S. (2004). Alpha3beta1 integrin modulates neuronal migration and

placement during early stages of cerebral cortical development. *Development*. 131(24):6023-31. Epub 2004 Nov 10.

100. SCHLOSSHAUER B.; BLUM A.S.; MENDEZ-OTERO R.; BARNSTABLE C.J.; CONSTANTINE-PATON M. (1988). Developmental regulation of ganglioside antigens recognized by the JONES antibody. *J Neurosci*. 8(2):580-92.
101. SELAK I.; FOIDART J.M.; MOONEN G. (1985). Laminin promotes cerebellar granule cells migration in vitro and is synthesized by cultured astrocytes. *Dev. Neurosci*. 7(5-6):278-85.
102. SMITH G.E. (1902). The primary subdivision of the mammalian cerebellum. *J. Anat. Physiol*. 36 (pt4): 381-5.
103. SOLECKI D.J.; MODEL L.; GAETZ J.; KAPOOR T.M.; HATTEN M.E. (2004). Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat Neurosci*. 7(11):1195-203.
104. SOLECKI D.J.; GOVEK E.E.; HATTEN M.E. (2006). mPar6 alpha controls neuronal migration. *J Neurosci*. 26(42):10624-5.
105. SOTELO C.; ALVARADO-MALLART R.M.; FRAIN M.; VERNET M. (1994). Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci*. 14(1):124-33.
106. SUDAROV A. & JOYNER A. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Development* 2:26: 1:21.
107. SUGIHARA I. & SHINODA Y. (2007). Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar nuclei: analysis by three-dimensional mapping of the olivonuclear projection and aldolase C labeling. *The Journal of Neuroscience*, 27(36): 9696-9710.
108. TABATA H. & NAKAJIMA K. (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *The journal of Neuroscience*, 23(31):9996-10001.
109. TAMAMAKI N.; FUJIMORI K.E.; TAKAUJI R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *The Journal of Neuroscience* 17(21): 8313-83123.
110. TISSIR F.; WANG C.E.; GOFFINET A.M. (2004). Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development. *Brain Res Dev Brain Res*. 22;149(1):63-71.
111. VOIGT T. (1989). Developmental of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol*, Nov 1;289(1): 74-88.
112. VOOGD J. & RUIGROK T.J.H. (2004). The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: The congruence of projection zones and the zebrin pattern. *Journal of Neurocytology* 33, 5-21.

113. WINGATE R. (2005). Math-Map(ic)s. *Neuron* 48(1):1-4
114. YACUBOVA E. & KOMURO H. (2002). Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells *in vitro*. *The Journal of Neuroscience* 22(14):5966-5981.
115. ZHOU P.; PORCIONATTO M.; PILAPIL M.; CHEN Y.; CHOI Y.; TOLIAS K.F.; BIKOFF J.B.; HONG E.J.; GREENBERG M.E.; SEGAL R.A. (2007). Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*. 5;55(1):53-68.

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](#)